

Université de Montréal

**Évaluation de l'effet inhibiteur de 33 espèces végétales sur la
lipase pancréatique *in vitro***

par
Mia Auger

Département de sciences biologiques
Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et post-doctorales
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en Sciences biologiques

Décembre 2019

© Mia Auger, 2019

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et post-doctorales

Ce mémoire intitulé

**Évaluation de l'effet inhibiteur de 33 espèces végétales sur la
lipase pancréatique *in vitro***

Présenté par

Mia Auger

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr. Simon Joly

Président-rapporteur

Dr. Alain Cuerrier

Directeur de recherche

Dr. Pierre S. Haddad

Codirecteur de recherche

Dr. Noel Raynal

Membre du jury

Résumé

Le diabète de type 2 et l'obésité affectent la population mondiale et, de façon disproportionnelle, chez la population adulte cri d'Eeyou Istchee. Afin de contribuer à la documentation des activités antidiabétiques de 17 plantes médicinales de la forêt boréale traditionnellement recommandées pour traiter les symptômes du diabète, cette étude procède à l'évaluation de l'activité enzymatique de la lipase pancréatique par différentes espèces de plantes. De plus, une évaluation de l'activité enzymatique de la lipase pancréatique est réalisée avec des espèces antidiabétiques de la pharmacopée urbaine de Niamey (Niger) ainsi qu'avec des baies québécoises. Enfin, des composés phénoliques sont identifiés chez ces deux derniers groupes d'espèces végétales. Les résultats de ces études démontrent que la majorité des espèces évaluées ont un effet inhibiteur sur la lipase pancréatique *in vitro*. Les espèces ayant démontré les plus fortes activités inhibitrices sur la lipase pancréatique sont *Kalmia angustifolia*, *Gaultheria hispidula* et *Acacia nilotica*. Ainsi, cette étude permet d'appuyer la justesse des connaissances traditionnelles en ajoutant la documentation d'une activité antidiabétique des espèces végétales au répertoire scientifique.

Mots-clés : lipase pancréatique, plantes médicinales, Eeyou Istchee Cri, obésité, diabète, Niger, baies, médecine traditionnelle autochtone, produits de santé naturels

Abstract

Type 2 diabetes and obesity affect the global population and, disproportionately, the adult population of the Eeyou Istchee Cree. In order to contribute to the documentation of the antidiabetic activities of 17 medicinal plants of the boreal forest traditionally recommended for treating the symptoms of diabetes, this study evaluates the pancreatic lipase enzymatic activity of different plant species. In addition, an evaluation of the enzymatic activity of the pancreatic lipase is carried out with antidiabetic species of the urban pharmacopoeia of Niamey (Niger) as well as with Quebec berries. Finally, phenolic compounds are identified in these last two groups of plant species. Results of these studies demonstrate that the majority of the evaluated species have an inhibitory effect on pancreatic lipase *in vitro*. Species showing the strongest inhibitory activities towards pancreatic lipase are *Kalmia angustifolia*, *Gaultheria hispidula* and *Acacia nilotica*. Thus, this study supports the accuracy of traditional knowledge by adding the documentation of an antidiabetic activity of plant species to the scientific repertoire.

Key words: pancreatic lipase, medicinal plants, Eeyou Istchee Cree, obesity, diabetes, Niger, berries, Indigenous Traditional Medicine, natural health products

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements	xii
Chapitre 1 – Introduction	1
1.1 Introduction au diabète.....	3
1.2 Le diabète de type 2 et l’obésité	5
1.3 Le diabète de type 2 chez les autochtones.....	6
1.4 Les traitements actuels	8
1.5 Activité physique et nutrition	10
1.6 Digestion et lipase pancréatique	12
1.7 Les approches complémentaires	13
1.8 Le savoir traditionnel et l’ethnobotanique	15
1.9 Phytochimie	15
1.10 Objectifs du mémoire	18
1.11 Méthodes et approches	19
Chapitre 2.....	23
An <i>in vitro</i> pancreatic lipase inhibition study of 17 antidiabetic medicinal plants from the Eeyou Istchee (Eastern James Bay Cree) traditional pharmacopoeia	25
2.1 Abstract	25
2.1.1 Résumé.....	26
2.2 Introduction	27
2.3 Material and Methods.....	29
2.3.1 Plant extraction	29
2.3.2 In vitro pancreatic lipase assay	29

2.3.4 Data and statistical analysis.....	30
2.4 Results.....	30
2.4.1 Inhibition of lipase by ethanolic extracts of antidiabetic plants from CEI pharmacopoeia	30
2.4.2 Inhibition of lipase by plant extracts of various concentrations	31
2.5 Discussion.....	32
2.6 Acknowledgements.....	36
2.7 Tables and Figures.....	37
Chapitre 3.....	40
An ethnobotanical study of antidiabetic medicinal plants used in Niamey (Niger) with an <i>in vitro</i> pancreatic lipase inhibition assay.....	42
3.1 Abstract.....	42
3.1.1 Résumé.....	43
3.2 Introduction	44
3.3 Material and Methods.....	47
3.3.1 Study area	47
3.3.2 Geographic overview and vegetation types	47
3.3.3 Socio-economic setting	48
3.3.4 Ethnobotanical surveys and selection of informants.....	48
3.3.6 Study approval.....	49
3.3.7 Quantitative ethnobotany.....	50
3.3.7.1 Ranking.....	50
3.3.7.2 Syndromic importance value (SIV).....	50
3.3.7.3 Informant consensus factor (F_{ic}).....	50
3.3.8 Plant extraction	51
3.3.9 <i>In vitro</i> pancreatic lipase assay	51
3.3.10 HPLC characterization of plant extracts.....	52
3.3.10.1 Phenolic marker compounds.....	52
3.3.10.2 HPLC method development.....	52

3.3.11 Data and statistical analysis.....	53
3.4 Results.....	53
3.4.1 Species ranking.....	53
3.4.2 Inhibition of pancreatic lipase by ethanolic extracts of nine antidiabetic plants from the pharmacopoeia of Niamey	54
3.4.3 Inhibition of lipase by plant extracts of various concentrations	54
3.4.4 HPLC identification of phenolic compounds in plant extracts	55
3.5 Discussion.....	56
3.6 Acknowledgments	60
3.7 Tables and Figures.....	61
Chapitre 4.....	67
An <i>in vitro</i> pancreatic lipase inhibition evaluation of wild berry species found in Quebec	69
4.1 Abstract.....	69
4.1.1 Résumé.....	70
4.2 Introduction	71
4.3 Material and Methods.....	72
4.3.1 Berry collection	72
4.3.2 Plant material extraction	73
4.3.3 HPLC characterization of berry extracts	73
4.3.3.1 Phenolic marker compounds.....	73
4.3.3.2 HPLC method development.....	73
4.3.4 In vitro pancreatic lipase assay	74
4.3.5 Data and statistical analysis.....	74
4.4 Results.....	75
4.4.1 Inhibition of lipase by ethanolic extracts of wild berries from Quebec	75
3.3 HPLC identification of phenolic compounds in plant extracts	76
4.5 Discussion.....	76
4.6 Acknowledgements	78

4.7 Tables and Figures.....	79
Chapitre 5 – Discussion	81
Bibliographie	90

Liste des tableaux

Tableau 1.1 Liste en ordre alphabétique des plantes médicinales antidiabétiques de la pharmacopée CEI sélectionnées selon une approche ethnobotanique

Tableau 1.2 Liste en ordre alphabétique des plantes médicinales antidiabétiques de la pharmacopée urbaine de Niamey sélectionnées selon une approche ethnobotanique

Tableau 1.3 Liste des baies québécoises à l'étude pour l'inhibition de la lipase pancréatique

Table 2.1 List of the 17 CEI antidiabetic plant extracts evaluated in this study

Table 2.2 Values of inhibitory activity towards pancreatic lipase by the 17 antidiabetic medicinal plants from the Eeyouch pharmacopoeia and Orlistat

Table 3.1 Degree of association (w) to type 2 diabetes of 15 symptoms and complications, used to calculate SIV

Table 3.2 List of nine Nigerien ethnobotanically selected antidiabetic medicinal plants extracted for this study

Table 3.3 Antidiabetic species mentioned by informants in Niamey in decreasing order of SIV ranking

Table 3.4 Values of inhibitory activity towards pancreatic lipase by the nine antidiabetic medicinal plants from the urban pharmacopoeia of Niamey and Orlistat

Table 3.5 Phenolic marker compounds in nine antidiabetic plant extracts of the Niamey pharmacopoeia identified using an HPLC method

Table 4.1 List of the seven studied wild berry species from the Quebec territory

Table 4.2 Values of inhibitory activity towards pancreatic lipase by the seven wild berry extracts from Quebec and Orlistat

Table 4.3 Identified phenolic marker compounds in seven berries from Quebec with an HPLC method

Liste des figures

Figure 2.1 Inhibitory response of pancreatic lipase activity at increasing concentrations of extracts of most active antidiabetic plants from the CEI pharmacopoeia

Figure 2.2. Bi-phasic inhibitory response of pancreatic lipase activity at increasing concentrations of extracts of active antidiabetic plants from the CEI pharmacopoeia

Figure 3.1 Ranking comparison between SIVs of 31 plants mentioned by informants in Niamey for antidiabetic properties

Figure 3.2 Change in pancreatic lipase activity relative to control at increasing concentrations of most active antidiabetic plants from the urban pharmacopoeia of Niamey

Figure 3.3 Bi-phasic change in pancreatic lipase activity relative to control at increasing concentrations of antidiabetic plants from the urban pharmacopoeia of Niamey

Figure 4.1 Change in pancreatic lipase activity relative to control at increasing concentrations of most active berry extracts

Liste des abréviations

ANOVA : Analyse de variance / *Variance analysis*

CEI : Cri Eeyou Istchee / *Eeyou Istchee Cree*

CIHR-TAAM : Canadian Institute of Health Research Team in antidiabetic aboriginal medicines

DM : Diabète sucré / *Diabetes Mellitus*

DMSO : Diméthylsulfoxyde / *Dimethyl sulfoxide*

DT2 : Diabète de type 2 / *Type 2 diabetes*

EC₅₀ : Concentration effective médiane / *Half maximal effective concentration*

E_{max} : Effet d'activation maximale / *Maximal effective activation*

FC : Fréquence de citation / *Frequency of citation*

H : Herboriste / *Herbalist*

HPLC : Chromatographie liquide de haute performance / *High-performance liquid chromatography*

IC₅₀ : Concentration inhibitrice médiane / *Half maximal inhibitory concentration*

I_{max} : Effet d'inhibition maximale / *Maximal effective inhibition*

IMC : Indice de masse corporelle / *Body mass index*

IRBV : Institut de recherche en biologie végétale

IRSC-ÉMAAD : Équipe de recherche sur les médecines autochtones antidiabétiques des Instituts de recherche en santé du Canada

O.D. : Densité optique / *Optical density*

ROS : Espèce réactive d'oxygène / *Reactive oxygen specie*

SE : Erreur-type / *Standard error*

SIV : Valeur d'importance syndromique / *Syndromic importance value*

T2D : Diabète de type 2 / *Type 2 diabetes*

TH : Guérisseur traditionnel / *Traditional healer*

TM : Médecine traditionnelle / *Traditional medicine*

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier toute l'équipe de recherche sur les médecines autochtones antidiabétiques des IRSC. Membres des communautés autochtones, chercheurs et étudiants ont pu voir le dénouement d'une longue période d'études qui a su se réaliser grâce au travail harmonieux de tous durant ces dernières années. Je remercie le Dr. Alain Cuerrier pour sa direction. Sa nature calme et positive, ainsi que son soutien constant, ont su rendre cette expérience de recherche fort agréable. Je remercie également mon codirecteur de recherche, Dr. Pierre S. Haddad, pour son support continu et le partage de ses connaissances, sans lesquelles ce travail n'aurait pu être complété. Ma formation a aussi grandement bénéficiée de la collaboration de Michel Rapinski, un mentor qui s'est présenté à moi dès les premières heures de ce cheminement et qui a su me transmettre sa passion pour la recherche. Merci au Dr. Ammar Saleem et au Dr. Cory Harris qui ont su m'appuyer pour les analyses phytochimiques, ainsi qu'à Alexandre Poisson pour le développement initial du protocole expérimental. Enfin, ce travail n'aurait pu se terminer grâce au soutien inconditionnel de mes amis et de ma famille. Je ressors de cette expérience avec beaucoup plus de gains que je n'aurais pu m'imaginer ; connaissances, amitiés, passions. Merci à tous pour cette expérience épanouissante.

Chapitre 1 – Introduction

L'évolution accélérée des technologies qui entourent l'homme précipite celui-ci dans une situation complexe. Ces avancées ont grandement facilité le labeur, mais leur usage répandu aurait entraîné l'apparition de nouvelles maladies chroniques qui s'étendent sur le plan mondial : l'obésité et le diabète de type 2 (DT2) (Popkin *et al.*, 2012). Ces maladies se seraient développées suite à un déséquilibre métabolique constant entre l'apport et la dépense d'énergie corporelle, quand on remplace les journées de chasse, de pêche et de cueillette par des journées au bureau et une diète d'aliments transformés, riche en carbohydrates et en lipides (Popkin *et al.*, 2012 ; Misra *et al.*, 2013). Ces maladies touchent maintenant la population mondiale à des proportions épidémiques et atteignent certaines populations de façon plus marquée que d'autres (Ogurtsova *et al.*, 2017). Par exemple, au Canada, elles se développent de façon plus considérable chez les communautés autochtones, où un tiers de la population est atteint du DT2, soit trois fois plus que la population nationale, et un quart est atteint d'obésité, soit 10 fois plus que le reste de la population (Bruce *et al.*, 2011 ; Dyck *et al.*, 2010 ; Haman *et al.*, 2010). Certains avancent qu'une prédisposition génétique puisse expliquer en partie l'occurrence plus élevée de ces maladies dans les communautés autochtones (Neel, 1999), mais ce sont davantage plusieurs facteurs environnementaux qui favorisent leur apparition. Parmi ces facteurs, on trouve une faible utilisation des services de santé publics. On fait face également à un accès difficile à des produits alimentaires frais et nutritifs, qui s'avèrent aussi très coûteux. Enfin, on note la diminution, voire la disparition des mœurs, coutumes et traditions dans les communautés, traditions qui se révélaient souvent bénéfiques à la santé des individus (Dyck *et al.*, 2010 ; Haman *et al.*, 2010). Ainsi, dans le but de réduire les taux de DT2 au sein de ces communautés, des chercheurs des universités de Montréal, McGill et Ottawa travaillent en collaboration avec la Nation crie d'Eeyou Istchee (CEI – secteur Est de la Baie-James au Nord du Québec) et leurs services de santé afin de trouver des solutions adaptées à leur culture. Cette équipe de recherche multidisciplinaire des IRSC sur les médecines autochtones antidiabétiques (IRSC-ÉMAAD) a comme mandat la recherche de plantes médicinales ayant un potentiel antidiabétique. Les intentions premières de l'équipe sont d'assurer la préservation et la protection des savoirs traditionnels des peuples autochtones canadiens et

de documenter ces savoirs de façon scientifique. Une évaluation scientifique des plantes médicinales utilisées par des guérisseurs traditionnels cris pour les symptômes du diabète est alors effectuée à travers plusieurs champs d'expertise : pharmacologie, biochimie, physiologie, ethnobotanique, nutrition, toxicologie, phytochimie, biologie végétale et étude clinique. Le présent travail s'inscrit dans la même mouvance et consiste à évaluer les effets des plantes médicinales antidiabétiques cries, nigériennes et de baies québécoises sur l'activité de la lipase pancréatique, une enzyme digestive des lipides chez l'homme (discutée plus en détail plus bas).

1.1 Introduction au diabète

Le diabète est une maladie chronique définie par une forte concentration en glucose plasmatique. Caractérisée par cette hyperglycémie, le diabète est atteint lorsqu'il y a un dysfonctionnement relié à l'activité et/ou la sécrétion de l'insuline. L'insuline est une hormone produite par les cellules endocrines du pancréas (cellules β) et, une fois déversée dans le sang, agit comme portier pour le glucose : elle permet au glucose sanguin d'entrer dans les cellules somatiques afin que ces dernières puissent s'en servir selon leurs besoins, pour la production ou le stockage d'énergie (American Diabetes Association, 2013). Cependant, certains tissus comme le cerveau et les cellules musculaires sollicitées ont la capacité d'importer le glucose sanguin sans avoir recours à l'insuline. On les caractérise comme tissus non insulino-dépendant. Il en est ainsi afin d'assurer que le cerveau et les muscles sollicités ne soient jamais en carence d'énergie pour des raisons évolutives bien définies qui seront discutées ultérieurement (Lund-Andersen, 1979 ; Rose et Richter, 2005). Mais quand l'insuline ne peut plus exécuter sa fonction de manière optimale, le glucose sanguin s'accumule dans l'espace extracellulaire, ce qui peut entraîner plusieurs conséquences. Les cellules somatiques, n'ayant plus accès à leur principale source d'énergie, doivent se tourner vers d'autres ressources comme le métabolisme des lipides ou des protéines. En premier recours, le corps se tourne vers la lipolyse pour obtenir l'énergie dont il nécessite, ce qui fait augmenter les taux de lipides sanguins (jusqu'à l'hyperlipidémie) et peut

entraîner la lipotoxicité et la perte de poids. Quand la source lipidémique s'épuise, le corps entame alors la protéolyse. Celle-ci peut entraîner une perte de poids, la fonte des tissus musculaires et d'autres problèmes liés à la perte de protéines (Cryer *et al.*, 2003).

De plus, l'hyperglycémie constante peut causer de multiples complications en raison de la glucotoxicité qu'elle entraîne, soit la toxicité métabolique qu'engendre une exposition prolongée à des molécules glucidiques. Deux types de glucotoxicité existent ; la glycation non enzymatique, puis le stress oxydatif. Le stress oxydant est le résultat de l'excès d'un processus qui se produit de façon régulière dans un corps normal et en santé, soit la production d'espèces réactives oxygénées (ROS). Le glucose est une molécule qui peut subir une auto-oxydation et générer des radicaux libres. Mais les ROS sont une conséquence naturelle de la respiration cellulaire aérobie et, pour balancer ce stress naturel, le corps possède des outils antioxydants qui lui permettent de s'en débarrasser. Cependant, lorsque le corps est en hyperglycémie constante, le nombre d'antioxydants disponibles devient alors trop faible pour réparer tous les cas de stress oxydatifs causés par l'hyperglycémie prolongée (Johansen *et al.*, 2005 ; Finkel *et al.*, 2000). Quant à la glycation non enzymatique, il s'agit d'un processus qui se produit alors que les molécules organiques du corps sont exposées de façon prolongée aux molécules simples de glucose sanguin. Les molécules de glucose ont alors tendance à se lier de façon covalente à d'autres molécules (comme les lipides, les protéines et l'ADN) formant ainsi des produits de glycosylation avancés. Ces deux types de glucotoxicité sont les principaux inducteurs des complications chroniques du diabète, comme l'augmentation des risques de pathologies cardiovasculaires, la cardiopathie, l'angiopathie, la rétinopathie, la néphropathie et la neuropathie (Finkel *et al.*, 2000 ; Goldin *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2001).

Trois principales formes de diabète existent : le diabète de type 1, le diabète de type 2 et le diabète gestationnel. Le diabète de type 1 se voit apparaître quand le pancréas ne peut plus fabriquer d'insuline suite à une réaction auto-immune contre les cellules β du pancréas ou contre l'insuline elle-même. Le glucose reste donc coincé dans le sang, ne pouvant entrer de manière optimale dans les cellules somatiques (American Diabetes Association, 2013). Pour le traitement, des injections d'insuline postprandiales sont requises.

Le diabète de type 2, quant à lui, est observé alors que la production pancréatique initiale d'insuline reste normale, mais ce sont les cellules somatiques qui répondent inadéquatement à celle-ci. Une anomalie dans la production d'insuline est parfois aussi observée par la suite (décrite plus bas). Il s'agit du diabète le plus répandu mondialement (American Diabetes Association, 2013 ; Agence de la santé publique du Canada, 2011). Enfin, le diabète gestationnel s'observe uniquement durant la grossesse, mais son mauvais contrôle peut aussi augmenter les risques pour la mère et pour l'enfant de développer le DT2 après l'accouchement. Ce sont les changements hormonaux causés par la gestation qui affectent l'action de l'insuline. Ce type de diabète ressemble au DT2, où une résistance des cellules somatiques à l'insuline cause une hyperglycémie et une hyperinsulinémie (American Diabetes Association, 2013). Pour ces deux derniers cas de diabète, la nature des traitements varie, mais le plus efficace – constitué de diète et d'exercice physique – est aussi le moins populaire, car il demande des modifications parfois importantes des habitudes de vie (Agence de la santé publique du Canada, 2011 ; Coagiluri, 2010).

1.2 Le diabète de type 2 et l'obésité

Le diabète de type 2 représente plus de 90% des cas de diabète. Il constitue une vraie menace mondiale alors qu'il atteint des niveaux pandémiques. Environ 8,5% de la population adulte est atteinte aujourd'hui, représentant le double de la population adulte atteinte en 1980 (American Diabetes Association, 2013 ; OMS, 2016). Comme mentionné précédemment, le DT2 se caractérise par une hyperglycémie, causée par la résistance des tissus cibles envers l'insuline. Cette résistance à l'insuline serait une réponse des cellules somatiques à une trop forte et longue exposition à des molécules de glucose et d'acides gras. Pendant les premières phases du DT2, les cellules β du pancréas augmenteront leur masse et leur production d'insuline pour tenter d'obtenir à nouveau une glycémie normale; un phénomène appelé la compensation cellulaire à la résistance à l'insuline. Mais avec une compensation continue par les cellules β vient la détérioration de leur fonction, soit une diminution, voir même la cessation de production la d'insuline. Ces deux conditions,

l'insulinorésistance et le dysfonctionnement des cellules β , sont nécessaires à l'apparition du DT2 et entraînent à long terme une intolérance au glucose (Prentki *et al.*, 2006).

Le DT2 est influencé par plusieurs facteurs et entraîne plusieurs complications (Hanley *et al.*, 2005), ce qui en fait une maladie très complexe à comprendre ou à traiter, mais ce qui permet aussi de cibler plusieurs voies métaboliques différentes pour en effectuer le traitement ou la prévention. Il importe cependant de noter que le développement du DT2 est influencé par l'obésité. Cette dernière est souvent estimée par l'indice de masse corporelle (IMC) qui consiste à diviser le poids corporel par la taille verticale portée au carré. C'est-à-dire que plus l'IMC augmente, plus les risques de développer le DT2 augmentent à leur tour, soit de trois fois avec un IMC supérieur à 25 (surpoids), et de 20 fois avec un IMC supérieur à 30 kg/m² (obésité). L'OMS constate qu'en 2014, plus de la moitié de la population mondiale était en surpoids ou obèse. Pour ces raisons, la prévention du gain de poids ou la perte de poids chez les individus atteints de DT2 devrait être la cible thérapeutique principale. Par exemple, chez un individu prédiabétique, une perte de poids de 1 kg correspondrait à une baisse de risque de développer le DT2 de 16% (Franz *et al.*, 2017). À ce jour, très peu de médicaments se trouvent sur le marché pharmaceutique pour le traitement de l'obésité à long terme. L'un d'entre eux se nomme Orlistat™ ; il s'agit d'une molécule de tétrahydrolipstatine et son activité consiste à provoquer l'inhibition des lipases gastriques et pancréatiques (Padwal et Majumdar, 2007).

1.3 Le diabète de type 2 chez les autochtones

Le DT2 était une maladie rare chez les populations autochtones de l'Amérique du Nord avant les années 1940. Mais l'occurrence de la maladie a augmenté à compter de ces années au point d'avoir atteint aujourd'hui des proportions épidémiques. Cette augmentation soudaine du nombre de cas s'explique à partir de plusieurs facteurs des spectres environnementaux et génétiques des populations autochtones canadiennes. Ce sont la rapidité des changements socioculturels et des habitudes de vie dans les 50 dernières années qui ont eu d'importantes incidences sur l'état de santé de ces populations et qui ont

fortement contribué aux taux élevés du DT2 et de ses complications. Aux années succédant l'industrialisation de l'alimentation et sa commercialisation, les populations autochtones ont vu des changements importants dans leurs habitudes de vie. On a vu alors apparaître une alimentation inadaptée et malsaine, l'inactivité physique, le tabagisme ; tous des facteurs de risques reliés au développement du DT2 (Agence de la santé publique du Canada, 2011). La population crie d'Eeyou Istchee de la Baie James du nord du Québec est particulièrement affectée, où l'incidence du DT2 dépasse maintenant les 29% chez les adultes (Kuzmina et al., 2011). Alors qu'autrefois le mode de vie traditionnel nomade favorisait une alimentation saine et l'activité physique, la population crie ne connaissait pas de maladie chronique (Robinson, 1988). Avec la colonisation s'est aussi instaurée la diète européenne ; une diète qui a été associée à des carences nutritives et même certains cas de malnutrition (Berkes et Farkas, 1978 ; Moore et al., 1946 ; Vivian et al., 1948). Avec la sédentarisation qui s'ajoute à tous ces changements, l'obésité est devenue dès lors un déterminant important du DT2 dans les communautés CEI (Boston et al., 1997).

À tous ces facteurs environnementaux qui influent considérablement sur l'incidence du DT2 et de l'obésité dans cette population, s'ajoute la prédisposition génétique. En effet, cette population posséderait, selon l'*hypothèse du génotype vigoureux* proposée par Neel en 1999 (Neel, 1999), un gène qui se serait développé durant les ères de chasse et de cueillette, alors que les périodes de famine et d'abondance alimentaire s'alternaient de façon imprévisible. Ce gène qui permettait de mettre en réserve les apports énergétiques de la diète, a rendu possible le maintien plus efficace des réserves énergétiques durant de longues périodes sans apport nutritif. Alors que maintenant nous vivons dans un monde d'abondance alimentaire continu, ce gène autrefois évolutivement avantageux est aujourd'hui nuisible puisqu'il conduirait au désordre métabolique, menant plus facilement un individu vers l'obésité et le DT2 (Chakravarthy et al., 2004 ; El-Abhar et Schaalán, 2014).

Enfin, les approches thérapeutiques des services de santé nationaux pour l'obésité et le DT2 semblent peu efficaces auprès de la population crie (Agence de la santé publique du Canada, 2011). L'accès aux services de soins de santé est d'emblée limité auprès de cette population pour des raisons d'entrave géographique, de coûts inabordables et de services

mal adaptés, impliquant notamment des barrières linguistiques et culturelles. Sans oublier l'influence de certains déterminants sociaux de la santé, telle que la pauvreté, ainsi que les traumatismes historiques qui engendrent des distances additionnelles entre cette population et le système de santé. En plus, bien que 90% des habitants fréquentent des professionnels de la santé, des études ont montrés que 80% de ces premiers croient que le système de santé aurait besoin d'être amélioré (Young *et al.*, 2000). Il est donc primordial de tenir compte de la conception des communautés autochtones à l'égard des services de santé qui leurs sont disponibles, pour une meilleure conception d'un traitement efficace de l'obésité et du DT2 qui soit adapté à leur culture.

1.4 Les traitements actuels

La nature des traitements pour le diabète de type 2 et l'obésité peut prendre de multiples formes. Bien que la formule la plus efficace consiste en la modification des habitudes de vie, de façon à adopter un comportement plus sain (comme l'alimentation équilibrée et l'augmentation de l'activité physique) (Franz *et al.*, 2017), les traitements pharmacologiques oraux sont le plus souvent préférés par la population (Kuzmina *et al.*, 2011). Mais là encore, les voies thérapeutiques varient d'un médicament à un autre. Par exemple, quand le stade du DT2 est plutôt primaire, on peut recourir à la classe de médicaments des sulfonylurés. Cette classe entraîne la stimulation des cellules β -pancréatiques, provoquant ainsi la sécrétion d'insuline. Si le stade de DT2 est plutôt avancé (où la masse de cellules β -pancréatiques fonctionnelles est déjà compromise), alors on peut recourir à un type de médicament appelé biguanides qui possède une action hypoglycémiante. Elle agit sur les cellules musculaires en augmentant le transport de glucose dans celles-ci, ainsi que sur le cerveau et sur le foie en agissant sur le complexe I de la chaîne respiratoire et induisant l'activation de l'AMPK (Song, 2016). Certains médicaments agissent au niveau des tissus adipeux, comme les thiazolidinediones, ou bien au niveau du système gastro-intestinal, comme les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase. Enfin, il existe aussi d'autre type de traitements, comme les incrétines, les inhibiteurs de SGLT, les injections à l'insuline

et des techniques de chirurgie bariatrique pour les cas avancés (Coagiluri, 2010 ; Harrigan *et al.*, 2001).

Les traitements pharmacologiques ne ciblent souvent qu'une seule voie thérapeutique à la fois et entraînent aussi souvent des effets secondaires indésirables. Par contre, il n'est pas rare de combiner deux classes d'hypoglycémifiants oraux si les conditions médicales de l'individu affecté le permettent. De plus, il est souvent possible de combiner plusieurs types de traitements. Par exemple, l'exercice physique et une diète nutritionnellement adaptée et équilibrée peuvent servir de complément à un traitement pharmaceutique, puisque ces méthodes resensibilisent les tissus périphériques à l'insuline. Ces modifications d'habitudes de vie peuvent être bénéfiques même pour les cas les plus avancés de DT2 qui nécessitent des injections à l'insuline. De plus, à l'intérieur même de la modification des habitudes nutritionnelles, il est possible de sélectionner de façon stratégique des aliments qui possèdent des composantes bénéfiques pour un individu atteint de ces maladies chroniques (El-abhar et Schaalán, 2014 ; Gonzalez-Castejon et Rodriguez-Casado, 2011 ; Sergent *et al.*, 2012 ; Tiwari et Rao, 2002 ; Williams *et al.*, 2013). Plusieurs de ces aliments proviennent de la flore environnementale terrestre.

Des centaines d'études ont effectivement permis à l'homme d'être bien au courant de la diversité moléculaire des éléments qui composent cette flore. Non seulement il existe une grande diversité d'espèces qui composent la flore, mais chaque espèce est aussi composée d'une grande variété de composantes moléculaires. Une même plante peut donc posséder plus d'une composante médicinale connue qui pourrait être bénéfique pour un individu qui l'intègre à son alimentation. Comme le temps et des études l'ont montré, il y a souvent peu ou pas de toxicité associée à l'interaction moléculaire entre deux espèces végétales. Il est donc parfois possible de combiner plusieurs espèces ayant des propriétés médicinales connues, en minimisant les effets secondaires indésirables. On peut alors imaginer un traitement complexe pour l'obésité et le DT2 comme le suivant : une diète d'aliments frais et nutritionnellement riches et variés, composée aussi de plantes médicinales sélectionnées qui possèdent chacune une ou plusieurs propriétés bénéfiques connues. Idéalement ce type d'alimentation devrait aussi inclure le travail physique qu'il nécessite

pour son obtention, comme la marche et la cueillette dans la forêt, la chasse ou la pêche. Avec ce type de traitement multiple, on cible simultanément l'amélioration de l'obésité et du DT2 par d'innombrables voies métaboliques.

1.5 Activité physique et nutrition

Tel que mentionné, le surpoids et l'obésité sont les facteurs de risque les plus importants pour le développement du DT2 et de ses complications (American Diabetes Association, 2013 ; Coagiluri, 2010 ; Kopelman, 2000). L'équilibre entre l'apport et la dépense d'énergie contribue directement au maintien d'un poids corporel sain. Toutefois, des facteurs personnels, environnementaux et socioculturels peuvent aussi influencer sur les changements de poids corporels (Kopelman, 2000). C'est pourquoi l'obésité est une maladie chronique complexe à traiter, puisque les facteurs sous-jacents ne sont pas uniques. Néanmoins, comme la nutrition et l'activité physique influencent directement le poids corporel, ce sont des facteurs modifiables qui, une fois pris en main, peuvent équivaloir à la meilleure méthode pour le traitement de l'obésité (American Diabetes Association, 2013 ; Coagiluri, 2010).

L'activité physique entraîne plusieurs bénéfices : elle aide à maintenir un poids santé, à réduire le stress, à fortifier le corps et à prévenir des maladies chroniques associées, comme le DT2, ses complications et un décès prématuré. En outre, il a été démontré qu'elle aide aussi au meilleur contrôle de la glycémie, diminue la résistance à l'insuline, abaisse la tension artérielle et améliore les taux de lipides sanguins (Thomas *et al.*, 2006 ; Tuomilehto *et al.*, 2001). De plus, l'activité physique est particulièrement bénéfique pour un individu atteint de DT2 ou prédiabétique. Non seulement parce qu'elle permet d'envisager une perte de poids, mais notamment parce qu'elle permet au glucose sanguin d'entrer dans les cellules musculaires sollicitées sans avoir recours à l'insuline (Rose et Richter, 2005). Le cerveau, ne pouvant que stocker l'équivalent de quelques minutes d'énergie sous forme de glucose à la fois, a besoin d'un apport constant en glucose de la part du sang. La barrière hématoencéphalique possède donc un mécanisme de diffusion facilitée pour le glucose, où l'insertion membranaire des transporteurs de glucose ne requiert pas d'insuline (Lund-

Andersen, 1979). Les cellules musculaires, quant à elles, à l'état de repos nécessitent l'insuline pour faire entrer le glucose sanguin. Par contre, pour prévenir des situations d'incapacité à fuir en état d'urgence, les cellules musculaires sollicitées possèdent plusieurs mécanismes pour faciliter l'apport rapide en énergie. Le flux sanguin augmente en direction des tissus musculaires (jusqu'à 20 fois le flux sanguin musculaire au repos), la perfusion sanguine des cellules musculaires s'élève, et il y a une translocation des transporteurs de glucose vers la membrane des cellules musculaires qui se fait indépendamment de l'action de l'insuline. Ces mécanismes permettent ensemble l'augmentation de l'apport en glucose pour les cellules musculaires sollicitées (Rose et Richter, 2005). C'est pourquoi l'exercice physique est reconnue comme une voie de traitement pour les individus atteints de DT2, puisqu'il permet le transfert du glucose vers les cellules musculaires (et donc la diminution des concentrations de glucose sanguin) dans un état de résistance à l'insuline.

Après avoir discuté des dépenses énergétiques, abordons maintenant la question de l'apport énergétique. Indéniablement, cet apport provient de la nourriture que nous consommons. Nos choix alimentaires sont influencés par de nombreux facteurs – des types environnementaux, socioculturels et socioéconomiques – qui peuvent mener à des options d'alimentation saines ou malsaines. Certains choix alimentaires nuisibles pour la santé ont le potentiel d'augmenter les risques de DT2, particulièrement lorsqu'il s'agit de leur surconsommation et que celle-ci mène à l'embonpoint ou à l'obésité. À l'inverse, une alimentation saine peut mener à la prévention ou même au traitement de certaines maladies chroniques (American Diabetes Association, 2013). Par exemple, les fibres solubles (retrouvés dans les agrumes, baies, légumineuses, etc.) aident à réguler la glycémie ; les aliments riches en fibres peuvent aider à contrôler le poids et peuvent réduire les risques de développer le DT2 (Anderson *et al.*, 2004) ; et la consommation quotidienne de viande rouge peut augmenter les risques de développer le DT2 (Pan *et al.*, 2011). Enfin, une consommation peu fréquente de fruits et de légumes est associée à des facteurs de risques liés au style de vie, comme l'inactivité physique et l'obésité (American Diabetes Association, 2013). Ensemble, l'alimentation saine et l'exercice physique constituent la meilleure médecine pour l'obésité et le DT2 (Klein *et al.*, 2004). Par contre, la difficulté pour la population diabétique

et obèse à effectuer ces changements dans leurs habitudes de vie fait en sorte que plusieurs traitements pharmacologiques pour le DT2 existent.

1.6 Digestion et lipase pancréatique

La lipase pancréatique est une protéine enzymatique digestive produite par le pancréas exocrine et est déversée dans le duodénum au moment où la présence de molécules lipidiques est détectée dans le système gastro-intestinal. Aussi appelé triacylglycérol acyl hydrolase, son activité catalytique permet de briser deux liens dans la molécule de triacylglycérol (la molécule lipidique la plus courante de la diète), produisant des molécules d'acide gras libres et de monoacylglycérol. C'est seulement dès lors que ces molécules lipidiques simplifiées peuvent être absorbées par les cellules intestinales (entérocytes) et transportées vers leur voie métabolique ou leur stockage. La lipase pancréatique est l'enzyme responsable pour la digestion de 50 à 70% des lipides provenant de la diète. La lipase est hydrosoluble et s'associe principalement à des molécules de triglycérides et d'acides gras (Mendes *et al.*, 2012 ; Desnuelle et Savary, 1963). Chez l'homme, les lipides de la diète sont solubilisés à l'aide des sels biliaires, formant des micelles de gras dans un solvant de nature hydrique. Cette formation permet à l'enzyme hydrophile de s'attaquer aux molécules lipidiques pour catalyser la réaction de lipolyse (Desnuelle et Savary, 1963). Une inhibition de cette enzyme résulterait donc au passage direct des molécules lipidiques de la diète (qui n'ont pas été hydrolysées par d'autres enzymes lipolytiques au cours de la digestion) vers l'excrétion. Une molécule de tétrahydrolipstatine (isolée de la bactérie *Streptomyces toxytricini*) a démontré une inhibition irréversible de la lipase pancréatique. Un des seuls médicaments pharmacologiques mis en marché pour le traitement de l'obésité à long terme se compose de cette molécule inhibitrice et se nomme commercialement Orlistat™. Cet agent pharmacologique a fait l'objet de nombreuses études avant de pouvoir être mis en marché. Des études cliniques ont démontré qu'Orlistat diminue les taux lipidiques sanguins (LDL, HDL, VLDL, cholestérol et apolipoprotéines A et B), diminue les pressions sanguines systoliques et diastoliques, et favorise aussi la perte de poids corporel (Heck *et al.*, 2000 ; McNeely et Benfield, 1999 ; Padwal et Majumdar, 2007). Par

contre, puisqu'il s'agit d'une molécule unique à action ciblée, ce traitement entraîne aussi des effets secondaires indésirables. Les effets secondaires observés peuvent être des selles grasses ou huileuses, une urgence fécale et parfois une incontinence fécale. Les effets indésirables qui peuvent être de nature systémique sont minimes puisqu'il y a très peu d'absorption systémique d'Orlistat, et c'est pourquoi la plupart des effets secondaires indésirables se limitent au système gastro-intestinal (Padwal et Majumdar, 2007).

1.7 Les approches complémentaires

Les traitements modernes sont certes efficaces, car un très long processus rigoureux est exigé lors du développement d'un médicament pour en assurer l'efficacité et l'innocuité. Une molécule à action précise est alors fabriquée ou isolée en laboratoire et cible une voie thérapeutique souvent unique. Par contre, viennent avec cette précision accrue des effets parfois indésirables, tels que des effets secondaires néfastes ou une possibilité d'interaction dangereuse lorsque combiné avec un ou plusieurs autres types de traitements. Mais bien que compétente, la médecine moderne est rarement utilisée de façon singulière. Elle est souvent combinée avec des approches complémentaires et ce traitement en tandem est observé de façon encore plus prononcée chez les communautés autochtones canadiennes. Des chercheurs du Wisconsin se sont tournés vers cette question lors d'une étude menée dans un centre de santé autochtone urbain. Cette étude a montré qu'une grande proportion (38%) des patients de ce centre de santé fréquentaient aussi un guérisseur traditionnel. Bien que les conseils variaient entre les guérisseurs traditionnels et les médecins, la majorité des patients avait une meilleure opinion des conseils provenant des guérisseurs (Marbella *et al.*, 1998). Chez la population crie, une tendance similaire est observée, où la médecine occidentale est considérée plus éloignée des concepts et approches crie sur la santé. Une approche qui tienne compte de la culture et du langage des peuples autochtones aurait donc possiblement pour effet d'augmenter l'adhésion des membres de ces communautés aux traitements de la médecine allochtone, souvent sous-optimale (El-Abhar et Shaalan, 2014 ; Williams *et al.*, 2013). L'équipe de recherche du IRSC-ÉMAAD a été mise sur pied pour étudier différentes voies de traitement que peuvent offrir les plantes médicinales antidiabétiques de

la pharmacopée crie d'Eeyou Istchee, ainsi que pour établir un plan d'action qui permettrait d'unifier les méthodes traditionnelles et modernes pour une meilleure prévention ou traitement du DT2 à l'intérieur des communautés autochtones canadiennes.

Pour cette étude, dix-sept espèces végétales ont été sélectionnées parmi la pharmacopée crie (la méthode de sélection sera expliquée en détail dans la section qui suit) et des modèles d'études *in vitro* et *in vivo* ont été utilisés pour évaluer les propriétés antidiabétiques de ces plantes. Ces dernières incluaient les effets sur l'absorption du glucose, la sécrétion d'insuline, la différenciation adipocytaire, la protection contre la glucotoxicité et plus encore. Une recherche clinique, des essais toxicologiques, des analyses phytochimiques et des stratégies nutritionnelles font aussi l'objet d'étude au sein de ce projet multidisciplinaire. Le présent mémoire comprend une étude qui se consacre à analyser les effets de ces 17 espèces sur la lipase pancréatique *in vitro*, un bioessai d'activité anti-obésité qui n'avait pas encore été examiné.

Comme l'obésité et le diabète sont des problèmes qui atteignent la population mondiale, autant dans les pays développés que ceux en voie de développement (Ogurtsova *et al.*, 2017), le présent mémoire s'étendra également au niveau des espèces végétales antidiabétiques retrouvées sur le continent africain. L'Afrique a été identifiée comme étant une région du monde où le potentiel d'augmentation de la prévalence du DT2 est grand. Au Niger, près de 5% de la population est diabétique (Whiting *et al.*, 2011) et 80% ont recours à la médecine traditionnelle comme soin de santé primaire (Lewis et Elvin-Lewis, 2003), non seulement parce que les plantes constituent un élément important de leur patrimoine culturel, mais aussi parce qu'elle reste la meilleure alternative pour la majorité des populations vivant dans les pays en développement (Inngjerdigen *et al.*, 2004 ; WHO, 2002). L'étude inclura donc neuf espèces médicinales antidiabétiques nigériennes issues de la pharmacopée de la communauté Niamey. Celles-ci ont été sélectionnées par le même processus que les plantes de la communauté CEI, tel que décrit dans la prochaine section. Certaines d'entre-elles ont déjà fait l'objet d'études sur des propriétés médicinales, quoique peu portent sur les voies de traitement du DT2 (Gilani *et al.*, 1999 ; Helal *et al.*, 2013 ; Touré *et al.*, 2011 ; Zerbo *et al.*, 2010).

Finalement, sept espèces de baies québécoises ont aussi été étudiées pour leur effet sur la lipase pancréatique. Les baies sont reconnues pour avoir une forte teneur en polyphénols, sont abondantes sur le territoire québécois et font partie intégrante d'une alimentation saine. Les polyphénols sont souvent étudiés pour leurs effets antioxydants, mais plus récemment pour leurs effets antidiabétiques (Eid et Haddad, 2017 ; Guerrero-Analco *et al.*, 2014). Selon la littérature, aucune étude similaire avec lipase pancréatique n'a été réalisée avec les espèces végétales ciblées dans ce mémoire.

1.8 Le savoir traditionnel et l'ethnobotanique

Près de 80% de la population mondiale s'appuient sur la médecine traditionnelle comme étant leur première source de soins de santé, pour des raisons d'accessibilité, de coût et d'efficacité (Lewis et Elvin-Lewis, 2003). Existente d'un bout à l'autre de la planète des pharmacopées de plantes médicinales qui varient complètement en contenu, selon le climat local, l'écosystème dans lequel ils se trouvent et la photopériode. Le savoir de ces pharmacopées est transmis de génération en génération de façon orale. Il peut être transmis à son tour à la recherche scientifique à l'aide de l'ethnobotanique. Cette dernière se définit par l'étude des interactions entre l'homme et les plantes et doit notamment être effectuée de manière éthique, dans le respect du savoir local. Comme mentionné précédemment, l'obésité et le DT2 sont des maladies qui se sont développées à l'échelle internationale et en très peu de temps. Il est donc possible de retrouver des espèces médicinales appartenant à des pharmacopées totalement distinctes (par leur contenu et leur localisation) et qui sont connues pour traiter des symptômes du DT2. Il y a déjà plus de vingt ans, Marles et Farnsworth (1995) ont répertorié plus de 1200 espèces végétales qui sont utilisées mondialement comme médecine traditionnelle pour le traitement du diabète.

1.9 Phytochimie

Tout comme l'homme, la plante produit des milliers de composés qui contribuent à son développement et à sa croissance ; que ce soit par photosynthèse, où la plante utilise

l'énergie du soleil pour produire des molécules de sucre, ou par absorption, où elle assimile les composés minéraux et autres du sol. Certains composés sont créés par la plante pour des fonctions primaires, telles que la croissance et la reproduction, et sont appelés métabolites primaires. D'autres composés sont créés pour des raisons qui autrefois semblaient plutôt ambiguës et qui ont été nommés métabolites secondaires (Bourgaud *et al.*, 2001 ; Saxena *et al.*, 2013). Au fil du temps, les fonctions de ces métabolites secondaires ont été identifiées comme étant des réponses aux différents facteurs environnementaux et aux interactions des plantes avec le milieu biotique. Ce sont certains de ces métabolites secondaires qui donnent les propriétés médicinales aux plantes. En effet, ces composés sont créés par les plantes pour se protéger de facteurs extérieurs menaçant leur survie. Il est donc fort plausible que ces mêmes composés puissent aussi offrir à l'homme des propriétés médicinales, protectrices d'agents menaçants (Saxena *et al.*, 2001). Cependant, ce ne sont pas toutes les propriétés médicinales des plantes qui sont issues des métabolites secondaires, car certains métabolites primaires peuvent aussi engendrer une activité biologique chez l'homme. Plusieurs agents pharmaceutiques sont des dérivés ou sont des fractions de métabolites qui proviennent originellement des plantes, comme l'Aspirine (dérivée de l'acide salicylique de *Salix alba*) ou la Metformine (dérivée de la galéagine tirée du lilas français *Galega officinalis*). Comme le DT2 est une maladie multifactorielle, les nouvelles molécules pharmaceutiques élaborées pour le traitement du DT2 sont conçues pour cibler de multiples voies de traitement à la fois, avec un seul agent. Par contre, les plantes médicinales possèdent plusieurs composés phytochimiques qui peuvent provoquer une ou plusieurs actions médicinales à la fois chez l'homme, favorisant ainsi un certain synergisme. Ce sont ces dernières qui pourront ainsi, et potentiellement mieux, répondre aux besoins thérapeutiques des maladies chroniques et multifactorielles (El-Abhar et Schaalán, 2014).

Trois grandes familles chimiques sont généralement considérées : les phénols, les terpènes et stéroïdes et les alcaloïdes. Les phénols sont ubiquitaires dans tout le règne végétal, puisqu'ils sont impliqués dans la synthèse de la lignine. Les terpènes et stéroïdes jouent principalement un rôle de défense dans l'organisme végétal et sont répandus à travers tout le règne végétal. Les alcaloïdes, quant à eux, sont beaucoup plus spécifiques au genre et

à l'espèce (Bourgaud *et al.*, 2001). Les composés phénoliques sont particulièrement intéressants puisque ces métabolites sont les mieux connues à l'égard de leur effet bénéfique sur la santé, puisqu'ils sont les phytoconstituants les plus nombreux et structurellement diversifiés (Saxena *et al.*, 2001). Comme leur structure varie énormément, allant de molécules simples comme les acides phénoliques jusqu'aux molécules complexes comme les composés polymérisés tels que les tannins, cette famille offre un large spectre d'effets pharmacologiques. Par exemple, plusieurs études ont démontré des activités antioxydantes, anticancérigènes et antimicrobiennes, mais plus récemment c'est le potentiel anti-obésogène des polyphénols qui est étudié (Scalbert *et al.*, 2005). De plus, comme ils sont connus pour leur affinité envers les protéines, notamment leur propriété précipitatrice de ces dernières, ils possèdent un bon potentiel inhibiteur d'enzyme (Haslam, 1996). Les composés ayant démontré des propriétés inhibitrices de la lipase pancréatique par des études antérieures sont les acides féruliques, coumariques, cafféiques et benzoïques, les quercétines, lutéolines et catéchines, ainsi que les tannins (Moore *et al.*, 1946 ; Sergent *et al.*, 2012).

1.10 Objectifs du mémoire

Le présent mémoire fait partie d'un plus grand projet, appuyé par une équipe multidisciplinaire, qui cherche des traitements efficaces pour l'obésité et le diabète de type 2 en recourant à la médecine traditionnelle. Afin d'ajouter des connaissances sur les propriétés médicinales antidiabétiques de certaines plantes ciblées, une évaluation de l'effet de 33 espèces végétales sur l'activité de la lipase pancréatique est réalisée par des bioessais *in vitro*. Deux objectifs feront l'objet du présent manuscrit.

Objectif 1 : Évaluer l'effet de 33 espèces végétales sur l'activité de la lipase pancréatique *in vitro*.

Objectif 2 : Identifier des composés clés phénoliques des extraits végétaux par HPLC, puis déterminer le ou les composés phytochimiques les plus susceptibles d'être responsables des activités inhibitrices de la lipase pancréatique.

Hypothèses : La majorité des espèces qui ont été sélectionnées selon une approche ethnobotanique concernant le DT2 démontreront des activités inhibitrices sur la lipase pancréatique *in vitro*, à efficacités variées. En général, on s'attend à ce que les valeurs d'inhibition médianes (IC_{50}) soient moins efficaces que celle de l'Orlistat, utilisé comme contrôle positif. Cependant, il est possible que des inhibitions maximales plus élevées que celle du contrôle soient observées chez certaines espèces actives. De plus, on s'attend à des activités moins efficaces, quoique toujours existantes, pour le groupe de baies évaluées, puisque ces dernières espèces végétales n'ont pas été sélectionnées selon une approche ethnobotanique concernant le DT2. Enfin, les espèces les plus efficaces dans l'inhibition de la lipase pancréatique présenteront des composés phénoliques communs.

1.11 Méthodes et approches

Afin d'identifier les espèces végétales susceptibles d'exprimer le plus grand potentiel d'activité antidiabétique, l'équipe CIHR-ÉMAAD a mise sur pied une approche ethnobotanique innovante (Leduc *et al.*, 2006). Quinze symptômes (et/ou complications) du DT2 ont été sélectionnés en collaboration avec des professionnels cliniciens et chercheurs qui ont ensuite attribué des valeurs d'importance relative pour chacun de ces symptômes par rapport à la maladie. Par exemple, un symptôme tel que la guérison lente d'infections aurait une valeur d'importance relative au DT2 plus grande qu'un symptôme comme des maux de tête fréquents (moins étroitement associé au DT2). Une fois ces valeurs attribuées aux symptômes, des entrevues avec 34 aînés de la communauté CEI de Mistissini ont été effectuées par les ethnobotanistes. Ils ont tenté d'élucider quelles espèces médicinales étaient traditionnellement utilisées pour le traitement de ces 15 symptômes. Les résultats ont été utilisés pour prioriser les espèces avec lesquelles entamer les différentes études pharmacologiques, en tenant compte de trois paramètres principaux : (1) le nombre de symptômes différents pour lesquels une espèce était citée, (2) la fréquence de citation d'une espèce par différents aînés et (3) l'importance relative des symptômes pour lesquels une espèce était citée. En insérant ces trois paramètres dans un calcul, il a été possible d'attribuer une valeur d'importance syndromique (SIV) pour chaque espèce. Une plus grande valeur de SIV indiquerait qu'une espèce aurait un plus grand potentiel de posséder des propriétés antidiabétiques qu'une espèce à plus faible SIV.

Avec cette approche, l'équipe IRSC-ÉMAAD a pu identifier plus de 50 espèces végétales de la pharmacopée CEI de Mistissini ayant un potentiel antidiabétique, mais se sont concentrés sur 17 avec lesquelles amorcer leurs recherches. La majorité de ces espèces font partie de la famille des Ericaceae et des Pinaceae. Quoique peu d'études avaient été effectuées sur la pharmacologie et la phytochimie de la majorité de ces espèces, certaines d'entre elles étaient déjà reconnues pour leurs bienfaits sur la santé. Voici un tableau qui rassemble les résultats de cette étude.

Tableau 1.1 Liste en ordre alphabétique des plantes médicinales antidiabétiques de la pharmacopée CEI sélectionnées selon une approche ethnobotanique

Espèce	Abréviation	Nom commun	Nom Cri	Famille	Organe	Approche ethnobotanique		
						Source	Rang	SIV
<i>Abies balsamea</i>	<i>A. balsamea</i>	Sapin baumier	Innasht	Pinaceae	Écorce interne	M	8	0,254
<i>Alnus incana</i> subsp. <i>rugosa</i>	<i>A. incana</i>	Aulne rugueux	Atushpi	Betulaceae	Écorce interne	M	11	0,163
<i>Gaultheria hispidula</i>	<i>G. hispidula</i>	Petit thé	Pieuminaan	Ericaceae	Feuilles	M	17	0,040
<i>Juniperus communis</i>	<i>J. communis</i>	Genévrier commun	Kakachiiminatuk	Cupressaceae	Baies	W	4	0,353
<i>Kalmia angustifolia</i>	<i>K. angustifolia</i>	Kalmia à feuilles étroites	Uishichipukw	Ericaceae	Feuilles	M,W	9	0,247
<i>Larix laricina</i>	<i>L. laricina</i>	Mélèze laricin	Watnagan	Pinaceae	Écorce interne	M,W	3	0,409
<i>Lycopodium clavatum</i>	<i>L. clavatum</i>	Lycopode claviforme	Pashtnahoagin	Lycopodiaceae	Plante entière	M	15	0,088
<i>Picea glauca</i>	<i>P. glauca</i>	Épinette blanche	Minhikw	Pinaceae	Aiguilles	M,W	6	0,275
<i>Picea mariana</i>	<i>P. mariana</i>	Épinette noire	Innahtikw	Pinaceae	Cones	M,W	5	0,347
<i>Pinus banksiana</i>	<i>P. banksiana</i>	Pin gris	Ushchishk	Pinaceae	Cones	M,W	14	0,088
<i>Populus balsamifera</i>	<i>P. balsamifera</i>	Peuplier baumier	Mash-mitus	Salicaceae	Écorce interne	M	16	0,049
<i>Rhododendron groenlandicum</i>	<i>R. groenlandicum</i>	Thé du Labrador	Kachichepukw	Ericaceae	Feuilles	M,W	2	0,507
<i>Rhododendron tomentosum</i>	<i>R. tomentosum</i>	Petit thé du Labrador	Weeshichbuksh	Ericaceae	Feuilles	W	1	0,656
<i>Salix planifolia</i>	<i>S. planifolia</i>	Saule à feuilles planes	Pieuatikw	Salicaceae	Écorce interne	M,W	10	0,188
<i>Sarracenia purpurea</i>	<i>S. purpurea</i>	Sarracénie pourpre	Ayigadash	Sarraceniaceae	Plante entière	M	13	0,092
<i>Sorbus decora</i>	<i>S. decora</i>	Sorbier plaisant	Mushkuminanatikw	Rosaceae	Écorce interne	M,W	7	0,262
<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	<i>V. vitis-idaea</i>	Airelle rouge	Wishichimna	Ericaceae	Baies	M,W	12	0,112

* SIV : valeur d'importance syndromique ; M : Mistissini ; W : Whapmagoostui. Les rangs sont basés sur les valeurs de SIV calculées selon Leduc et al. (2006)

La même approche a été utilisée pour identifier les plantes médicinales antidiabétiques qui appartiennent cette fois à la pharmacopée urbaine de Niamey du Niger. Cette étude a été réalisée par Mme Chantale Falardeau dans le contexte de son projet de maîtrise sur l'ethnobotanique au Niger pour le traitement du DT2. Les résultats de cette étude sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 1.2 Liste en ordre alphabétique des plantes médicinales antidiabétiques de la pharmacopée urbaine de Niamey sélectionnées selon une approche ethnobotanique

Espèce	Nom local zarma	Famille	Approche Ethnobotanique
			SIV
<i>Acacia nilotica</i>	bân, baani, jitti, jetti	Fabaceae	0,025
<i>Balanites aegyptica</i>	garbey	Zygophylliaceae	0,018
<i>Bauhinia rufescens</i>	nammary, namâli	Fabaceae	0,033
<i>Cassia occidentalis</i>	sanga-sanga, chinchiliba	Fabaceae	0,018
<i>Cassia sieberiana</i>	sisan, sinesan	Fabaceae	0,016
<i>Combretum micranthum</i>	kubu, kubu-nya, tingilé	Combretaceae	0,023
<i>Guiera senegalensis</i>	sabara	Combretaceae	0,025
<i>Leptadenia hastata</i>	hanam, dûlé	Asclepiadiaceae	0,016
<i>Piliostigma reticulatum</i>	kosorey (l'arbre) kosey (le fruit)	Fabaceae	0,034

Les baies, quant à elles, sont reconnues pour leur haute teneur en polyphénols. En effet, les polyphénols contribuent à la couleur et l'astringence d'un aliment ; c'est-à-dire, plus l'organe est foncé (bourgogne, bleu, mauve) ou astringent, plus son contenu en polyphénols devrait être élevé. Dernièrement, la communauté scientifique s'est tournée vers les effets bénéfiques variés qu'offre la consommation de baies dans la diète quotidienne (Fuldner Kraft, 2010 ; Seeram, 2008). Les polyphénols généralement retrouvés chez les baies sont les flavonoïdes, les tannins, les stilbènes et les acides phénoliques. Elles sont connues davantage pour leur pouvoir antioxydant, mais récemment la communauté scientifique se questionne sur les autres propriétés médicinales que peuvent offrir ces petits fruits. McDougall *et al.* (2009) se sont penchés sur les habiletés des polyphénols retrouvés chez les baies pour inhiber la lipase pancréatique *in vitro*. Leurs études ont démontré une activité inhibitrice de la lipase pancréatique par certaines baies. Ils suggèrent que la présence d'ellagitannins ou de

proanthocyanidines serait importante pour une activité inhibitrice de la lipase. Le présent mémoire inclura l'étude *in vitro* de l'inhibition de la lipase pancréatique par sept baies retrouvées sur le territoire québécois présentées dans le tableau 1.3.

Tableau 1.3 Liste des baies québécoises à l'étude pour l'inhibition de la lipase pancréatique

Espèce	Famille	Organe étudié	Nom commun du fruit
<i>Rubus chamaemorus</i>	Rosaceae	Fruit	Chicouté
<i>Amelanchier canadensis</i>	Rosaceae	Fruit	Amélanche
<i>Sambucus canadensis</i>	Caprifoliaceae	Fruit	Sureau
<i>Ribes glandulosum</i>	Grossulariaceae	Fruit	Groseille
<i>Ribes triste</i>	Grossulariaceae	Fruit	Gadellier
<i>Rosa canina</i>	Rosaceae	Fruit	Églantier
<i>Rubus arcticus</i>	Rosaceae	Fruit	Framboise arctique

Ce travail inclura également une présentation des composés phénoliques présents chez les espèces étudiées. La caractérisation phytochimique des espèces antidiabétiques de la communauté CEI a été réalisée par le laboratoire du Dr. Arnason à l'Université d'Ottawa (Harbilas *et al.*, 2009 ; Spoor *et al.*, 2006) et le présent travail s'inspirera de leurs méthodes pour effectuer la caractérisation phytochimique des espèces antidiabétiques de la communauté de Niamey et des baies québécoises.

Chapitre 2

Apport original

Ce manuscrit présente une étude que j'ai entièrement exécutée, analysée et rédigée sous forme d'article scientifique. Mon nom figure donc en tant que première auteure. Les co-auteurs mentionnés représentent mes directeurs de recherche. Ayant dirigé mes expériences et interprétations, ils ont contribué à l'élaboration du manuscrit.

An *in vitro* pancreatic lipase inhibition study of 17 antidiabetic medicinal plants from the Eeyou Istchee (Eastern James Bay Cree) traditional pharmacopoeia

Mia Auger¹, Pierre S. Haddad² and Alain Cuerrier^{1*}

1. Institut de recherche en biologie végétale, Jardin botanique de Montréal, Université de Montréal, 4101 Sherbrooke Est, Montréal, QC, H1X 2B2, Canada.

2. Département de pharmacologie et physiologie, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Downtown Station, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada.

*Corresponding author

2.1 Abstract

Background: Although calories are an important part of nutrition, their over-consumption has led to a worldwide epidemic of obesity and metabolic diseases. The inhibition of the digestion of dietary lipids is an appropriate target for the treatment of obesity. The purpose of this work is to study the potential pancreatic lipase inhibitory activity of seventeen Boreal forest medicinal plants stemming from Eeyou Istchee traditional pharmacopoeia and previously identified as expressing antidiabetic actions.

Methods: The seventeen plants' ethanolic extracts were assessed with an *in vitro* spectrophotometric assay using porcine pancreatic lipase and p-Nitrophenyl laurate as substrate. Dose response curves were obtained and orlistat served as a positive control.

Results: Whereas almost all the species had an inhibitory effect at a given concentration, three extracts consistently and markedly inhibited pancreatic lipase: *Kalmia angustifolia*, *Gaultheria hispidula* and *Rhododendron groenlandicum*. Quercetin glycosides and catechins represent identified phenolics that are common to the active species.

Conclusions: Three leaf extracts of the Ericaceae family and of the Eeyou Istchee traditional pharmacopoeia with demonstrated antidiabetic potential inhibited pancreatic lipase *in vitro*. This study adds an additional possible mechanism of action to

the promising effectiveness of Boreal forest medicinal plants traditionally recommended for diabetes symptoms by Eeyouch pharmacopoeia.

Key words: *pancreatic lipase, medicinal plants, Eeyou Istchee, obesity, diabetes.*

2.1.1 Résumé

Introduction : Bien que les calories constituent une part importante de la nutrition, leur surconsommation a entraîné une épidémie mondiale d'obésité et de maladies métaboliques. L'inhibition de la digestion des lipides alimentaires est une cible appropriée pour le traitement de l'obésité. L'objectif de ce travail est d'étudier l'activité inhibitrice de la lipase pancréatique de 17 plantes médicinales de la forêt boréale issues de la pharmacopée traditionnelle d'Eeyou Istchee et précédemment identifiées comme exprimant des actions antidiabétiques.

Méthodes: Les extraits éthanoliques des dix-sept plantes ont été évalués avec un bioessai spectrophotométrique *in vitro* en utilisant une lipase pancréatique porcine et le p-Nitrophényle laurate comme substrat. Des courbes dose-réponse ont été obtenues et l'orlistat a servi de contrôle positif.

Résultats: Alors que presque toutes les espèces avaient un effet inhibiteur à concentration donnée, trois extraits inhibaient la lipase pancréatique de manière constante et importante : *Kalmia angustifolia*, *Gaultheria hispidula* et *Rhododendron groenlandicum*. Les quercétines glycosides et les catéchines représentent des composés phénoliques identifiés qui sont communs aux espèces actives.

Conclusions: Les extraits de trois feuilles de la famille des Ericaceae et de la pharmacopée traditionnelle d'Eeyou Istchee au potentiel antidiabétique démontré ont inhibé la lipase pancréatique *in vitro*. Cette étude ajoute possiblement un mécanisme d'action supplémentaire à l'efficacité prometteuse des plantes médicinales de la forêt boréale traditionnellement recommandées pour les symptômes du diabète par la pharmacopée Eeyouch.

Mots-clés : *lipase pancréatique, plantes médicinales, Eeyou Istchee, obésité, diabète.*

2.2 Introduction

Rapid advances in hygiene, agriculture, therapeutics and technology have helped significantly reduce or overcome many life threatening situations, notably infectious diseases and undernourishment. In parallel, certain lifestyle modifications associated with technological progress have led to the emergence of other life threatening conditions, notably cardiometabolic ones such as the metabolic syndrome, obesity, type 2 diabetes (T2D) and cardiovascular diseases. These preventable conditions have now spread worldwide to epidemic proportions, although they disproportionately affect certain populations (Ogurtsova *et al.*, 2017; Popkin *et al.*, 2012; Zimmet *et al.*, 2001). As seen with many Indigenous populations around the globe, the Cree of Eeyou Istchee (CEI; Eastern James Bay Cree) are markedly affected by T2D (21% of population) and obesity (38% of population). The marked affection of this population can be related to a great extent to the rapid changes in environmental factors such as sedentary lifestyles and non-traditional diets, and exacerbated by culturally inappropriate modern pharmaceutical treatments leading to non compliance with drug prescription (Boston *et al.*, 1997; Dannenbaum *et al.*, 2008; Haman *et al.*, 2010; Robinson, 1988). T2D is defined by the inadequate regulation of lipid, carbohydrate and protein metabolism arising from impaired insulin secretion and action. Both causes and complications of T2D are strongly related to those of the metabolic syndrome, which notably includes obesity (American Diabetes Association, 2014; Colagiuri, 2010). In this regard, targeting the long-term prevention and management of obesity has proven appropriate for the mitigation of the metabolic syndrome and the treatment of T2D (Dandona *et al.*, 2005). Treatments for obesity can be found in many different forms. Although the most efficient one consists of modifying habits and lifestyle, preferred treatments often include oral pharmaceuticals that target the decrease of caloric intake, or the increase of caloric

expense. These treatment pathways include the inhibition of digestive enzymes, such as gastric and pancreatic lipases (Birari et Bhutani, 2007).

In an attempt to promote culturally relevant approaches for the prevention and management of T2D among Canadian Indigenous populations, the Canadian Institutes of Health Research Team in Aboriginal Antidiabetics Medicines (CIHR-TAAM) was created in 2003. Since then, 17 plant species from the James Bay Cree traditional pharmacopoeia were identified through ethnobotanical surveys for their antidiabetic potential (Leduc *et al.*, 2006). Their extracts have been tested using a comprehensive platform of bioassays, animal models and phytochemicals analyses to scientifically document the plants' antidiabetic properties (Eid *et al.*, 2014; Eid et Haddad, 2014; Fraser *et al.*, 2007; Haddad *et al.*, 2012; Harbilas *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018; Spoor *et al.*, 2006; Tam *et al.*, 2009; Saleem *et al.*, 2010).

In the present study, in order to assess an additional antidiabetic property among this group of plants, extracts prepared from the same 17 plant species of the CEI traditional pharmacopoeia were tested in an *in vitro* bioassay designed to measure their ability to inhibit pancreatic lipase. Pancreatic lipase is a digestive enzyme produced by the exocrine pancreas and secreted in the duodenum, where it hydrolyses over half of dietary triglycerides into bioavailable forms such as free fatty acids and monoacylglycerols (Birari et Bhutani, 2007; Mukherjee, 2003). Hence, an inhibition of the enzyme results in a marked reduction in the luminal digestion and, consequently, in the intestinal absorption of lipids, causing the direct passage of up to half of dietary fats to the feces. Since dietary fats are the major source of contemporary excess caloric intake, reducing them by the inhibition of pancreatic lipase becomes an important strategy in the treatment of obesity (de la Garza *et al.*, 2011; Lunagariya *et al.*, 2014). Orlistat, or tetrahydrolipstatin, is one of the only available drugs for the long-term treatment of obesity. It irreversibly and efficiently inhibits both gastric and pancreatic lipases, yet also often causes gastrointestinal side effects (McNeely et Benfield, 1998; Padwal et Majumdar, 2007). It therefore seemed fit to test the previously identified Boreal forest

CEI antidiabetic plant species for their ability to inhibit pancreatic lipase *in vitro* and to relate this to their established phytochemical composition (Harbilas *et al.*, 2009; Spoor *et al.*, 2006).

2.3 Material and Methods

2.3.1 Plant extraction

Samples of the seventeen plants identified in **Table 2.1** were harvested in the Eastern James Bay region of Quebec, Canada, following instructions given by CEI Elders, as described by Spoor *et al.* (2006) and Harbilas *et al.* (2009) and the species were identified by Dr. A. Cuerrier. Specimen vouchers were preserved at University of Montreal's Marie-Victorin herbarium, located at the Montreal Botanical Garden, Quebec (Leduc *et al.* 2006). Traditionally used plant organs (listed in **Table 2.1**) were then extracted with 80% aqueous ethanol, lyophilized and analyzed for phytochemical markers, as described by Spoor *et al.* (2006).

2.3.2 *In vitro* pancreatic lipase assay

The assay was prepared according to Cai *et al.* (2012), with some modifications. Briefly, type 2 porcine pancreatic lipase (Sigma, product L3126-25G, 30-90 U/mg protein) was dissolved in ultrapure water at 5 mg/mL and then centrifuged at 10 000 g for 5 minutes; supernatant was preserved. The reaction solution was composed of 100 mM Tris-base buffer (pH 8.2) to which was added the reaction substrate *p*-Nitrophenyl laurate (pNP laurate, Sigma product 61716-1G) at a final concentration of 0.1 mM. Stock solution of 0.28 mM pNP laurate was dissolved in 5 mM sodium acetate (pH 5.0) with 1% Triton X-100, heated in boiling water to help dissolution and stored at room temperature for further use. All crude ethanol plant extracts were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) then diluted in series in DMSO to the indicated concentrations. Using 96-well plates, each well contained 89.3 μ L of reaction solution, 17.9 μ L of a plant extract to achieve the given final concentration and 53.6 μ L of lipase (added last to start reaction). The negative control contained 17.9 μ L of DMSO instead plant extract

whereas the positive control contained sufficient Orlistat™ (Alfa Aesar product J62999, Ward Hill, Massachusetts) to achieve a final concentration of 40 µg/mL. Blank controls were also run in each assay, which contained ultrapure water instead of lipase and their optical density were subtracted from all values prior to data analysis. Each 96-well plate was then incubated at 37°C for one hour, and each well's optical density was read at 400 nm with a tunable microplate reader (Versa Max spectrophotometer, Molecular Devices, San Jose, California). All samples were tested in triplicate. The results are expressed as percentage (%) inhibition of lipase activity, where O.D is optical density:

$$\% \text{ inhibition} = (\text{O.D}_{\text{control}} - \text{O.D}_{\text{sample}}) / \text{O.D}_{\text{control}} \times 100\%.$$

2.3.4 Data and statistical analysis

The results were expressed as the mean values \pm standard error for measurements at each extract/Orlistat concentration. The data were analyzed for variance homogeneity using Bartlett's test ($p > 0.05$). Data were also analyzed by one-way ANOVA and post-hoc Tukey's test was used for significance of difference ($p < 0.05$). Half maximal inhibitory concentration and maximal effective values were determined by fitting a four parameter log-logistic regression curve to the data with the Dose-Response Analysis (Ritz *et al.*, 2015) using R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

2.4 Results

2.4.1 Inhibition of lipase by ethanolic extracts of antidiabetic plants from CEI pharmacopoeia

Six concentrations of each of the seventeen dry plant extracts were prepared and tested against pancreatic lipase *in vitro* to assess their ability to inhibit the enzyme. Dose-response curves were subsequently obtained and half maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) determined for each species, as well as maximal inhibitory activities (I_{max}) as seen in **Table 2.2**. Since a limited number of species actually enhanced lipase activity, half maximal effective concentrations (EC_{50}) were also determined. These values were obtained by fitting a dose response four parametric log-logistic curve to the

data of six concentrations per species. IC_{50} and I_{max} values are therefore projected upon the fitted curve designed for interpreting the response of an enzyme to a biological molecule. The pharmacological drug Orlistat was also tested in an identical manner and an IC_{50} of 29 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was obtained as a positive control reference.

The majority of the 17 species could inhibit the pancreatic lipase *in vitro* at some concentration, while two species were actually found to reproducibly activate the enzyme. *K. angustifolia* and *G. hispidula* represent the most potent active species inhibiting pancreatic lipase activity, with IC_{50} s of 264 and 92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively. These results show weaker, but comparable activity with the positive control Orlistat, that showed an IC_{50} of 29 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Species yielding the highest maximal inhibitory effects (I_{max}) are *K. angustifolia*, *R. groenlandicum* and *V. vitis-idaea*, with I_{max} s of 312, 2223 and 601% inhibition respectively. Being projected values, these maximal inhibitory effects were never observed, but rather represent evaluated powerful effectiveness. Two species (*J. communis* and *R. tomentosum*) yielded biphasic responses; activating lipase activity at low concentrations and inhibiting the same at higher ones. Other Boreal forest species, including *V. vitis-idaea*, *A. incana* subsp. *rugosa*, *S. decora*, *P. balsamifera* and *P. glauca*, yielded higher IC_{50} s and lower I_{max} s reflecting weaker activities against lipase. Three species were found to actually enhance pancreatic lipase activity *in vitro*; two more weakly (*A. balsamea* and *P. banksiana*) and one quite potently (*P. mariana*; EC_{50} of 114 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

2.4.2 Inhibition of lipase by plant extracts of various concentrations

The 12 species that have shown a significant inhibitory activity towards pancreatic lipase are presented in **Figure 2.1** and **Figure 2.2**. Data were connected with lines in order to help visualise the dose response curve's aspect. They represent the change in pancreatic lipase's activity compared to its basal catalytic rate in the presence of different samples, each of increasing concentrations.

Tested in this bioassay as a positive control alongside the antidiabetic plant species, Orlistat is represented in **Figure 2.1** by the dotted line. Lipase inhibition is important (27% of lipase's activity inhibited) at Orlistat's lowest tested concentration

(12.5 µg/mL) and the lipase's activity decreases at an inverse logarithmic rate depending on increasing sample concentrations, attaining a plateau when pancreatic lipase's activity is inhibited by about 80%. *K.angustifolia* inhibits pancreatic lipase *in vitro* at an increasing rate with increasing concentrations of the plant's extract, in a similar way as Orlistat. Lowest tested concentrations inhibited lipase up to 52% at 100 µg/mL. At two highest tested concentrations, the extract showed inconstant elevated inhibition values and were therefore eliminated from graph. The highest tested concentration of *R.groenlandicum* also showed inconstant elevated inhibitory activity and was also eliminated. *G.hispidula* showed a lipase inhibition kinetic similar to Orlistat's kinetic, i.e., of logarithmic appearance. Seven other extracts had an inhibitory effect on pancreatic lipase of lower effect, although *P.glauca* was the only extract to show a higher inhibitory activity than positive control at its highest tested concentration.

In **Figure 2.2**, we include the species that showed bi-phasic inhibitory responses towards pancreatic lipase (*J. communis* and *R. tomentosum*). *R.tomentosum* showed an inhibitory activity of higher effectiveness than positive control at sample concentration of 200 µg/mL, although seemingly weakly activated pancreatic lipase at very low sample concentrations (<100 µg/mL). At 400µg/mL, the extract showed inconstant elevated inhibitory activity and was eliminated from graph. *J.communis* extracts had an activating effect on pancreatic lipase at lowest tested concentrations, but inhibited lipase at its two highest tested concentrations.

2.5 Discussion

Although the causes of obesity and T2D are multiple and heterogeneous, it is extensively accepted that the accessibility and over-consumption of dietary fats are significant environmental contributors to the rising epidemics by increasing obesity, therefore indirectly increasing T2D (Little *et al.*, 2007). Digestion of dietary fats can be reduced by the inhibition of pancreatic lipase, which is one of the mechanisms studied for the determination of potentially effective products as a treatment for obesity (Birari *et Bhutani*, 2007). Among natural products that have an inhibitory effect on pancreatic

lipase, there is an interest for products originated from plants for their fewer side effects, their availability and economical value, their often plural medicinal activities and in some cases their cultural appropriateness as treatment (Boston *et al.*, 1997). This study aims to evaluate of the inhibitory effects on pancreatic lipase of 17 antidiabetic plants from the CEI pharmacopoeia.

The results show that the most effective extract in inhibiting pancreatic lipase *in vitro* was of the leaves of *Kalmia angustifolia*. The extract generated increasing inhibitory activity with increasing concentrations, significantly inhibiting pancreatic lipase at lowest tested concentration, inhibiting 5% to 52% of the enzyme. At its two highest tested concentrations, extracts of *K. angustifolia* leaves yielded optical density values lower than the enzyme blank assay, representing lipase inhibitory activity exceeding 100% inhibition. The optical density values also varied highly between assays at these highest concentrations. This important variation may be explained in part by the elevated optical density of highest evaluated concentrations of the plant extract. Being constantly measured at very high optical density values, the error on measured values may also be of greater importance. In addition, since the extract has demonstrated important lipase inhibitory activities, the interval of measured product of the enzymatic reaction at these high concentrations of extract is theoretically extremely low. In this situation again, slight variations may lead to important error values. Therefore, these values were eliminated from graph (**Figure 2.1**).

Fitted four parameter log-logistic dose response curve permitted calculation of IC_{50} and I_{max} values (see **Table 2.2**). Although, regression curves are forced to fit the data and sometimes falsely represent the raw results. It is notably the case when the curves are meant to represent the pharmacokinetic of a single molecule, when in fact many molecules are acting together; such is the case of plants. For example, in the case of *K. angustifolia*, the regressed curve indicated neither the lowest IC_{50} (264 $\mu\text{g}/\text{mL}$) nor the highest I_{max} (312 % inhibition), but the specie remains the most active one against lipase in tested concentrations when raw data are observed without the regression curve. Moreover, two other species showed significant inhibiting activities towards pancreatic

lipase as shown in **Figure 2.1**: *Gaultheria hispidula* and *Rhododendron groenlandicum* (both leaves). The first had the lowest calculated IC_{50} (92 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and the latter, the highest calculated I_{max} (2223 % inhibition), following fitting log-logistic dose response curves to the data. Therefore, the three most active extracts of this study were all from leaves of plant species from the Ericaceae family. Previous studies with the Cree Nation of Eeyou Istchee have shown that the Cree Elders interchangeably referred to morphologically similar plants, giving them the same name and usage (Rapinski, 2012). In the CEI community, *K.angustifolia* and *R.groenlandicum*, which are morphologically very similar, are also used similarly although *K.angustifolia* is believed to be stronger (Cignarella *et al.*, 1996 ; Rapinski, 2012); two affirmations that seem to correlate with the results of the present study. A study conducted by Cignarella *et al.* (1996) examined the lipid-lowering effects on rats of another leaf from the Ericaceae family that is also traditionally used for the treatment of diabetes: *Vaccinium myrtillus*. The study carried the conclusions that the constituents of the leaves may be useful for the treatment of dyslipidemia. However, *K.angustifolia* is well known for its toxicity, both in literature (Hill, 1986) and in the CEI community (Rapinski, 2012), and its use should remain undertaken with caution. In fact, a basic principle in toxicology credited to Paracelsus stipulates that all things are toxic and only the dosage makes it so they are non toxic. Plants of the Ericaceae family are not an exception as they are known to produce compounds that are toxic to human such as grayanotoxins (Koca and Koca, 2007). But generally, when a plant shows toxicity, it also often has a beneficial effect when it is consumed under its toxic dose. This principle is referred to in toxicology as hormesis, which can be summarized as opposite actions observed at opposite doses, and is very intertwined with the aforementioned toxicological principle from Paracelus. Both natural and human made compounds have shown to exert this type of effect on biological elements, be it enzymes or entire organisms (Calabrese and Baldwin, 2002).

Another example of hormesis is observed in the present study, where three studied species showed lipase inhibiting activities at high concentrations and show lipase activating activities at low concentrations (see **Figure 2.2**). This biphasic dose response

effect, where a low dose stimulates the enzyme and a high dose has an inhibitory effect on the enzyme, demonstrates another case of the hormetic response of the enzyme (Calabrese and Blain, 2009). Such responses can occur when two or more compounds in the plant are active towards pancreatic lipase – either inhibiting or enhancing its activity – and either the activities are not of the same potency, or compounds are present in different quantities for there to be a bi-phasic response from the pancreatic lipase. In fact, even significantly active *R.tomentosum*, the last Ericaceae leaf in the tested species, begets this type of bi-phasic dose response kinetic on lipase, which is why dosage is always very important to consider in multiple compound natural products such as medicinal plants.

The three species that have shown reproducible activating activities towards pancreatic lipase are *Abies balsamea*, *Picea mariana* and *Pinus banksiana*. The cones of *P.mariana*, who showed the strongest activating activity, could be further investigated for its pancreatic lipase activating abilities in the treatment of conditions such as lipid digestive disorders. Furthermore, the phenolic content of each extract of the seventeen antidiabetic medicinal plants from the CEI pharmacopoeia was previously assessed by Spoor *et al.* (2006) and Harbilas *et al.* (2009). Two phenolic compounds are common to the three Ericaceae leaf extracts that were most active in this study: catechins and quercetin glycosides (Harbilas *et al.*, 2009; Spoor *et al.*, 2006). Previous studies have shown, for both quercetin and catechin, pancreatic lipase inhibiting activities (Gonzalez-Castejon and Rodriguez-Casado, 2011). Although the inhibition activity could be the product of a synergistic activity among metabolites of singular extracts, other species known to have these compounds, in particular the leaves of species from the Ericaceae family, should be screened for pancreatic lipase inhibition. Mode of actions of either metabolite on pancreatic lipase inhibition or synergistic actions could also be further investigated, since studies have shown that synergistic effects on pancreatic lipase were observed when two or more polyphenols are combined (Cai *et al.*, 2012).

Finally, although the present study only assesses an *in vitro* inhibition of pancreatic lipase activity by the CEI antidiabetic plants, it serves as an additive research on the

antidiabetic properties of these plants. As a matter of fact, all 17 plant extracts studied in this work have been previously subject to an array of bioassays, complementary to the present assay, intended to document their antidiabetic properties mentioned by the CEI Elders (Harbilas *et al.*, 2009; Spoor *et al.*, 2006). Whether studies on the pancreatic inhibitory activity of these plants are extended or not, this work enhances the sense that antidiabetic medicinal plants of the CEI pharmacopoeia offer an integral treatment, not only for the plurality of their biomedically verified antidiabetic properties, but also because of the lifestyle habits that revolve around the integration of medicinal plants to a regular diet.

In conclusion, the results of the present study indicate that the ethanolic extract of leaves of *K. angustifolia*, *G. hispidula* and *R. groenlandicum*, three antidiabetic medicinal plants of the CEI pharmacopoeia that are of the Ericaceae family, have an inhibitory effect on pancreatic lipase *in vitro*, and quercetin glycosides and catechins are two identified metabolites common to the three species.

2.6 Acknowledgements

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 purpose 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. This work was supported by a Team Grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR Team in Aboriginal Antidiabetic Medicines) to P.S. Haddad and J.T. Arnason.

2.7 Tables and Figures

Table 2.1 List of the 17 CEI antidiabetic plant extracts evaluated in this study

Species	Common name	Cree name	Family	Studied organ
<i>Abies balsamea</i>	Balsam fir	Innasht	Pinaceae	Inner bark
<i>Alnus incana</i> subsp. <i>rugosa</i>	Speckled alder	Atushpi	Betulaceae	Inner bark
<i>Gaultheria hispidula</i>	Creeping snowberry	Pieuminaan	Ericaceae	Leaves
<i>Juniperus communis</i>	Ground juniper	Kakachiiminatuk	Cupressaceae	Berries
<i>Kalmia angustifolia</i>	Sheep laurel	Uishichipukw	Ericaceae	Leaves
<i>Larix laricina</i>	Tamarack	Watnagan	Pinaceae	Inner bark
<i>Lycopodium clavatum</i>	Common clubmoss	Pashtnahoagin	Lycopodiaceae	Whole plant
<i>Picea glauca</i>	White spruce	Minhikw	Pinaceae	Needles
<i>Picea mariana</i>	Black spruce	Innahtikw	Pinaceae	Cones
<i>Pinus banksiana</i>	Jack pine	Ushchishk	Pinaceae	Cones
<i>Populus balsamifera</i>	Balsam poplar	Mash-mitus	Salicaceae	Inner bark
<i>Rhododendron groenlandicum</i>	Labrador tea	Kachichepukw	Ericaceae	Leaves
<i>Rhododendron tomentosum</i>	Northern Labrador tea	Weeshichbuksh	Ericaceae	Leaves
<i>Salix planifolia</i>	Tealeaf willow	Pieuatikw	Salicaceae	Inner bark
<i>Saracenia purpurea</i>	Pitcher plant	Ayigadash	Sarraceniaceae	Whole plant
<i>Sorbus decora</i>	Showy mountain ash	Mushkuminanatikw	Rosaceae	Inner bark
<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	Mountain cranberry	Wishichimna	Ericaceae	Berries

Table 2.2 Values of inhibitory activity towards pancreatic lipase by the 17 antidiabetic medicinal plants from the Eeyouch pharmacopoeia and Orlistat

Species	IC ₅₀ (µg/mL)	I _{max} (% inhibition)	EC ₅₀ (µg/mL)	E _{max} (% activation)
<i>A. balsamea</i>	-	-	44	17
<i>A. incana</i> subsp. <i>rugosa</i>	245	75	-	-
<i>G. hispidula</i>	92	55	-	-
<i>J. communis</i>	211	45	-	-
<i>K. angustifolia</i>	264	312	-	-
<i>L. laricina</i>	881	138	-	-
<i>L. clavatum</i>	609	192	-	-
<i>P. glauca</i>	1233	139	-	-
<i>P. mariana</i>	-	-	114	728
<i>P. banksiana</i>	-	-	520	1775
<i>P. balsamifera</i>	197	50	-	-
<i>R. groenlandicum</i>	996	2223	-	-
<i>R. tomentosum</i>	199	148	-	-
<i>S. planifolia</i>	239	134	-	-
<i>S. purpurea</i>	429	39	-	-
<i>S. decora</i>	197	47	-	-
<i>V. vitis-idaea</i>	2416	602	-	-
Orlistat	29	90	-	-

* IC₅₀ = Half maximal inhibitory concentration; I_{max} = Maximal inhibitory effect; EC₅₀ = Half maximal activating concentration; E_{max} = Maximal activating effect

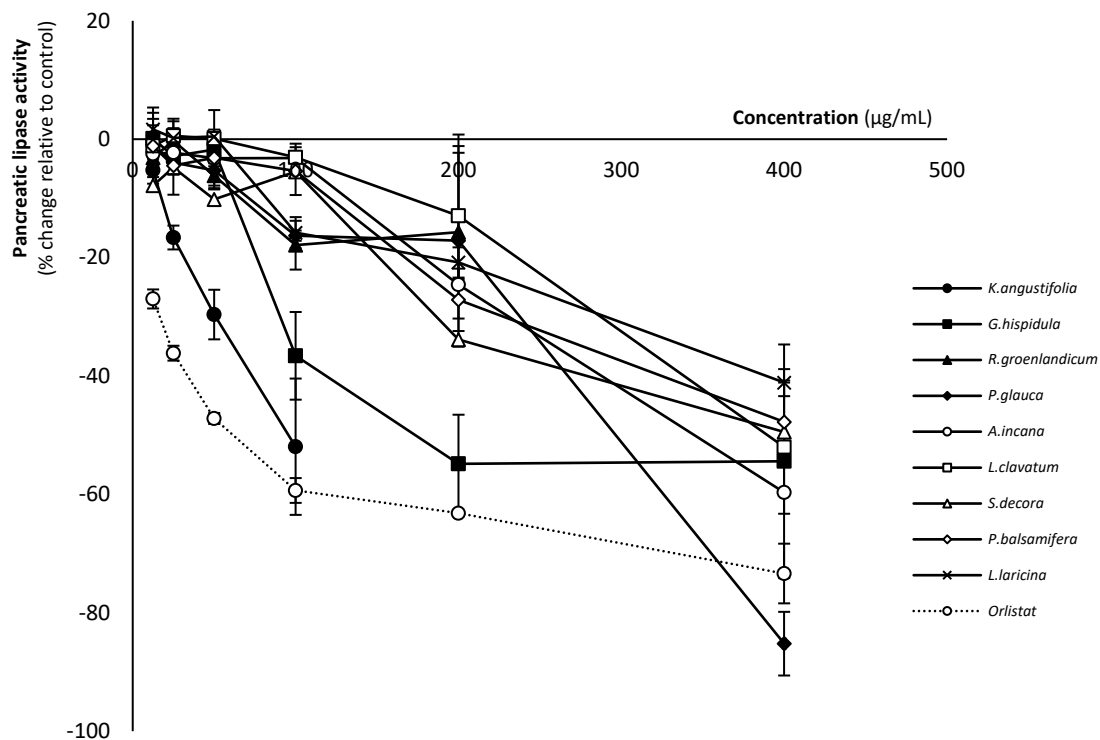


Figure 2.1 Inhibitory response of pancreatic lipase activity at increasing concentrations of extracts of most active antidiabetic plants from the CEI pharmacopoeia. Extracts that have shown significant inhibitory activity towards lipase were included in this graph. Data are expressed as the percent change in pancreatic lipase activity, where negative values indicate an inhibition of the enzyme's catalytic activity and positive values indicate an increase in the enzyme's catalytic activity compared to its basal rate. Orlistat was tested as a positive control. Values are expressed as the mean \pm SE (n=3).

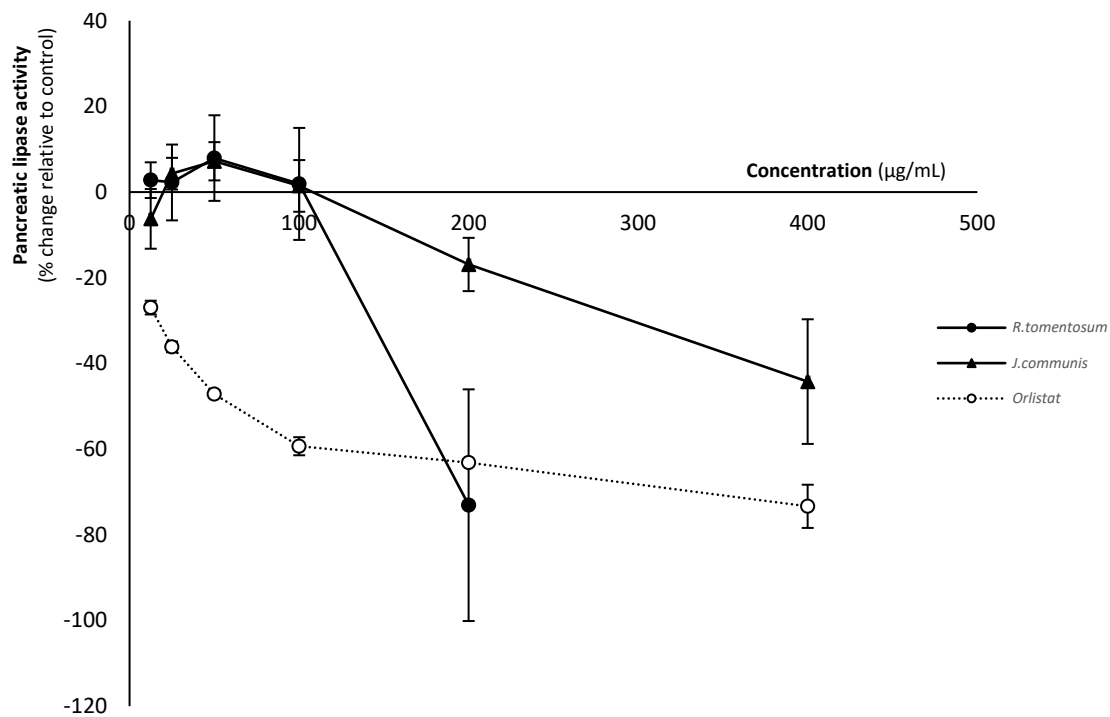


Figure 2.2. Bi-phasic inhibitory response of pancreatic lipase activity at increasing concentrations of extracts of active antidiabetic plants from the CEI pharmacopoeia. Extract that have shown bi-phasic response activity towards lipase were included in this graph. Data are expressed as the percent change in pancreatic lipase activity, where negative values indicate an inhibition of the enzyme's catalytic activity and positive values indicate an increase in the enzyme's catalytic activity compared to its basal rate. Orlistat was tested as a positive control. Values are expressed as the mean \pm SE (n=3).

Chapitre 3

Apport original

Ce manuscrit présente une étude que j'ai majoritairement exécutée, analysée et rédigée sous forme d'article scientifique. Mon nom figure donc en tant que première auteure. Le second auteur mentionné s'avère aussi être première auteure, puisque cette personne a contribué de façon importante à l'étude ethnobotanique présentée dans ce manuscrit. Son rôle fut de conduire l'étude ethnobotanique, procéder à la collecte des données, rédiger en partie l'introduction et participer à l'interprétation de ses résultats. Les autres co-auteurs mentionnés représentent mes directeurs de recherche. Ayant dirigé mes expériences et interprétations, ils ont contribué à l'élaboration du manuscrit.

An ethnobotanical study of antidiabetic medicinal plants used in Niamey (Niger) with an *in vitro* pancreatic lipase inhibition assay

Mia Auger^{1‡}, Chantale Falardeau^{1‡}, Pierre S. Haddad² and Alain Cuerrier^{1*}

1. Institut de recherche en biologie végétale, Jardin botanique de Montréal, Université de Montréal, 4101 Sherbrooke Est, Montréal, QC, H1X 2B2, Canada.

2. Department of Pharmacology and Physiology, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Downtown Station, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada.

‡ Both are first co-authors since they contributed equally to the paper.

*Corresponding author

3.1 Abstract

Background: The Nigerian population is markedly affected with type 2 diabetes (T2D), being more susceptible to metabolic imbalance for various environmental reasons. Medicinal plants not only offer multiple treatment pathways for these multifactorial diseases, but are also culturally relevant and remain the best alternative for the majority of the population living in such developing countries. This study aims at the identification of antidiabetic plants from Niamey through ethnobotanical surveys and species are screened for an *in vitro* evaluation of their pancreatic lipase inhibitory activity and phenolic compound identification.

Methods: Surveys were conducted in the urban community of Niamey to identify potential antidiabetic plants used within the traditional sub-Saharan pharmacopoeia, using a list of 15 symptoms in association with T2D. Nine selected species were extracted with aqueous ethanol and were assessed with an *in vitro* spectrophotometric assay using porcine pancreatic lipase and p-Nitrophenyl laurate as substrate. Dose-response curves were obtained and orlistat served as a positive control. Phenolic marker compounds were identified with a high-performance liquid chromatography method.

Results: A prioritized list of 31 antidiabetic plants was drawn from the ethnobotanical surveys and nine species were selected for further screening. *In vitro* pancreatic lipase inhibition assay revealed the strong activity of the bark of *Acacia nilotica*. Phytochemical

analysis allowed the identification of numerous phenolic markers, *p*-coumaric acid being common to all nine tested species. Catechin was identified only in the most active species against pancreatic lipase.

Conclusions: This study not only contributes to the enhancement of the general pharmacopoeia of Niamey, but also demonstrates the relevance of quantitative tools in ethnobotany for connecting the knowledge of traditional and modern medicine in the improvement of culturally suitable approaches. Furthermore, this work contributes to the documentation of promising antidiabetic effectiveness of traditionally recommended medicinal plants.

Key words: *Niger, Niamey, medicinal plants, ethnobotany, diabetes, pancreatic lipase, obesity, phytochemistry*

3.1.1 Résumé

Introduction : La population du Niger est nettement touchée par le diabète de type 2 (DT2), étant plus vulnérable au déséquilibre métabolique pour diverses raisons environnementales. Les plantes médicinales offrent non seulement de multiples voies de traitement pour ces maladies multifactorielles, mais elles sont également pertinentes sur le plan culturel et restent la meilleure alternative pour la majorité de la population vivant dans ces pays en développement. Cette étude vise à identifier les plantes antidiabétiques de Niamey au moyen d'enquêtes ethnobotaniques, puis neuf espèces sont sélectionnées pour une évaluation *in vitro* de leur activité inhibitrice de la lipase pancréatique et une identification de leurs composés phénoliques.

Méthodes: Les entrevues ont été menées dans la communauté urbaine de Niamey afin d'identifier les plantes potentiellement antidiabétiques utilisées dans la pharmacopée traditionnelle subsaharienne, à l'aide d'une liste de 15 symptômes associés au DT2. Neuf espèces sélectionnées ont été récoltées et extraites avec de l'éthanol aqueux et évaluées avec un bioessai spectrophotométrique *in vitro* en utilisant une lipase pancréatique porcine et le *p*-Nitrophényle laurate comme substrat. Des courbes dose-

réponse ont été obtenues et l'orlistat a servi de contrôle positif. Des composés marqueurs phénoliques ont été identifiés par une méthode de chromatographie liquide à haute performance.

Résultats: Une liste de 31 plantes antidiabétiques priorisées a été établie à partir des études ethnobotaniques et neuf espèces ont été sélectionnées pour un dépistage plus approfondi. Une évaluation de l'inhibition de la lipase pancréatique *in vitro* a révélé la forte activité de l'écorce d'*Acacia nilotica*. L'analyse phytochimique a permis d'identifier plusieurs composés phénoliques, l'acide *p*-coumarique étant commune aux neuf espèces évaluées. La catéchine n'a été identifiée que chez l'espèce la plus active contre la lipase pancréatique.

Conclusions: Cette étude contribue non seulement à l'accroissement de la pharmacopée générale de Niamey, mais démontre également la pertinence des outils quantitatifs de l'ethnobotanique pour relier les connaissances de la médecine traditionnelle et moderne à l'amélioration d'approches culturellement adaptées. De plus, ces travaux contribuent à documenter l'efficacité antidiabétique prometteuse des plantes médicinales traditionnellement recommandées.

Mots-clés : Niger, Niamey, plantes médicinales, ethnobotanique, diabète, lipase pancréatique, obésité, phytochimie

3.2 Introduction

The International Diabetes Federation (IDF, 2018) evaluated in 2011 that around 366 millions of people worldwide were affected by diabetes and that this number was expected to reach 552 million in 2030. Previously known as a rich country disease, the prevalence of new cases (80%) is now reaching epidemic proportions in low and middle-income countries. It could represent in these areas an increase of 150% over 25 years (IDF, 2018). Africa was identified as a region with great potential of experiencing this increase. Approximately 14.7 million people were diagnosed in 2011 and an estimated

344 000 people died from it. In Niger, a country from west Africa, 4.5% to 5% of the population are now diabetic (IDF, 2011).

Type 2 diabetes (T2D) is a metabolic disorder characterized by high blood glucose levels resulting from a deficiency in insulin signaling (Abo *et al.*, 2007). It is also thought to originate in response to constant elevated systemic glucose and lipid levels. Left untreated, it may lead to severe complications such as cardiovascular diseases, nephropathy, retinopathy and other metabolic diseases (Colagiuri, 2010). In developing countries like Niger, new trends in lifestyle emerged with the economic development and massive urban migration. The adoption of a more sedentary lifestyle and a diet rich in fat and sugar are factors likely to be responsible for the increase of obesity and T2D prevalence (IDF, 2018; WHO, 1994). African people's genetic predisposition may also contribute to their susceptibility of developing such diseases (Danadian *et al.*, 1999; Harris and *al.*, 1995; Neel, 1962). Considered the second poorest country in the world by the UNDP's Human Development Index (AfDB *et al.*, 2011), Niger has also one of the highest growth rates in the world (3,28%). The population has doubled in the past twenty years and is expected to rise over 50 million by 2050 (Jeune Afrique, 2012). At this rate, the evolution of T2D in the country is also likely to rise. While less than 1% of the global healthcare cost due to T2D was spent in the African region in 2011, it had the highest proportion of undiagnosed DM with 78% (IDF, 2018). There is a sense of emergency in acting towards finding solutions to alleviate this global burden, especially for the most affected communities.

The gain of interest for plant originated treatments for T2D is explainable by numerous factors, such as the high cost of synthetic drugs, their inaccessibility and the high risk of causing dangerous side effects. Furthermore, plant-based treatments often offer multiple benefits in addition to being nutritionally valuable and generally easily accessible and of low to no cost (Beran and Yudkin, 2006; Elavarasi and Saravanan, 2012). Actually, 80% of the African population relies on traditional medicine (TM) for their primary health care need (WHO, 2014). Not only plants are an important element of their cultural patrimony, but they also remain the best alternative for the majority of

the population living in developing countries (Inngjerdigen *et al.*, 2004; Heinrich, 2000). Therefore, investigation of the local pharmacopoeia may be part of the solution. Marles and Farnsworth (1995) have identified around 1200 antidiabetic plant species worldwide and historical records show that both India and China have been using medicinal plants for millennia to treat diabetes (Oubre *et al.*, 1997). The active properties of plants are undeniably attributable to the many phytochemicals that constitute them, like alkaloids, tannins and polyphenols (Bako *et al.*, 2005). Ethnobotanical approaches have shown to be effective for finding and investigating active molecules from medicinal plants (Fabricant and Farnsworth, 2000; Haddad *et al.*, 2012).

The African flora has been modestly studied and remains poorly recorded (Sawadogo, 2012). Niger is no exception and few articles on medicinal plants have been published to this day. To our knowledge, no study done in Niger has explored medicinal plants treating T2D. The first objective of this study is to identify traditional medicinal plants from the urban community of Niamey, Niger, that have potential antidiabetic properties. We report important medicinal plants used by the community of Niamey and, in doing so, we report new African plant species that are added to the general Sub-Saharan pharmacopoeia. For the second objective of this study, nine selected species from the Sub-Saharan antidiabetic pharmacopoeia are tested in an *in vitro* bioassay designed to measure their ability to inhibit pancreatic lipase. Pancreatic lipase is a digestive enzyme produced by the exocrine pancreas and secreted in the duodenum where it hydrolyses over half of dietary lipids into absorbable fatty acids (Mukherjee, 2003; Birari *et al.*, 2007). Hence, an inhibition of the enzyme can result in the non-absorption of up to half of ingested dietary fats, which then contributes to lowering systemic lipid levels (McNeely, 1999). Since dietary fats are the major source of unwanted caloric intake, reducing their intake by the inhibition of pancreatic lipase becomes an important strategy in the treatment of obesity. Considering that both causes and complications of obesity, T2D and metabolic syndrome are interrelated, targeting the long term treatment of obesity has also been proven appropriate for the

treatment of T2D and metabolic syndrome (Lunagariya and *al.*, 2014). The third objective of this study aims for the identification of phenolic compounds in the nine selected species using a high-performance liquid chromatography (HPLC) method. Comprehensively, this work will contribute to the edification of the general Sub-Saharan pharmacopoeia by the documentation of traditional knowledge, medicinal activity and metabolite composition of antidiabetic plant species.

3.3 Material and Methods

3.3.1 Study area

The Republic of Niger is a landlocked country in Western Africa (1 267 000 km²) sharing borders with 7 countries; Burkina Faso and Mali to the west, Chad to the east, Algeria and Libya to the north and Nigeria and Benin to the south (Auzias and Labourdette, 2004). Our study site was the capital district, Niamey (Latitude 13°31 N and Longitude 2°6 E, surface area of 255km²), located in the southeastern part of the country.

3.3.2 Geographic overview and vegetation types

Niamey is composed of 99 districts and villages distributed along 5 communes. It sits atop two plateaus reaching altitudes of 180m to 250m, which are divided by the Niger River. Most of the city development occurs on the left shore « rive gauche » which is harbouring communes I, II, III, IV. Commune V lies on the right shore « rive droite », also called « harobanda » in the Zarma dialect (Motcho, 1991). Lying in the southern Sahelian zone, the area has a semi-arid climate that can be divided in three main seasons; October to February, dry and cool, with temperature varying between 20°C and 35°C; March through May with a dry and hot season which is characterized by the dusty Harmattan wind (temperatures varying from 30°C to 45°C); and the rainy season (annual rainfall 350-600mm) lasting from June through September with temperature varying from 25°C to 30°C (Cullen, 2010). The vegetation covers of the lateritic plateaus surrounding Niamey is a patterned plant community known as the « tigerbush ». It can

be described as alternating bands of woody shrubs and trees (mostly Combretaceae and *Acacia* species), separated by bare ground or herbaceous covers (Geels, 2006). This original vegetation has however been almost completely decimated on a radius of 50km around the urban community of Niamey (Motcho, 1991).

3.3.3 Socio-economic setting

The population of Niger, estimated at 20 673 000 inhabitants in 2016 (WHO, 2019), is characterized by a diversity of ethnic groups. The majority of the population living in the arable lands of the south is mainly dominated by sedentary farmers; the Hausa 53%, the Zarma-Songha 21% and the Gourmantche. The rest of the population consists of nomadic or semi-nomadic livestock farmers and pastoralists; the Peul (Fulani) 7%, the Tuareg 11%, the Beri Beri (Kanuri) 6%, along with the Arab, and the Toubou, compiling together less than 2% (Ayantunde and *al.*, 2008; U.S. Department of State, 2012). The Peul are slowly adopting a more sedentary lifestyle and settling in permanent or semi-permanent villages where they combine livestock rearing with subsistence agriculture (Sop and *al.*, 2011). The Mawri and Goube are ethnic groups that settled down in the region by migratory or commercial wave and mixed up with the Zarma people therefore belonging to the Zarma-Songhay group (Fuglestad, 1983). Roughly 85% of the people subsist on rain-fed agriculture and livestock farming. Millet and sorghum, which are the main cereals harvested, contribute up to ninety percent of the villager's diet (Cullen, 2010). The Tuareg, the Beri Beri, the Arab and the Toubou were not included in this study since they were underrepresented in the study area.

3.3.4 Ethnobotanical surveys and selection of informants

Ethnobotanical data were collected during a field trip to Niamey in August 2009. Traditional healers (TH) and herbalists (H) were the main informants of the surveys. They came from twelve different administrative districts of the urban area of Niamey: Bobiel, Koira Tégui, Dar Eslam, Lazaret, and Boukoki on the left bank; Kirkissoye, Pont-Kennedy, Nogaré, Karadjé, Nielga, Lamordé and the "Harobanda" market on the right bank. The interviews and discussions were carried out in Zarma, Hausa, and Fulani with the help of four local translators. A total of 41 informants were interviewed from June

to August 2009. Informants were selected with the help of the local translators that were themselves TH. In most cases, appointments were made prior to visits, other times we spontaneously proposed the interview while wandering at the local market or in the neighborhood where herbal stall or signpost identifying TH were found. The survey was a semi-structured questionnaire based on the work from Leduc and *al.* (2006), conceived to gather information on the 15 symptoms of diabetes and its complications: (1) arthritis/rheumatism, (2) frequent headaches, (3) back and/or kidney pain, (4) diarrhea, (5) swelling and/or inflammation, (6) general weakness, (7) increased appetite, (8) heart and/or chest pain, (9) increased thirst, (10) abscesses and/or boils, (11) blurred vision, (12) increased urination, (13) foot numbness and/or foot sores, (14) slow healing infections, and (15) sore and/or swollen limbs. It was also designed to collect personal information about the informants and their traditional practice, as well as data on such as local names of the plants, symptoms treated by the plants, plants parts used and its modes of preparation and administration.

3.3.5 Plant collection

Field trips were made to different sites where TH normally collect plants they use as traditional medicines. One traditional healer was used as a guide to identify and collect plant voucher specimens in the field. Each specimen included parts such as leaves, stems, flowers and fruits whenever available. For small herbaceous plants, whole plants were collected. The plant material was dried in the shade and stored at room temperature until use. Voucher specimens were deposited at the Marie-Victorin herbarium (MT) at the Institut de recherche en biologie végétale (IRBV) of University of Montreal.

3.3.6 Study approval

Prior to the study, full ethical research approval was obtained through the University of Montreal's ethics committee « Comité d'éthique de la recherche de la Faculté des arts et des sciences » (CÉRFAS-2009-10-022). As well, prior to each interview, we fully informed the TH and H of the objectives of this study. In all cases, permission and written consent were obtained to take pictures and to publish the

information collected.

3.3.7 Quantitative ethnobotany

3.3.7.1 Ranking

In order to establish the rank of each species we calculated the frequency of citation (FC) as per Ladio and Lozada (2004) and the syndromic importance value (SIV) as per Leduc *et al.* (2006).

3.3.7.2 Syndromic importance value (SIV)

The SIV is an equation that calculates the relative antidiabetic importance for each species (Leduc *et al.*, 2006). It is based on three main parameters: (1) the number of different symptoms for which the plant was cited: (2) the frequency of citation by different traditional healers: and (3) the relative importance of symptoms for which the plant was cited. It is calculated as followed:

$$SIV = \frac{\left[\frac{\sum ws}{S} \right] + \left[\frac{\sum wf}{SF} \right]}{2} = \frac{\sum ws + \left[\frac{\sum wf}{F} \right]}{2S}$$

where: w is the weight of the symptom; s is the symptom contribution for the species; f is the frequency of citation for the species; S is the total number of symptoms used for the survey; F is the total number of interviewees. The weight of the symptom, w , is the degree of association converted to a number between 0 and 1, where $\sum w = 1$ (see **Table 3.1**). The symptom contribution s is either 1 or 0, based on the plant species being cited for the particular symptom or not, where $\sum s = S = 15$ in the case where the species is cited for all symptoms.

3.3.7.3 Informant consensus factor (F_{ic})

In order to evaluate the reliability of the information provided by the interviewee's regarding the treatment of a particular symptom, we calculated the factor of informant's consensus F_{ic} (Trotter and Logan, 1986; Heinrich *et al.*, 1998; Black *et al.*, 2008). It is calculated as followed: $F_{ic} = N_{ur} - N_t / (N_{ur} - 1)$ where N_{ur} is the number of use-reports for each symptom, and N_t is the number of taxa or species used for a particular symptom by all informants. Values of this factor range between 0 and 1, where values closer to "1" indicate a high degree of consensus and a well-defined

medicinal tradition (Heinrich *et al.*, 1998; Heinrich, 2000), meaning informants are exchanging information among each other, or that the information has been transmitted vertically for a long time (Gazzaneo *et al.*, 2005). All citations were placed into 15 symptoms related to diabetes as per Leduc *et al.* (2006).

3.3.8 Plant extraction

Specimens of the nine selected plant species identified in **Table 3.2** were collected and identified as described in section 3.5 (*Plant collection*) and were stored at the Marie-Victorin herbarium of University of Montreal, Quebec. Appropriate plant organs were dried in an electric food dehydrator at 35°C and stored in darkness at room temperature until extraction. Vegetal matter was cleaned and ground using a Wiley-Mill (40 mm mesh) and extracted twice in 80% aqueous ethanol (10mL ethanol per gram of dry matter) at room temperature with 24h of circular shaking at 200 rpm. The two ethanolic supernatants were recovered, vacuum filtered, pooled, centrifuged, dried under vacuum and lyophilized (Labconco, Lyph-lock 6 and FreeZone 4.5). The lyophilized extracts were then crushed into a fine powder and crude dry extracts were stored in darkness at -18°C until further use.

3.3.9 *In vitro* pancreatic lipase assay

The assay was prepared according to Cai *et al.* (2012), with some modifications. Briefly, type 2 porcine pancreatic lipase (Sigma, product L3126-25G, 30-90 U/mg protein) was dissolved in ultrapure water at 5 mg/mL and then centrifuged at 10 000 g for 5 minutes; supernatant was preserved. The reaction solution was composed of 100 mM Tris-base buffer (pH 8.2), to which was added the reaction substrate *p*-Nitrophenyl laurate (pNP laurate, Sigma product 61716-1G) at final concentration of 0,1 mM. Stock solution of 0,28 mM pNP laurate was dissolved in 5 mM sodium acetate (pH 5.0) with 1% Triton X-100, heated in boiling water to help dissolution and stored at room temperature for further use. All crude ethanol plant extracts were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) then diluted in series in DMSO to indicated concentrations. Using 96-well plates, each well contained 89.3 µL of reaction buffer and substrate solution, 17.9 µL of a plant extract to achieve the final given concentration and 53.6 µL of lipase

(added last to start reaction). The negative control contained 17.9 μL DMSO instead of plant extract whereas the positive control assay contained sufficient Orlistat™ (Alfa Aesar product J62999, Ward Hill, Massachusetts) to achieve a final concentration of 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Blank controls were also run in each assay, which contained ultrapure water instead of lipase and their optical density were subtracted from all values prior to data analysis. Each 96-well plate was then incubated at 37°C for one hour, and each well's optical density was read at 400 nm with a tunable microplate reader (Versa Max spectrophotometer, Molecular Devices, San Jose, California). All samples were tested in triplicate. The results are expressed as percentage (%) inhibition of lipase activity, where O.D is optical density:

$$\% \text{ inhibition} = (\text{O.D}_{\text{control}} - \text{O.D}_{\text{sample}}) / \text{O.D}_{\text{control}} \times 100\%.$$

3.3.10 HPLC characterization of plant extracts

3.3.10.1 Phenolic marker compounds

All solvents and materials were obtained according to Saleem *et al.* (2010). Chemical standards were selected after literature review and plant extracts were analysed alongside the following phenolic markers compounds: gallic acid, catechin, caffeic acid, epicatechin, cyanidin, p-coumaric acid, myricetin, quercetin and kaempferol.

3.3.10.2 HPLC method development

The method was prepared according to Saleem *et al.* (2010). In brief, the nine ethanolic dry plant extracts were reconstituted in 100% methanol at 10 mg/mL, centrifuged at 1000g for 15 minutes at room temperature and filtered through a 0.2 μm PTFE syringe filter (Chromatographic Specialties Inc.). Chromatographic method was developed on Agilent 1100 series HPLC-DAD (Agilent Technologies Inc., CA, USA), consisting of an auto sampler with a 100 μL built-in injection loop, a quaternary pump, a column thermostat compartment, a diode-array-detector and Chemstation Software. The best separation was achieved on LUNA C18 RP column, 150 mm x 2 mm, 3-micron particle size (Phenomenex Inc.). The column temperature was maintained at 50 °C and a 30-minute linear gradient of 10-100% acetonitrile in water at a flow rate of 0.4 mL/min

was applied. Final quantification was based on the area under the peak after applying appropriate integration parameters.

3.3.11 Data and statistical analysis

Statistical analyses were performed using the software package R version 3.3.3 for Mac OS X (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

3.3.11.1 Analysis of variance in lipase bioassay

The data are expressed as the mean values \pm standard error for measurements at each extract/Orlistat concentration. The data were analyzed for variance homogeneity using Bartlett's test ($p>0.05$). Data were also analyzed by one-way ANOVA and post-hoc Tukey's test was used for significance of difference ($p<0.05$). Half maximal inhibitory concentration and maximal effective values were determined by fitting a four parameter log-logistic regression curve to the data with the Dose-Response Analysis (Ritz *et al.*, 2015) using R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

3.4 Results

3.4.1 Species ranking

A total of 41 informants, male and female, comprising traditional healers, healer sorcerers, and herbalists were interviewed in Niamey in 2009. More than 180 plant species were cited in the interviews for the treatment of the diverse symptoms of diabetes. The SIV was used as a method of ranking the plants to compare their relative importance as a potential diabetes treatment. Considering the vast number of plant species named in these interviews, we concentrated on showing the top first thirty plants following SIV ranking as shown in **Table 3.3**. *Securidaca longepedunculata* was ranked no. 1 as potential treatment for diabetes. *Piliostigma reticulatum* ranked 2 (0.03353), *Bauhinia rufescens* ranked 3 (0.03349), *Acacia nilotica* ranked 6 (0.02531), *Guiera senegalensis* ranked 7 (0.02469), *Balanites aegyptiaca* ranked 11 (0.01764), *Cassia occidentalis* ranked 12 (0.01752), *Combretum micranthum* ranked 13 (0.01537), *Leptadenia hastata* ranked 28 (0.01049), and *Cassia sieberiana* ranked 29 (0.01048) (See **Table 3.3** and **Figure 3.1**). The last nine mentioned species were available for harvest

and were brought back to Montreal for being dried, extracted and evaluated for an *in vitro* pancreatic lipase inhibition assay.

3.4.2 Inhibition of pancreatic lipase by ethanolic extracts of nine antidiabetic plants from the pharmacopoeia of Niamey

Six concentrations of each of the nine dry plant extracts (see **Table 3.2**) were prepared and tested against pancreatic lipase *in vitro* to assess their ability to inhibit the enzyme. Dose-response curves were subsequently obtained and half maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) determined for each species, as well as maximal inhibitory activities (I_{max}) as seen in **Table 3.4**. Since a limited number of species actually enhanced lipase activity, half maximal effective concentrations (EC_{50}) were also determined. These values were obtained by fitting a dose response four parametric log-logistic curve to the data of six concentrations per species. IC_{50} and I_{max} values are therefore projected upon the fitted curve designed for interpreting the response of an enzyme to a biological molecule. The pharmacological drug Orlistat was also tested in an identical manner and an IC_{50} of 29 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was obtained as a positive control reference.

The majority of the nine species could inhibit the pancreatic lipase *in vitro* at some concentration, while three species were actually found to reproducibly activate the enzyme. *Acacia nilotica* and *Cassia sieberiana* represent the most potent active species inhibiting pancreatic lipase activity. Two species (*C. micranthum* and *L. hastata*) yielded biphasic responses; activating lipase at low concentrations and inhibiting the same at higher ones. Three species were found to actually enhance pancreatic lipase *in vitro*; *B. rufescens*, *G. senegalensis* and *P. reticulatum*, although the median yielded a biphasic response, inhibiting lipase at lowest tested concentrations.

3.4.3 Inhibition of lipase by plant extracts of various concentrations

The five species that have shown a significant inhibitory activity towards pancreatic lipase are presented in **Figure 3.2** and **Figure 3.3**. Dose response curves fitted to the data represent the change in pancreatic lipase's activity compared to its basal catalytic rate in the presence of different samples, each of increasing concentrations.

Tested in this bioassay as a positive control alongside the antidiabetic plant species, Orlistat is represented in **Figure 3.2** with a dotted line. Lipase inhibition is important (27% of lipase's activity inhibited) at Orlistat's lowest tested concentration (12.5 µg/mL) and the lipase's activity decreases at inverse logarithmic rate depending on increasing sample concentrations, attaining a plateau when pancreatic lipase's activity is inhibited at about 80%. *A. nilotica* inhibits pancreatic lipase *in vitro* at an increasing rate following increasing concentrations of the plant's extract. At the plant extract's lowest tested concentration (12.5 µg/mL), *A. nilotica* inhibits about 18% of the enzyme's activity. At concentrations higher than 25 µg/mL, *A. nilotica* inhibits pancreatic lipase with higher efficiency than Orlistat. At its highest tested concentration, the extract showed inconstant elevated inhibition value and was therefore eliminated from graph. *C. sieberiana* showed inhibitory activities against pancreatic lipase of lower efficacy than Orlistat for the four lowest tested concentrations, but exceeding the positive control's inhibitory activity at highest tested concentration (147% inhibition at 400 µg/mL extract). The highest tested concentration of *C. sieberiana* also showed inconstant elevated inhibitory activity and was also eliminated from graph.

In **Figure 3.3**, we include the species that showed bi-phasic inhibitory responses towards pancreatic lipase (*C. micranthum* and *L. hastata*). *C. micranthum* showed inhibitory activities mostly at extract concentrations higher than 200 µg/mL, while it activated pancreatic lipase at concentrations under 100 µg/mL. *L. hastata* showed inconstant elevated inhibitory activity at its highest tested concentration and value was therefore eliminated from graph.

3.4.4 HPLC identification of phenolic compounds in plant extracts

Plant ethanolic extracts were separated in a high-performance liquid chromatography (HPLC) column to identify phenolic marker compounds. Marker compounds were selected upon literature review and ran in the column before plant extracts. Phenolic compounds identified in antidiabetic plant extracts from Niamey are presented in **Table 3.5**. Additional compounds were identified via Chemstation library

phenolic compound matching, although match score were never over the 99% threshold.

3.5 Discussion

Obesity and T2D are worldwide spread diseases, disproportionately affecting particular populations that are environmentally and genetically more vulnerable to metabolic imbalance. In Niger, up to 5% of the population is diabetic and an increase in prevalence is expected in upcoming years (IDF, 2018). There is an increase in interest for natural treatments of diseases such as the use of medicinal plants because of their accessibility, economical value, often fewer side effects, plural activities and cultural appropriateness. This study aims at the identification of traditional medicinal plants of the urban community of Niamey, Niger, that have potential antidiabetic properties. In addition, the study evaluates an antidiabetic and antiobesogenic property *in vitro* and identifies phenolic marker compounds in selected species.

The ethnobotanical approach using the SIVs to prioritise potential plants for the treatment of T2D has proven to be adequate in the case of this ailment for the Cree First Nation in Quebec, Canada (Leduc *et al.*, 2006). For the same health problem, in Niger, herbalists listed a large number of plants (more than 180) that had the potential to help treating any of the 15 symptoms linked to T2D. Out of this plant list, a number of plants were mentioned numerous times by herbalists, especially *Securidaca longepedunculata*, *Piliostigma reticulatum*, *Bauhinia rufescens*, *Waltheria indica*, *Salvadora persica*, *Acacia nilotica* and *Guiera senegalensis*. Most of these plants from diverse taxonomical families are already known to tackle other ailments and a number of these have gone through bioassays and/or phytochemical assays. As for T2D, Osibehme *et al.* (2018) have stipulated that *Guiera senegalensis* can be assumed to be an antidiabetic plant based on an *in vivo* assay. Also, work done on the genus *Securidaca* spp. have shown possible antidiabetic activities (Ghorbani *et al.*, 2014), although studies involving *S. longepedunculata* or *P. reticulatum* were weak and no conclusion could be made. New,

better and more rigorous studies should be performed and this is why we have pursue this work targeting Niger plants.

Although causes of obesity and T2D are numerous and heterogeneous, the accessibility and over-consumption of high-fat foods are extensively accepted as significant environmental factors to the rising epidemics (Little *et al.*, 2007). Decreasing energy intake by blocking the digestion of dietary lipids could serve as an effective strategy in the treatment of obesity. Digestion of dietary fats can be reduced by the inhibition of pancreatic lipase, one of the main human lipid digestive enzymes (Mukherjee, 2003). This mechanism is extensively studied for the determination of potentially effective products as a treatment for obesity. This mechanism currently exists as a pharmacological treatment called Orlistat and is also currently researched in natural products such as medicinal plants (Birari and Buthani, 2007; de la Garza *et al.*, 2011; Lunagaryia *et al.*, 2014; McNeely and Benfield, 1998).

The results of the present study show that the most effective extract in inhibiting pancreatic lipase *in vitro* was from the bark of *Acacia nilotica*. The extract demonstrated an increasing inhibitory activity with increasing concentrations, inhibiting 18% of the enzyme at lowest tested concentration (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and exceeding positive control's inhibitory activity at tested concentrations higher than 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ as seen in **Figure 3.2**. Fitting four parameter log-logistic dose response curves to data permitted calculation of IC_{50} and I_{max} values (see **Table 3.4**). However, regressions are forced curves to the data and sometimes falsely represent the raw results, especially when multiple compounds of an extract react with pancreatic lipase, such as with plant material. Dose response curves of individual compounds become additional and the resulting curve finally rarely fits impeccably to a conventional four-parameter logistic regression. The highest maximal inhibitory activity (I_{max}) was calculated for *A. nilotica*, with 1697% inhibition. Since this value represents a projection, we did not observe this activity in concrete tested concentrations. The highest observed inhibitory activity of *A. nilotica* was of 100% inhibition (at 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). This extract also yielded the highest half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}), although inhibited 50% of the enzyme at a lower dose

than orlistat (see **Figure 3.2**). At its highest tested concentration, extract of *A. nilotica* leaves yielded optical density values lower than the enzyme blank assay, representing lipase inhibitory activity exceeding 100% inhibition. The optical density values also varied highly between assays at this highest concentration. This important variation may be explained in part by the elevated optical density of highest evaluated concentrations of the plant extract. Being constantly measured at very high optical density values, the error on measured values may also be of greater importance. In addition, since the extract has demonstrated important lipase inhibitory activities, the quantity of measured product of the enzymatic reaction at these high concentrations of extract is theoretically extremely low. In this situation again, slight variations may lead to important error values. Therefore, these values were eliminated from graph (**Figure 3.2**). In brief, these results support the promising inhibitory effect of *A. nilotica*'s bark on pancreatic lipase as a treatment avenue for both obesity and diabetes. Other antidiabetic properties were evaluated with the bark of *A. nilotica* in different studies and many of them were conclusive; the bark of this plant had a hypoglycemic effect on rats and on diabetic rats (Abdirahman *et al.*, 2015; Rajvaidhya *et al.*, 2012) and is extensively used as a natural source of antioxidant (Ali *et al.*, 2012 ; Rajvaidhya *et al.*, 2012). The results of this study add an antiobesogenic property to the plant's organ, thereby adding by extension an antidiabetic property.

Furthermore, one other extract showed constant and important inhibitory activity towards pancreatic lipase (see **Figure 3.2**): the leaves of *Cassia sieberiana*. The leaves of this plant have been subject to few studies about antidiabetic properties, although they have been found to have hepatoprotective and antioxidant properties *in vivo* (Madubuike *et al.*, 2015), suggesting that the plant might be a good candidate for the treatment of diabetes. Among all screened species, two generated a bi-phasic response of lipase (*C. micranthum* and *L. hastata*), activating the enzyme at lower concentrations and inhibiting it at higher ones (see **Figure 3.3**). Such dose response kinetic can occur when two or more compounds in the extract are active towards lipase, either activating or inhibiting the enzyme, and compounds differ either in quantity, in potency or in both

(Calabrese and Blain, 2009). *B. rufescens* and *P. reticulatum* both strongly activated pancreatic lipase *in vitro*, showing low values of EC₅₀ and being adequate prospects for biomedical studies regarding lipid digestive deficiencies. Unmentioned species showed little to no activity towards pancreatic lipase *in vitro*.

Although the present study only assesses an *in vitro* inhibition of pancreatic lipase activity by antidiabetic plants from Niamey, it provides additional evidence for the medicinal properties of the plants. However, the findings of this study encourage extended work on the bark of *A. nilotica*'s activity against pancreatic lipase, such as studies on the mechanism of action, fractionation of the extract to identify bioactives or *in vivo* hypolipidemic assays.

Finally, phytochemical analysis of the ethanolic extracts revealed the presence of phenolic compounds in the nine antidiabetic species of the Niamey pharmacopoeia (see **Table 3.4**), some of which are known to have potential antidiabetic properties (Lin and *al.*, 2016). A common compound to all the evaluated species is *p*-coumaric acid. This compound has been shown, in previous studies, to mitigate diabetes by reducing dietary carbohydrate absorption, modulating glucose metabolism, improving β -cell function and insulin secretion as well as showing antioxidant and anti-inflammatory properties (Pei *et al.*, 2016). With the identification of *p*-coumaric acid in all nine selected antidiabetic species of the Niamey pharmacopoeia, this study supports the previously mentioned assertion; *p*-coumaric acid may be an important natural compound considered for the treatment of T2D.

Another notable result from the identification of phenolic compounds in these antidiabetic plants is the presence of catechin in the most active specie: *A. nilotica*. This compound was identified in none of the other screened species. Catechin is a flavonoid that has been extensively studied for its antioxidant effects, but also particularly for other antidiabetic properties such as its beneficial effect on lipid metabolism, such as its adipogenic action, and on lipid profiles *in vivo* (Eid *et al.*, 2016; Nagao *et al.*, 2009). This work serves as an additional argument to stem further studies concerning catechin's effect on pancreatic lipase inhibition. However, we do not exclude the possibility that *A.*

nilotica's inhibitory activity could be the work of a compound that was not identified in this study, or a synergistic effect between two or more compounds, whether they were identified or not in this work (Cai *et al.*, 2012). In fact, gallic acid was also identified in the ethanolic extract of *A. nilotica*'s bark and is also a compound that previously has been found to have an inhibitory effect on pancreatic lipase (Oi *et al.*, 2012).

In conclusion, this study investigates the antidiabetic potential of medicinal plants from the urban pharmacopoeia of Niamey by means of a quantitative ethnobotanical approach. The results of the survey generated a prioritized list of 31 species, contributing to the limited documented knowledge of Nigerian ethnobotany. In addition, nine of the top ranked species were screened for their pancreatic lipase inhibitory activity *in vitro*, and although five species were found active at given concentration, one specific extract showed potent activity against pancreatic lipase: the bark of *Acacia nilotica*. Its *in vitro* activity had almost higher effectiveness than pharmacological antiobesity drug Orlistat. Lastly, phytochemical analyses in the selected nine antidiabetic plants allowed us to recurrently identify *p*-coumaric acid in all antidiabetic species. Catechin was identified only in *A. nilotica*, suggesting its possible implication in the plant's powerful lipase inhibitory activity.

3.6 Acknowledgments

This work was supported by the Foundation of the Institut de recherche en biologie végétale of University of Montreal, the Ministère de l'Éducation des Loisirs et des Sports (MELS), the Association Étudiante du Secteur des Sciences (AESS) de l'Université du Québec à Montréal (UQAM), the Department of social and preventive medicine of the University of Montreal and by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Team Grant to Pierre Haddad and by Alain Cuerrier's Institut de recherche en biologie végétale funding.

3.7 Tables and Figures

Table 3.1 Degree of association (w) to type 2 diabetes of 15 symptoms and complications, used to calculate SIV

Symptoms	w
1. Abscesses and/or boils	0,083769634
2. Increased appetite	0,068062827
3. Back and/or kidney pain	0,041884817
4. Diarrhea	0,041884817
5. Foot numbness and/or foot sores	0,094240838
6. Frequent headaches	0,036649215
7. Heart and/or chest pain	0,073298429
8. Slow healing infections	0,094240838
9. Swelling and/or inflammation	0,047120419
10. Arthritis/rheumatism	0,036649215
11. Sore and/or swollen limbs	0,068062827
12. Increased thirst	0,078534031
13. Increased urination	0,089005236
14. Blurred vision	0,083769634
15. General weakness	0,062827225
$\Sigma w =$	1

Table 3.2 List of nine Nigerian ethnobotanically selected antidiabetic medicinal plants extracted for this study

Specie	Local Zarma name	Family	Studied organ
<i>Acacia nilotica</i>	bân, baani, jitti, jetti	Fabaceae	Bark
<i>Balanites aegyptiaca</i>	garbey	Zygophylliaceae	Leaves
<i>Bauhinia rufescens</i>	nammary, namâli	Fabaceae	Leaves
<i>Cassia occidentalis</i>	sanga-sanga, chinchiliba	Fabaceae	Leaves
<i>Cassia sieberiana</i>	sisan, sinesan	Fabaceae	Leaves
<i>Combretum micranthum</i>	kubu, kubu-nya, tingilé	Combretaceae	Leaves
<i>Guiera senegalensis</i>	sabara	Combretaceae	Leaves
<i>Leptadenia hastata</i>	hanam, dûlé	Asclepiadiaceae	Twigs
<i>Piliostigma reticulatum</i>	kosorey (tree) kosey (fruit)	Fabaceae	Leaves

Table 3.3 Antidiabetic species mentioned by informants in Niamey in decreasing order of SIV ranking

SIV	Rank	Species	Family	Local names	Part(s) used
0,03504	1	<i>Securidaca longepedunculata</i> Fresen.	Polygalaceae	hasu koiré, warnagunguna, sanya, alali	L, B
0,03353	2	<i>Piliostigma reticulatum</i> (DC.) Hochst.	Fabaceae	kosorey (tree) kosey (fruit), kalgo, m'barkéhi, barki	L, B
0,03349	3	<i>Bauhinia rufescens</i> Lam.	Fabaceae	nammary, namâli, dirga, jirga, shishi, nammaré	L, YL, T, B, S
0,03335	4	<i>Waltheria indica</i> L.	Malvaceae	nune bâsi, nine bâsey, ankufuwa, poppetéki, kafapi	L, B, R
0,03295	5	<i>Salvadora persica</i> L.	Salvadoraceae	firra, hiro, talaekia, babul, katiaki, khirohy, bawudi	L
0,02531	6	<i>Acacia nilotica</i> (L.) Willd. ex Delile	Fabaceae	bân, baani, jitti, jetti, bagaruwa, marjee, barauwa, gawari, gaudi, gabdi, gaddé	L, B, Fr, S
0,02469	7	<i>Guiera senegalensis</i> J.F.Gmel.	Combretaceae	sabara, shabara, n'gélókhy, gélokhi	A
0,02297	8	<i>Khaya senegalensis</i> (Desr.) A.Juss.	Meliaceae	farey, mad'âtchi, kaïl, kahi	B
0,01988	9	<i>Prosopis Africana</i> (Guill. & Perr.) Taub.	Fabaceae	zam-turi, kirya, kohy (bulbs : ktiélendyé)	L, B, R
0,01871	10	<i>Sclerocarya birrea</i> (A. Rich.) Hochst.	Anacardiaceae	daney, diney, dânia, hédi, héri, édéhi	L, B, R
0,01764	11	<i>Balanites aegyptiaca</i> Delile	Zygophyllaceae	Garbey, adua, aduwa, tanni, manrotoki, adwahi, golétéki, tani	L, B
0,01752	12	<i>Cassia occidentalis</i> (L.) Link	Fabaceae	sanga-sanga, chinchiliba, kinkiliba, raydoré, sanga sanga, kashiu-	L
0,01537	13	<i>Combretum micranthum</i> G. Don	Combretaceae	kubu, kubu-nya, tingilé, géza, géza, gumumi, kugumi, talli	L, R
0,01410	14	<i>Cenchrus americanus</i> (L.) Morrone	Poaceae	Hayni, hatsii, gawuri (grain) gombé (straw)	A
0,01377	15	<i>Ficus platyphylla</i> Del.	Moraceae	Kobe	N/A
0,01366	16	<i>Cenchrus pedicellatus</i> (Trin.) Morrone	Poaceae	Borboto	A
0,01304	17	<i>Faidherbia albida</i> (Delile) A.Chev	Fabaceae		
0,01290	18	<i>Ficus thonningii</i> Blume	Moraceae		
0,01287	19	<i>Blepharis linariifolia</i> Pers.	Acanthaceae	sudafiti, abadchyma, muusu meehamni, kahiboka, kafi boka, mataki'n kurtchia, lemrehi, lemlehy	A
0,01286	20	<i>Annona senegalensis</i> Pers.	Annonaceae	Mufa, gwanda, n'dukuhy, ndukuuhi	L, B, R
0,01263	21	<i>Calotropis procera</i> (Aiton) W.T.Aiton	Apocynaceae	sageye, turyia, tumfafia, bambamby, bamambé, pulumpuuguuhi	L
0,01255	22	<i>Dioscorea</i> spp.	Dioscoreaceae		
0,01221	23	<i>Vitellaria paradoxa</i> C.F. Gaertn.	Sapotaceae		
0,01216	24	<i>Commiphora Africana</i> (A. Rich.) Engl	Burseraceae		
0,01126	25	<i>Acacia ataxacantha</i> (DC.) Kyal. & Boatwr.	Fabaceae	kuubu, gumbi bi, sark'ak'ya, gumi, bakin gumbi, moraré, ngoradié, korobi	L, T
0,01107	26	<i>Striga hermonthea</i> (Delile) Benth.	Scrophulariaceae	Mâlli, k'ujiji, gawguyé, ngudugi, mahé	A
0,01096	27	<i>Tephrosia purpurea</i> (L.) Pers.	Fabaceae		
0,01049	28	<i>Leptadenia hastate</i> (Pers.) Decne.	Apocynaceae	hanam, dülé, yadya, zobbo-toroho, yadyahul	A
0,01048	29	<i>Cassia sieberiana</i> DC.	Fabaceae	sisan, sinesan, malga, thidiaye, gama fhadahi, sisangahi, malgahi	L, T, R, B
0,00983	30	<i>Chrozophora brocchiana</i> Vis. Schweinf. or <i>C. senegalensis</i> Lam. A.Juss.	Euphorbiaceae	doréy, andoro, damaigi, dusur, duru dzéno, luzurwa	YL
0,00983	30	<i>Cucumis prophetarum</i> L.	Cucurbitaceae	muna, tchankaney, diri, gwanda'l béri, kontall, gurji, dénébamdi	N/A

A, all parts; B, bark; Fr, fruit; L, leaves; YL, young leaves; R, root; S, seed; T, twig; SIV, Syndromic Importance Value

Table 3.4 Values of inhibitory activity towards pancreatic lipase by the nine antidiabetic medicinal plants from the urban pharmacopoeia of Niamey and Orlistat

Species	IC ₅₀ (µg/mL)	I _{max} (% inhibition)	EC ₅₀ (µg/mL)	E _{max} (% activation)
<i>A. nilotica</i>	5568	1697	-	-
<i>B. aegyptica</i>	-	-	N/A	0
<i>B. rufescens</i>	-	-	43	89
<i>C. occidentalis</i>	424	504	-	-
<i>C. sieberiana</i>	433	318	-	-
<i>C. micranthum</i>	207	94	-	-
<i>G. senegalensis</i>	-	-	514	3309
<i>L. hastata</i>	199	39	-	-
<i>P. reticulatum</i>	-	-	88	53
Orlistat	29	90	-	-

* IC₅₀ = Half maximal inhibitory concentration; I_{max} = Maximal inhibitory effect; EC₅₀ = Half maximal activating concentration; E_{max} = Maximal activating effect

Table 3.5 Phenolic marker compounds in nine antidiabetic plant extracts of the Niamey pharmacopoeia identified using an HPLC method

Plant species	Identified phenolic compounds
<i>A. nilotica</i>	Gallic acid, catechin, cyanidin, <i>p</i> -coumaric acid, myricetin
<i>B. aegyptica</i>	<i>p</i> -Coumaric acid, myricetin, quercetin, kaempferol
<i>B. rufescens</i>	Epicatechin, <i>p</i> -coumaric acid
<i>C. micranthum</i>	Gallic acid, epicatechin, cyanidin, <i>p</i> -coumaric acid
<i>C. occidentalis</i>	<i>p</i> -Coumaric acid, myricetin, quercetin, kaempferol
<i>C. sieberiana</i>	Gallic acid, <i>p</i> -coumaric acid, myricetin, quercetin
<i>G. senegalensis</i>	Epicatechin, <i>p</i> -coumaric acid, myricetin, quercetin
<i>L. hastata</i>	Caffeic acid, <i>p</i> -coumaric acid, myricetin, quercetin, kaempferol
<i>P. reticulatum</i>	Cyanidin, <i>p</i> -coumaric acid, quercetin

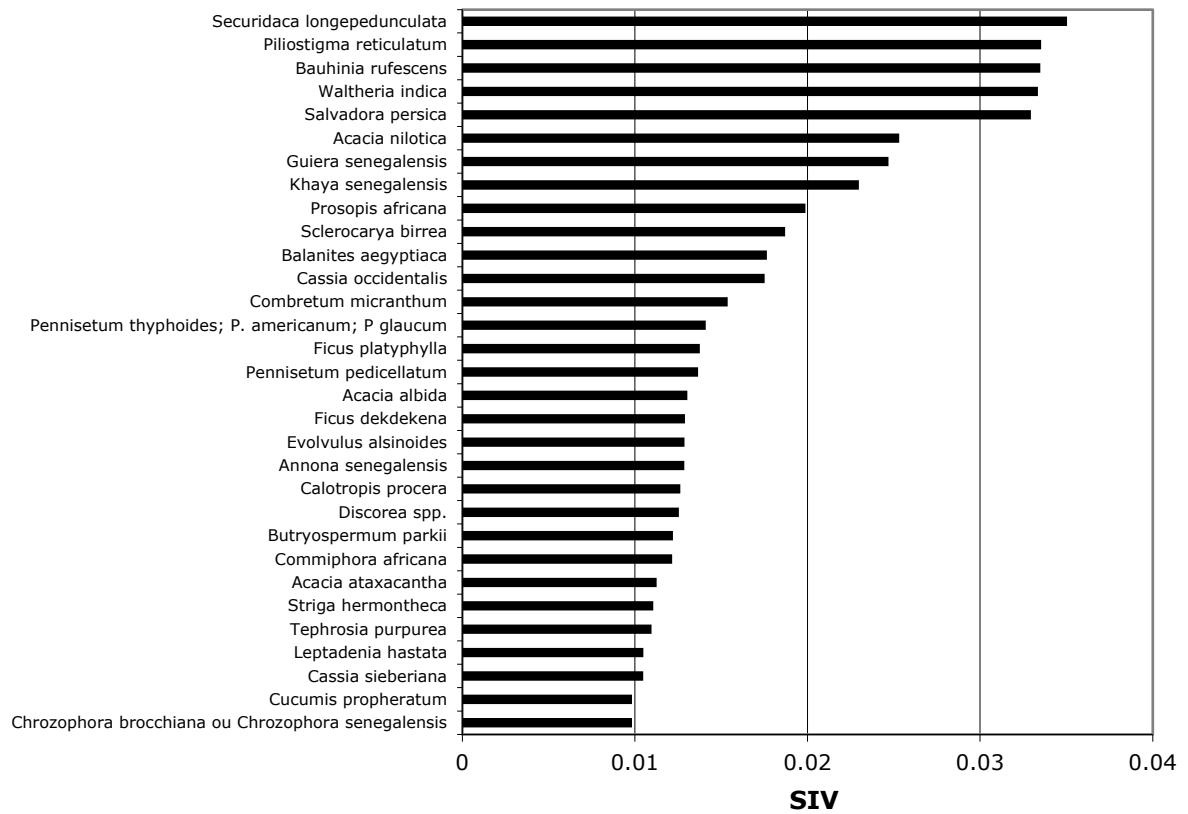


Figure 3.1 Ranking comparison between SIVs of 31 plants mentioned by informants in Niamey for antidiabetic properties.

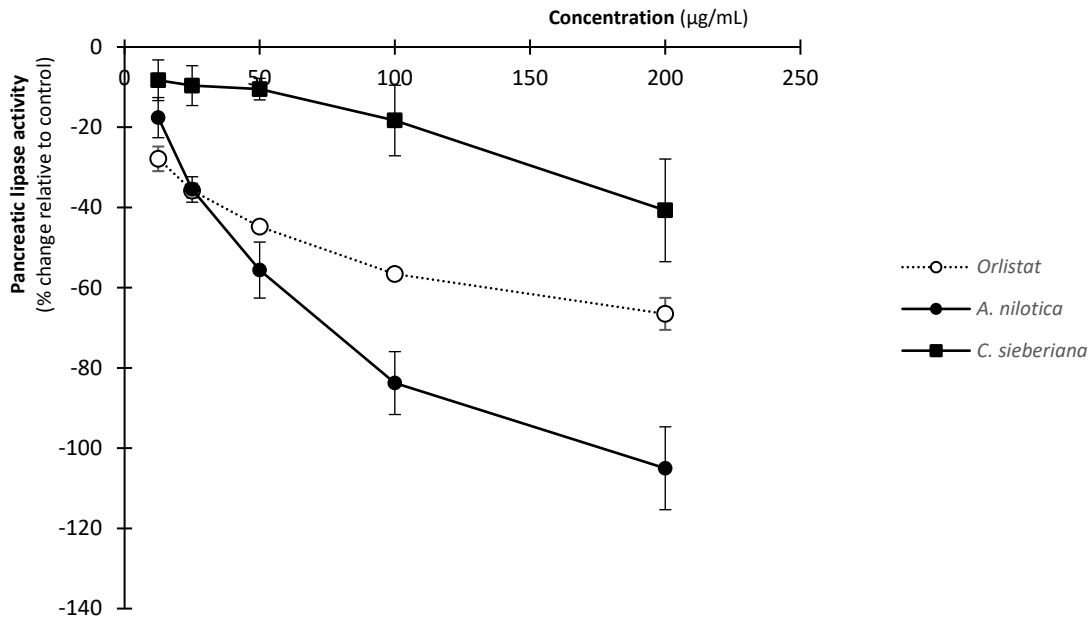


Figure 3.2 Change in pancreatic lipase activity relative to control at increasing concentrations of most active antidiabetic plants from the urban pharmacopoeia of Niamey. Extracts that have shown significant inhibitory activity towards lipase were included in this graph. Data are expressed as the percent change in pancreatic lipase activity, where negative values indicate an inhibition of the enzyme’s catalytic activity and positive values indicate an increase in the enzyme’s catalytic activity compared to its basal rate. Orlistat was tested as a positive control. Values are expressed as the mean \pm SE (n=3).

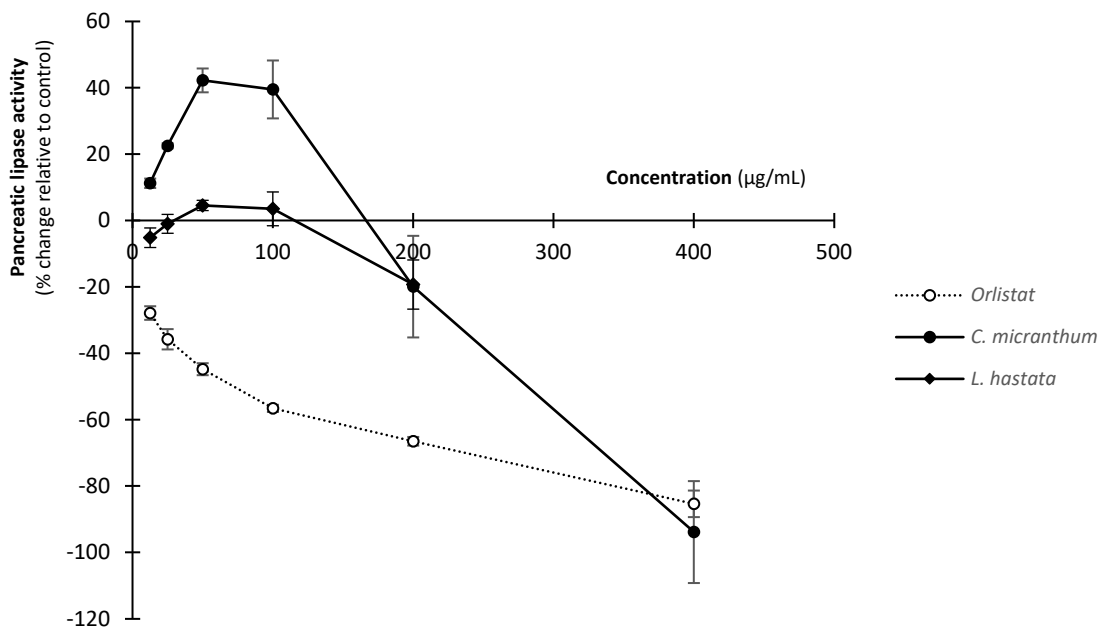


Figure 3.3 Bi-phasic change in pancreatic lipase activity relative to control at increasing concentrations of antidiabetic plants from the urban pharmacopoeia of Niamey. Extracts that have shown significant inhibitory activity towards lipase were included in this graph. Data are expressed as the percent change in pancreatic lipase activity, where negative values indicate an inhibition of the enzyme's catalytic activity and positive values indicate an increase in the enzyme's catalytic activity compared to its basal rate. Orlistat was tested as a positive control. Values are expressed as the mean \pm SE (n=3).

Chapitre 4

Apport original

Ce manuscrit présente une étude que j'ai entièrement exécutée, analysée et rédigée sous forme d'article scientifique. Mon nom figure donc en tant que première auteure. Les co-auteurs mentionnés représentent mes directeurs de recherche. Ayant dirigé mes expériences et interprétations, ils ont contribué à l'élaboration du manuscrit.

An *in vitro* pancreatic lipase inhibition evaluation of wild berry species found in Quebec

Mia Auger¹, Pierre Haddad² and Alain Cuerrier^{1*}

1. Institut de recherche en biologie végétale, Jardin botanique de Montréal, Université de Montréal, 4101 Sherbrooke Est, Montréal, QC, H1X 2B2, Canada.

2. Département de pharmacologie et physiologie, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Downtown Station, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada.

*Corresponding author

4.1 Abstract

Background: Polyphenols found in berries have shown to have a wide range of medicinal activities. Recently, their potential to inhibit pancreatic lipase has been investigated, a mechanism of action aiming to lower fat absorption for the treatment of obesity. This study evaluates the activity of seven berry species from Quebec towards pancreatic lipase *in vitro* and proceeds to an identification of phenolic compounds in the seven species.

Material and methods: The seven berry ethanolic extracts were assessed with an *in vitro* spectrophotometric assay using porcine pancreatic lipase and p-nitrophenyl laurate as substrate. Dose response curves were obtained with orlistat serving as a positive control. Phenolic marker compounds were identified with a high-performance liquid chromatography method.

Results: Whereas most of the screened species showed an inhibitory effect at given concentration, two berry extracts constantly and markedly inhibited pancreatic lipase *in vitro*: *Rubus arcticus* (arctic raspberry) and *Rubus chamaemorus* (cloudberry). Phytochemical analysis allowed the identification of gallic acid, p-coumaric acid and quercetin in certain berry extracts.

Conclusions: This study contributes to the documentation of pancreatic lipase inhibitory activity and phenolic compound identification in seven berries found in Quebec.

Key words: *pancreatic lipase, berries, obesity, medicinal plants, phenols*

4.1.1 Résumé

Introduction : Les polyphénols présents dans les baies ont démontré une large gamme d'activités médicinales. Récemment, leur potentiel d'inhibition de la lipase pancréatique a été étudié, un mécanisme d'action visant à réduire l'absorption des lipides pour le traitement de l'obésité. Cette étude évalue l'activité de sept espèces de baies du Québec vis-à-vis la lipase pancréatique *in vitro* et procède à l'identification de composés phénoliques chez ces espèces.

Méthodes : Les extraits éthanoliques des sept baies ont été évalués avec un bioessai spectrophotométrique *in vitro* en utilisant une lipase pancréatique porcine et le p-nitrophényle laurate comme substrat. Des courbes dose-réponse ont été obtenues et l'orlistat a servi de contrôle positif. Des composés marqueurs phénoliques ont été identifiés chez les sept extraits par une méthode de chromatographie liquide à haute performance.

Résultats : Alors que la plupart des espèces évaluées présentaient un effet inhibiteur de la lipase pancréatique à une concentration donnée, deux extraits de baies inhibaient la lipase pancréatique *in vitro* de façon constante et importante : *Rubus arcticus* (framboise arctique) et *Rubus chamaemorus* (chicouté). L'analyse phytochimique a permis d'identifier l'acide gallique, l'acide p-coumarique et la quercétine dans certains extraits de baies.

Conclusions : La présente étude contribue à la documentation de l'activité inhibitrice de la lipase pancréatique et à l'identification de composés phénoliques chez sept baies trouvées au Québec.

Mots-clés : *lipase pancréatique, baies, obésité, plantes médicinales, phénols*

4.2 Introduction

Nutrition is arguably the most commonly used medicine worldwide (Shils and Shike, 2006). Plants in particular not only can offer an integral nutritional value such as carbohydrates, lipids and proteins, but also present secondary metabolites, which are the active molecules found in medicinal plants (Bourgaud *et al.*, 2001). Secondary metabolites are an evolutionary result of a beneficial adaptation of plants to their environment, whether it is in response to biotic or abiotic stresses. In these stressful environments, since plants cannot escape physically from the stressful factor, the ones that exist today are those that have developed active molecules that can overcome the challenging external factors and ensure survival and reproduction (Akula and Ravishankar, 2011). And since animals and plants are essentially made of the same molecules, these secondary metabolites are also commonly found to be active in humans. In fact, humans have even been known to accustom their diet to changing environments or emerging diseases (Shils and Shike, 2006). Metabolic disorders, like obesity and type 2 diabetes (T2D), are fairly new diseases that now affect the worldwide population at increasing rates and effective treatments are currently extensively researched (Ogurtsova *et al.*, 2017; Popkin *et al.*, 2012; Zimmet *et al.*, 2001). Since these diseases are multifactorial, studies targeting treatments have been directed towards natural products that often offer multiple treatment pathways, as well as being easily accessible, economic and generally safe (Ríos *et al.*, 2015). Berries are of particular interest for the treatment of metabolic diseases, considering their high concentration in various phenolic compounds that are characteristic of dark red berry colour. Phenolic compounds are widely known for their antioxidant properties, but more recently, they are studied and shown to exert a wide range of biological activities (Burns Kraft *et al.*, 2008; Fuldner Kraft, 2010; Seeram, 2008).

Metabolic diseases are thought to originate from a disorder in the metabolism's homeostasis. Such disorders can be a result of imbalance in energy metabolism and this imbalance originates in various and heterogeneous elements (Colagiuri, 2010; Lazar, 2005). This imbalance between energy intake and energy expenditure is thought to be a

significant contributory factor to the development of obesity and T2D (Little *et al.*, 2007). Hence, treatment avenues that target the restoration of energy equilibrium should be prioritized for metabolic disease care. Pancreatic lipase is a digestive enzyme responsible for the hydrolyzation of over 50% of dietary fats. Inhibition of this enzyme would result in non-availability for absorption of about half of dietary fats, which can then contribute to lowering systemic lipid levels. The purpose of this treatment pathway is essentially to reduce energy intake by blocking lipid digestion and has been extensively studied in different products and even marketed for the longterm treatment of obesity. A single molecule that inhibits pancreatic and gastric lipases was pharmacologically isolated from bacteria, named tetrahydrolipstatin, and its highly effective activity sometimes leaves its users with unwanted fecal related secondary effects (McNeely and Benfield, 1999). Moreover, the inhibitory activity against pancreatic lipase has also recently been explored in other natural products. Successful studies for lipase inhibition included plant products such as teas, grape seeds, mango leaves and bark extracts and many other plant organs that sometimes have even also shown to exert other antidiabetic properties (Birari and Bhutani, 2007). Numerous studies have shown the beneficial effects of berries on metabolic diseases and there is also evidence that polyphenols found in fruits can inhibit pancreatic lipase (Birari and Bhutani, 2007; Karppinen *et al.*, 2016). Therefore, for the purpose of finding natural sources of pancreatic lipase inhibitors, this study screens a range of wild berries that were harvested on the Quebec territory for their effects on pancreatic lipase *in vitro* and assesses a partial phenolic compound characterization.

4.3 Material and Methods

4.3.1 Berry collection

Wild specimens of the seven berries listed in **Table 4.1** were collected in 2015 in Côte-Nord, Quebec, by *Trésor des bois* and *Centre de Recherche Les Buisson* (for arctic raspberry) and identified by botanist Dr. Alain Cuerrier. The plant material was stored at

-18°C and kept from light until further use. Common names of berries were attributed to respective species following VASCAN name propositions (Brouillet *et al.*, 2010+).

4.3.2 Plant material extraction

Aqueous ethanolic plant material extractions were made in Dr. A. Cuerrier laboratories at the *Institut de recherche en biologie végétale* (IRBV) of University of Montreal. Berries were frozen with liquid nitrogen and crushed before lyophilisation (Labconco, Lyph-lock 6 and FreeZone 4.5). The lyophilized material was then crushed into a fine powder and extracted twice in 80% aqueous ethanol (10mL aqueous ethanol per gram of dry matter) at room temperature with 24h of circular shaking at 200 rpm. The two ethanolic supernatants were recovered, vacuum filtered, pooled, centrifuged, dried under vacuum and lyophilized. The lyophilized extracts were then crushed into a fine powder and crude dry extracts were stored in darkness at -18°C until further use.

4.3.3 HPLC characterization of berry extracts

4.3.3.1 Phenolic marker compounds

All solvents and materials were obtained according to Saleem and al. (2010). Chemical standards were selected after literature review and plant extracts were analysed alongside the following phenolic markers compounds: gallic acid, catechin, caffeic acid, epicatechin, cyanidin, *p*-coumaric acid, myricetin, quercetin and kaempferol.

4.3.3.2 HPLC method development

The method was carried out according to Saleem and al. (2010). In brief, the nine aqueous ethanolic dry plant extracts were reconstituted in 100% methanol at 10 mg/mL, centrifuged at 1000g for 15 minutes at room temperature and filtered through a 0.2 µm PTFE syringe filter (Chromatographic Specialties Inc.). Chromatographic method was developed on Agilent 1100 series HPLC-DAD (Agilent Technologies Inc., CA, USA), consisting of an auto sampler with a 100 µL built-in injection loop, a quaternary pump, a column thermostat compartment, a diode-array-detector and Chemstation Software. The separation was achieved on LUNA C18 RP column, 150 mm x 2 mm, 3-micron particle size (Phenomenex Inc.). The column temperature was maintained at 50 °C and a

30-minute linear gradient of 10-100% acetonitrile in water at a flow rate of 0.4 mL/min was applied.

4.3.4 *In vitro* pancreatic lipase assay

The assay was prepared according to Cai and al. (2012), with some modifications. Briefly, type 2 porcine pancreatic lipase (Sigma, product L3126-25G, 30-90 U/mg protein) was dissolved in ultrapure water at 5 mg/mL and then centrifuged at 10 000 g for 5 minutes; supernatant was preserved. The reaction solution was composed of 100 mM Tris-base buffer (pH 8.2) to which was added the reaction substrate *p*-nitrophenyl laurate (pNP laurate, Sigma product 61716-1G) at a final concentration of 0.1 mM. Stock solution of 0.28 mM pNP laurate was dissolved in 5 mM sodium acetate (pH 5.0) with 1% Triton X-100, heated in boiling water to help dissolution and stored at room temperature for further use. All crude ethanol plant extracts were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) then diluted in series in DMSO to the indicated concentrations. Using 96-well plates, each well contained 89.3 μ L of reaction solution, 17.9 μ L of a plant extract to achieve the given final concentration and 53.6 μ L of lipase (added last to start reaction). The negative control contained 17.9 μ L of DMSO instead plant extract whereas the positive control contained sufficient Orlistat™ (Alfa Aesar product J62999, Ward Hill, Massachusetts) to achieve a final concentration of 40 μ g/mL. Blank controls were also run in each assay, which contained ultrapure water instead of lipase and their optical density were subtracted from all values prior to data analysis. Each 96-well plate was then incubated at 37°C for one hour, and each well's optical density was read at 400 nm with a tunable microplate reader (Versa Max spectrophotometer, Molecular Devices, San Jose, California). All samples were tested in triplicate. The results are expressed as percentage (%) inhibition of lipase activity, where O.D is optical density:

$$\% \text{ inhibition} = (\text{O.D}_{\text{control}} - \text{O.D}_{\text{sample}}) / \text{O.D}_{\text{control}} \times 100\%$$

4.3.5 *Data and statistical analysis*

The data are expressed as the mean values \pm standard error for measurements at each extract/Orlistat concentration. The data were analyzed for variance homogeneity using Bartlett's test ($p > 0.05$). Data were also analyzed by one-way ANOVA and post-hoc

Tukey's test was used for significance of difference ($p < 0.05$). Half maximal inhibitory concentration and maximal effective values were determined by fitting a four parameter log-logistic regression curve to the data with the Dose-Response Analysis (Ritz et al., 2015) using R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

4.4 Results

4.4.1 Inhibition of lipase by ethanolic extracts of wild berries from Quebec

Six concentrations of each of the seven dry berry extracts were prepared and tested against pancreatic lipase *in vitro* to assess their ability to inhibit the enzyme. Dose response curves were subsequently obtained and half maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) were determined for each species, as well as maximal inhibitory activities (I_{max}) as seen in **Table 4.2**. Since a limited number of species actually enhanced lipase activity, half maximal effective concentrations (EC_{50}) were also determined. The pharmacological drug Orlistat was also tested in an identical manner and an IC_{50} of 30 $\mu\text{g/mL}$ was obtained as a positive control reference.

The majority of the seven species could inhibit pancreatic lipase at a given concentration, while one species (swamp red currant) was found to activate the enzyme. Canada serviceberry showed no important activity towards lipase. Arctic raspberry and cloudberry represent the most potent active species, with I_{max} values that compare favorably to the positive control Orlistat and estimated IC_{50} values falling inside the tested concentration range.

4.4.2 Inhibition of lipase by berry extracts of various concentrations

The five species that have shown significant inhibitory activity towards pancreatic lipase are presented in **Figure 4.1**. Dose response curves fitted to the data represent the change in pancreatic lipase's activity compared to its basal catalytic rate in the presence of different samples, each of increasing concentrations.

Tested in this bioassay as a positive control alongside the seven berry extracts, Orlistat is represented in **Figure 4.1** with a dotted line. Lipase inhibition is important

(around 27% inhibition) at Orlistat's lowest tested concentration (12.5 µg/mL), and the lipase's activity decreases at an inverse logarithmic rate depending on increasing sample concentrations, attaining a plateau when pancreatic lipase's activity is inhibited by about 80%. Arctic raspberry inhibits pancreatic lipase at an increasing rate, relative to increasing concentrations of the plant's extract, inhibiting lipase by about 35% at its highest tested concentration (400 µg/mL). Cloudberry showed important lipase inhibiting activity at concentrations over 100 µg/mL. Elderberry inhibited lipase in a similar manner as arctic raspberry at highest tested concentrations (400 µg/ml), although has shown lipase enhancing activity at lower concentrations. Dog rose and currant both showed very little inhibitory activity towards lipase.

3.3 HPLC identification of phenolic compounds in plant extracts

Berry specimen ethanolic extracts were separated in a high-performance liquid chromatography (HPLC) column to identify phenolic marker compounds. Marker compounds were selected upon literature review and ran in the column before berry extracts. Phenolic compounds identified in berry species from Quebec are presented in **Table 4.3**. Additional compounds were identified via Chemstation library phenolic compound matching, although match score were never over the 99% threshold. None of the screened phenolic marker compounds were identified in Canada serviceberry or swamp red currant berry extracts.

4.5 Discussion

Natural sources of treatment for obesity such as medicinal plants are gaining in interest, since they generally offer safe and multiple actions, which are beneficial aspects for treatment of this multifactorial disease. The inhibition of pancreatic lipase, one of the main human lipid digestive enzymes, is an extensively studied mechanism for the determination of potentially effective products as a treatment for obesity. Aiming at an *in vitro* evaluation of the inhibitory effect on pancreatic lipase of seven berry species found in Quebec, the results of this study show that five out of the seven tested berries showed inhibitory activity at a given concentration. The two most active berry species

against lipase were of the Rosaceae family and more specifically of the *Rubus* genus: *Rubus arcticus* (arctic raspberry) and *Rubus chamaemorus* (cloudberry), showing maximal tested lipase inhibitory activities of 35% and 25% respectively (see **Figure 1**). Plants of the *Rubus* genus have been a food and medicinal source for humans since the end of the last Ice Age (Hummer, 2010). All parts of the plants were used for their medicinal properties, but the fruit part of the plant of this genus is mostly consumed in North America as a delicious fresh and nutritious fruit. Although a small number of papers have presented studies on medicinal activities in *R. arcticus* and *R. chamaemorus* berries, research is increasing in this field, establishing that the dietary intake of berry fruits has a positive effect on human health (Dudonné *et al.*, 2015; Edirisinghe et Burton-Freeman, 2016; Harris *et al.*, 2014; Seeram, 2008). Furthermore, unlike the majority of the *Rubus* species, these two berries are found in the northern hemisphere, where temperature is low and photoperiod is shortened for a portion of the year. These stressful environmental conditions may be part of the reason why these plants increase secondary metabolites production in their berries (Karppinen *et al.*, 2016). The findings of the current study support the fact that the two berries may also have an inhibitory activity towards pancreatic lipase *in vitro*. Elderberry, rosehip and currant all showed little inhibitory activity towards the enzyme.

HPLC phytochemical analysis of the ethanolic extracts revealed the presence of three phenolic compounds in five of the seven screened berry species: Gallic acid, *p*-coumaric acid and quercetin. All three compounds have been object of biomedical research assays studying their antiobesogenic, antidiabetic and other related medicinal activities (Eid *et al.*, 2015; Eid et Haddad, 2017; Pei *et al.*, 2016). For example, all three compounds have shown lipase inhibiting activities in previous studies (Cai *et al.*, 2012; Oi *et al.*, 2012; You *et al.*, 2012). Hence, these compounds may play a role in the berry extracts' activities against lipase assessed in this work. Subsequent studies aiming for bioassay-guided fractionation of the extracts, mechanism of action or *in vivo* studies implicating pancreatic lipase may help confirm or infirm this assumption. However we do not exclude the possibility that unidentified compounds may be responsible for

lipase inhibitory activities or that the inhibiting activities would be product of a synergistic action between two or more phenolic compounds, whether they were identified in this study or not. Indeed, previous studies have shown that synergistic effects on lipase were observed when two or more phenolic compounds are combined (Cai et al., 2012).

The present study investigates the potential of seven berry extracts for *in vitro* pancreatic lipase inhibition and identifies three phenolic compounds within five of the studied species using an HPLC method. The berries of *Rubus arcticus* and *R. chamaemorus* showed the strongest inhibitory activities against pancreatic lipase amongst all tested berries and gallic acid, *p*-coumaric acid and quercetin were identified in these species, suggesting their possible implication in the lipase inhibitory activities of berry extracts.

4.6 Acknowledgements

This work was supported by Alain Cuerrier's *Institut de recherche en biologie végétale* grant. Special thanks to *Trésor des Bois* and the *Centre de recherche Les Buissons* for collecting the berry specimen and to Ève-Catherine Desjardins for her interest in the activity of these berries.

4.7 Tables and Figures

Table 4.1 List of the seven studied wild berry species from the Quebec territory

Species	Family	Studied organ	Common name of fruit
<i>Rubus chamaemorus</i> Linnaeus	Rosaceae	Fruit	Cloudberry
<i>Amelanchier canadensis</i> (Linnaeus) Medikus	Rosaceae	Fruit	Canada serviceberry
<i>Sambucus canadensis</i> Linnaeus	Caprifoliaceae	Fruit	Canada elderberry
<i>Ribes glandulosum</i> Grauer	Grossulariaceae	Fruit	Skunk currant
<i>Ribes triste</i> Pallas	Grossulariaceae	Fruit	Swamp red currant
<i>Rosa canina</i> Linnaeus	Rosaceae	Fruit	Dog rose
<i>Rubus arcticus</i> Linnaeus	Rosaceae	Fruit	Arctic raspberry

Table 4.2 Values of inhibitory activity towards pancreatic lipase by the seven wild berry extracts from Quebec and Orlistat

Species	IC ₅₀ (µg/mL)	I _{max} (% inhibition)	EC ₅₀ (µg/mL)	E _{max} (% activation)
Cloudberry	200	25	-	-
Canada serviceberry	-	-	-	-
Canada elderberry	419	98	-	-
Skunk currant	103	6	-	-
Swamp red currant	-	-	158	12
Dog rose	7	6	-	-
Arctic raspberry	195	39	-	-
Orlistat	30	92	-	-

* IC₅₀ = Half maximal inhibitory concentration; I_{max} = Maximal inhibitory effect; EC₅₀ = Half maximal activating concentration; E_{max} = Maximal activating effect

Table 4.3 Identified phenolic marker compounds in seven berries from Quebec with an HPLC method

Berries	Identified phenolic compounds
Cloudberry	Gallic acid, <i>p</i> -coumaric acid, quercetin
Canada serviceberry	-
Canada elderberry	Gallic acid, <i>p</i> -coumaric acid
Skunk currant	-
Swamp red currant	Gallic acid, <i>p</i> -coumaric acid
Dog rose	Quercetin
Arctic raspberry	<i>p</i> -Coumaric acid

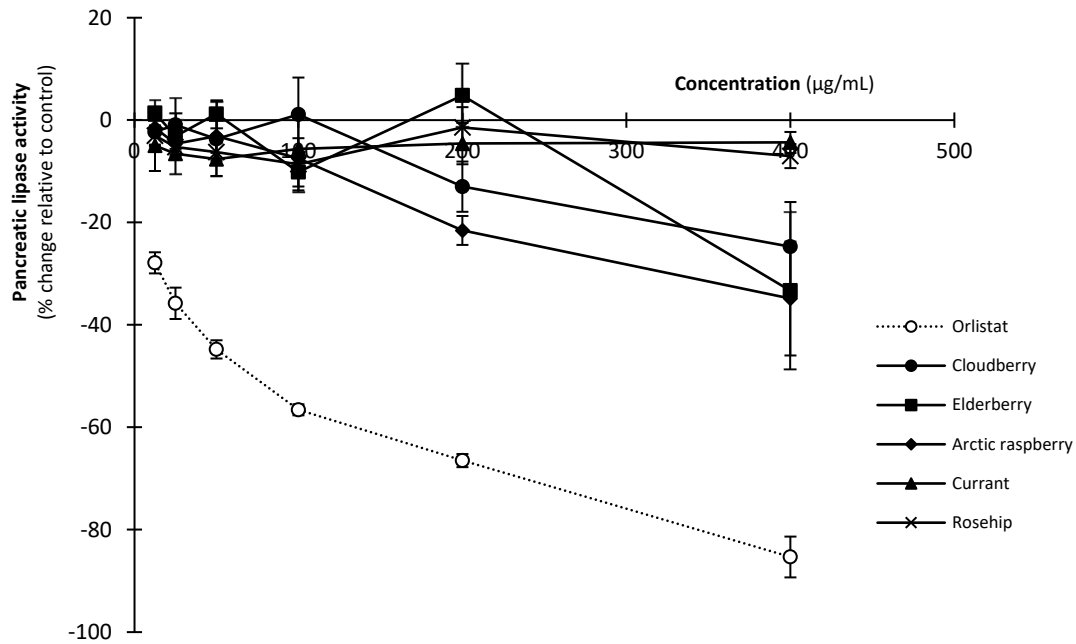


Figure 4.1 Change in pancreatic lipase activity relative to control at increasing concentrations of most active berry extracts. Extracts that have shown significant inhibitory activity towards lipase were included in this graph. Data are expressed as the percent change in pancreatic lipase activity, where negative values indicate an inhibition of the enzyme's catalytic activity and positive values indicate an increase in the enzyme's catalytic activity compared to its basal rate. Orlistat was tested as a positive control. Values are expressed as the mean \pm SE (n=3).

Chapitre 5 – Discussion

De façon générale, les objectifs définis ont été rencontrés, soient de procéder à l'évaluation des activités inhibitrices de la lipase pancréatique *in vitro* chez 33 espèces végétales et à l'identification de composés phénoliques chez 14 de ces espèces.

Depuis 2003, l'équipe de recherche IRSC-ÉMAAD se consacre à la traduction du savoir traditionnel des communautés cries d'Eeyou Istchee sous une forme scientifique, ciblant les activités antidiabétiques de 17 espèces végétales (Haddad *et al.*, 2012). Dans l'intention d'élargir nos connaissances quant à ces activités, la présente étude est la première à entreprendre l'évaluation *in vitro* de l'activité inhibitrice de la lipase pancréatique chez ces 17 espèces végétales. Alors que la majorité des espèces antidiabétiques de la pharmacopée Eeyouch évaluées ont démontré une activité inhibitrice de la lipase pancréatique à une concentration donnée, trois ont eu une activité constante et importante. Ce sont des feuilles d'espèces végétales appartenant à la famille des Ericaceae qui ont démontré les activités inhibitrices les plus puissantes : *Kalmia angustifolia*, *Gaultheria hispidula* et *Rhododendron groenlandicum*. Dans les communautés cries, les espèces morphologiquement similaires sont souvent nommées et utilisées de façon semblable (Rapinski, 2012). Par exemple, ils recourent aux feuilles de *K. angustifolia* et de *R. groenlandicum* pour traiter plusieurs des mêmes symptômes, mais les effets du premier seraient plus puissants ; deux assertions qui concordent avec les résultats obtenus dans l'étude avec la lipase pancréatique présentée dans ce mémoire. Selon la caractérisation phénolique de ces espèces, publiée en 2006 et en 2009 par Spoor *et al.* (2006) et Harbilas *et al.* (2009) respectivement, les catéchines et les quercétines glycosides seraient des composés communs aux trois feuilles de la famille des Ericaceae. Les catéchines ont largement été étudiées pour leur effets hypolipémiants *in vivo* (Nagao *et al.*, 2007) et on leur attribue plusieurs mécanismes d'action pour arriver à cet effet, notamment l'inhibition de certaines enzymes digestives (Nakai *et al.*, 2005). Cependant, leur activité inhibitrice de la lipase pancréatique demeure plutôt faible, quoiqu'existante, tout comme pour les quercétines glycosides (Yuda *et al.*, 2012). Comme des études ont démontré que des effets synergiques sur la

lipase peuvent être observées lorsque deux ou plusieurs composés phénoliques sont combinés (Cai *et al.*, 2012), nous incluons la possibilité que les activités inhibitrices de la lipase pancréatique observées dans cette étude soient engendrées par un effet synergique entre les deux composés phénoliques. Des études ultérieures évaluant cette activité synergique envers la lipase s'avèreraient utiles pour tenter d'élucider la question.

Dans les communautés CEI comme dans la littérature scientifique, certaines espèces d'Ericaceae sont connues pour produire un composé toxique (Hill, 1986 ; Rapinski, 2012). Les grayanotoxines, aussi connues sous le nom d'andromédotoxines, seraient responsables de l'effet hépatotoxique que provoque la consommation excessive de certaines parties de ces espèces. Cependant, elles seraient aussi consommées traditionnellement pour traiter le diabète, et plus récemment démontrées comme étant hypoglycémiantes et hypolipidémiantes *in vivo* (Oztasan *et al.*, 2005). Ces activités opposées à de concentrations extrêmes sont un exemple du phénomène d'hormèse établi en toxicologie pour expliquer les réponses bi-phasiques des composés biologiques, qu'ils soient de molécules uniques ou d'organismes entiers. On peut témoigner d'un autre exemple du phénomène d'hormèse parmi les résultats de cette étude, alors que certaines espèces ont engendré une réponse bi-phasique chez la lipase pancréatique. Les feuilles de *Rhododendron tomentosum*, une autre espèce de la famille des Ericaceae, ont inhibé de façon importante la lipase pancréatique à concentrations élevées, mais ont légèrement activé la lipase à des concentrations plus faibles. Cette réponse bi-phasique peut s'observer alors que plusieurs composantes d'un même extrait engendrent des activités opposées chez la lipase pancréatique et que ces composantes diffèrent en puissance et quantité (Calabrese et Baldwin, 2002). Afin de mieux cerner le mécanisme d'action derrière cette réponse bi-phasique, des méthodes de fractionnement d'extrait seraient utiles pour tenter de déterminer les activités individuelles des composantes de *R. tomentosum* envers la lipase pancréatique.

Chez les espèces antidiabétiques de la pharmacopée de Niamey évaluées avec la lipase pancréatique *in vitro*, ce sont aussi la majorité des espèces qui ont inhibé l'enzyme à une concentration donnée. Deux espèces de la famille des Fabaceae ont su l'inhiber de façon constante et importante, soit l'écorce d'*Acacia nilotica* et les feuilles de *Cassia sieberiana*. La première espèce a démontré une activité inhibitrice croissante, relativement à une concentration d'extrait croissante, inhibant significativement l'activité enzymatique de la lipase dès la plus faible concentration testée. À des concentrations plus élevées, l'extrait d'écorce d'*A. nilotica* inhibe la lipase *in vitro* de façon plus puissante que le contrôle positif orlistat. Ces résultats prometteurs supportent l'effet inhibiteur de l'écorce d'*A. nilotica* sur la lipase pancréatique qui pourrait être considéré comme voie de traitement pour l'obésité et le DT2. On attribue déjà à cette espèce beaucoup de propriétés médicinales, parmi lesquelles des activités antidiabétiques ; elle aurait démontré des effets antioxydants et hypoglycémiants *in vivo* (Abdirahman *et al.*, 2015; Ali *et al.*, 2012; Rajvaidhya *et al.*, 2012). Les feuilles de *Cassia sieberiana* ont elles aussi eu un effet inhibiteur sur la lipase pancréatique *in vitro*, cependant, de plus faible ampleur que l'espèce précédente. Les feuilles de cette plante aurait fait l'objet que de peu d'études concernant ses propriétés antidiabétiques, quoique certaines ont pu lui attribuer des propriétés antioxydantes et hépatoprotectrices (Madubuike *et al.*, 2015). Mais depuis longtemps, les espèces du genre *Cassia* sont utilisées traditionnellement au Niger pour traiter les troubles digestifs ou pour leurs propriétés laxatives; des activités qui pourraient expliquer la propriété de *C. sieberiana* à inhiber la lipase pancréatique *in vitro* (Elujoba *et al.*, 1989).

L'identification de composés phénoliques chez les espèces provenant de la pharmacopée de Niamey présente un composé commun aux neuf espèces antidiabétiques : l'acide *p*-coumarique. L'activité de ce phénol a été démontrée par certaines études pour posséder maintes propriétés antidiabétiques, notamment celle d'inhiber la lipase pancréatique (Cai *et al.*, 2012) et l'étude présentée dans ce mémoire supporte cette assertion ; l'acide *p*-coumarique peut être un composé important chez les plantes considérées pour le traitement du DT2. L'espèce ayant démontrée l'activité

inhibitrice la plus puissante envers la lipase pancréatique – *A. nilotica* – a aussi été la seule espèce chez qui la catéchine a été identifiée dans ce groupe. On attribue plusieurs activités antidiabétiques à ce composé, et notamment il améliorerait les profils lipidiques chez des humains obèses et diabétiques (Nagao *et al.*, 2007 ; Nagao *et al.*, 2009). L'étude présentée dans ce mémoire constitue un argument supplémentaire pour entamer des études ultérieures concernant l'effet de la catéchine sur l'inhibition de la lipase pancréatique. Cependant, nous n'excluons pas la possibilité que la puissante activité d'*A. nilotica* envers la lipase soit causée par un composé non identifié dans cette étude, ou bien par un effet synergique entre deux ou plusieurs composés, qu'ils aient été identifiés ou non dans cette étude.

Les sept baies d'origine québécoise évaluées dans ce mémoire ont aussi majoritairement inhibé la lipase pancréatique *in vitro* à une concentration donnée. Cependant, en général, les activités observées étaient moins puissantes que celles des deux autres groupes végétaux évalués. Toutes les activités inhibitrices des baies se sont retrouvées plus faibles que celle du contrôle positif, à chacune des concentrations évaluées. Pour tenter d'expliquer cette différence d'efficacité entre les activités des différents groupes évalués, nous pouvons nous pencher sur le principe de la distribution des métabolites secondaires. Les métabolites secondaires, qui jouent un rôle majeur dans l'adaptation des plantes à leur environnement, sont distribués vers les différents organes en fonction de leurs besoins variés (Bourgau *et al.*, 2001). Effectivement, les échantillons du dernier groupe de plantes évaluées dans ce mémoire sont entièrement constitués d'organes fruitiers, alors que les deux groupes précédents sont constitués majoritairement d'écorces et de feuilles. D'un point de vue évolutif, une espèce végétale aurait moins d'intérêt à développer des métabolites secondaires pour un organe qui est destiné à la perte pour propagation – comme les baies – que pour un organe destiné à demeurer sur la plante et lui permettre de survivre à son environnement pour une plus longue durée – comme l'écorce ou la feuille (Wink, 2003). En outre, ces organes sont aussi plus communément utilisés en médecine traditionnelle,

puisque'ils seraient connus pour engendrer des activités biologiques plus puissantes. Cependant, les organes fruitiers peuvent aussi se composer de certains métabolites secondaires pour différentes raisons évolutives, comme la nécessité d'attirer des propagateurs de graines et en même temps, de repousser d'autres entités dommageables (Cipollini *et al.*, 1997). Les baies sont d'ailleurs connues pour être des fruits à haute teneur en métabolites secondaires, notamment en polyphénols (Seeram, 2008). Malgré qu'elles aient démontré dans cette étude des activités moins efficaces envers la lipase, ce sont tout de même des activités inhibitrices qui ont été observées chez la majorité des baies évaluées. Les deux espèces ayant inhibé la lipase de façon importante et constante sont toutes deux de la famille des Rosaceae, et plus particulièrement du genre *Rubus* : *R. arcticus* et *R. chamaemorus*. Les plantes du genre *Rubus* sont une source alimentaire et médicinale à travers le monde depuis des millénaires (Hummer, 2010), et leurs fruits sont largement consommés dans les communautés autochtones canadiennes, puisqu'ils sont abondants et contribuent de façon importante au régime traditionnel de ces communautés (Harris *et al.*, 2014). Un nombre limité d'études portent sur les propriétés potentiellement médicinales de ces organes fruitiers, quoique l'intérêt dans cette avenue de recherche augmente remarquablement, puisqu'il est clairement établi que l'apport alimentaire de baies a un effet positif sur la santé (Arnason *et al.*, 1981; Dudonné *et al.*, 2015; Harris *et al.*, 2014; Seeram, 2008).

L'analyse phytochimique des extraits de baies a permis l'identification de trois composés phénoliques dans cinq des sept espèces : l'acide gallique, l'acide *p*-coumarique et la quercétine. Ces trois composés ont montré dans des études antérieures des activités inhibitrices de la lipase pancréatique (Cai *et al.*, 2012; Oi *et al.*, 2012; You *et al.*, 2012). Par conséquent, il est possible d'avancer que ces composés puissent jouer un rôle dans les activités inhibitrices des extraits de baies évaluées dans ce travail. Des études de fractionnement des extraits démontrés actifs contre la lipase pancréatique sont nécessaires afin d'élucider l'identité réelle du ou des composés actifs et potentiellement leur mécanisme d'action synergique envers la lipase pancréatique.

La communauté scientifique a souvent été préoccupée par la bioactivité des polyphénols une fois métabolisés par l'homme (Manach *et al.*, 2004). Alors que bien des études analysent la biodisponibilité des polyphénols présents chez les plantes médicinales (Manach *et al.*, 2004), cet enjeu demeure inconnu pour les études présentées dans ce mémoire. Effectivement, l'emplacement de l'activité catalytique de la lipase pancréatique «*in vivo*» se situe en réalité *ex vivo*, puisque la réaction se déroule au sein du système digestif (pour lequel les conditions ont été imitées durant les essais *in vitro* présentés dans cette étude). Une des forces de la présente étude est donc que la réaction enzymatique reproduite *in vitro* représente presque exactement la situation envisagée *in vivo*. En effet, comme la réaction enzymatique entre les triglycérides et la lipase pancréatique se produit à même la lumière de l'intestin, les composantes de la réaction n'ont pas besoin d'être absorbées ou métabolisées par l'organisme avant de débiter leur activité. Les inhibiteurs de l'enzyme (les composantes des différentes espèces végétales) agissent donc à même les sucs intestinaux au moment où la digestion a lieu. La bioactivité des constituants des plantes médicinales étudiées ne dépend donc pas (ou très peu) de leur métabolisme. Par conséquent, il serait possible de supposer qu'il y aurait une similarité entre les activités *in vitro* évaluées dans ce mémoire et les activités qui pourraient réellement être observées chez l'humain. Néanmoins, une limite à cette étude réside dans l'absence du microbiote humain dans la situation évaluée *in vitro*, un élément bien connu pour son métabolisme des polyphénols (Marin *et al.*, 2015). Par ailleurs, comme le bioessai avec la lipase pancréatique a été effectué uniquement à l'aide d'extraits éthanoliques des différentes plantes, ce sont seulement les composantes qui auront été extraites avec le solvant alcoolique qui sont étudiées. Lorsque consommées par l'homme, ces plantes peuvent se retrouver soit à l'état naturel, en décoction, en extrait huileux, etc. Cette étude représente ainsi un précurseur à d'autres études plus spécifiques, comme des études de fractionnement qui permettraient de déterminer quel(s) composé(s) est(sont) responsable(s) d'une activité inhibitrice, pour ainsi établir quelle méthode de consommation ou d'extraction permettraient de bénéficier des effets recherchés.

En dernier lieu, dans l'intention d'établir une relation entre les activités envers la lipase pancréatique des 33 espèces évaluées dans ce mémoire et leur composition phénolique partielle, une analyse de redondance canonique a été réalisée entre ces deux composantes. Évalués par groupes d'espèces (les plantes crie, les plantes nigériennes et les baies québécoises), aucune corrélation n'a pu être établie entre les activités des espèces envers la lipase et leur composition en phénols. Évalués tous ensemble, une relation ressort entre les activités des extraits envers la lipase (définies par une courbe dose réponse log-logistique à quatre paramètres) et leur composition en phénols. Les espèces ayant démontré des activités similaires se regroupent ensemble et celles ayant démontré des activités inhibitrices envers la lipase se regroupent avec les coefficients qui représentent les valeurs d'IC₅₀ et les valeurs d'inhibition maximale (I_{max}). On corrèle aussi étroitement la présence de catéchine avec l'activité d'*Acacia nilotica*, laissant place à la possibilité pour des études ultérieures de considérer l'implication des catéchines dans l'activité inhibitrice importante de la lipase pancréatique démontrée par *A. nilotica*.

Ce n'est pas avec un manque d'effort de la communauté scientifique que les traitements développés faillent à freiner l'épidémie des maladies métaboliques. Ces affections multifactorielles nécessiteraient sans doute une approche intégrative, rassemblant plusieurs voies thérapeutiques qui ensemble permettraient de maîtriser ces maladies. Les recherches se tournent maintenant davantage vers des solutions naturelles et réalisables, comme l'utilisation de plantes médicinales et leur intégration à l'alimentation, en incluant les habitudes de vies qui devraient s'y rattacher. Les études sur les multiples propriétés médicinales de certaines plantes s'accumulent et tendent vers un consensus ; leurs effets sont réels et importants. Intégrer des espèces cibles à l'alimentation pourrait constituer une partie de la solution pour le traitement des maladies métaboliques. Néanmoins, il reste nécessaire de souligner la valeur sans égal

des savoirs traditionnels et l'importance de reconnaître l'existence et la pertinence de ces précieuses connaissances afin de tenter d'éviter qu'elles disparaissent.

Bibliographie

Abdirahman Y.A., Juma K.K., Mukundi M.J., Gitahi S.M., Agyirifo D.S., Ngugi P.M., Gathumbi P.K., Ngeranwa J.J.N., Njagi E.N.M. *The hypoglycemic activity and safety of aqueous stem bark extracts of Acacia nilotica*. Journal of Drug Metabolism & Toxicology. 2015 ; Vol. 6(4) : 189.

Abo K. A., Fred-Jaiyesimi A. A., Jaiyesimi A. E. A. *Ethnobotanical studies of medicinal plants used in the management of diabetes mellitus in South Western Nigeria*. Journal of ethnopharmacology. 2008 ; Vol. 115(1) : 67-71.

African Development Bank, Organisation for Economic Co-operation and Development, United Nations Development Program, United Nations Economic Commission for Africa. *African Economic Outlook*. 2011.

Agence de la santé publique du Canada. *Le diabète au Canada : Perspective de santé publique sur les faits et chiffres*. Ottawa, 2011.

Akula R., Ravishankar G.A. *Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants*. Plant signaling and behavior. 2011; Vol. 6(11): 1720-1731.

Ali A., Akhtar N., Ali Khan B., Shoaib Khan M., Rasul A., Shahiq-UZ-Zaman, Khalid N., Waseem K., Mahmood T., Ali L. *Acacia nilotica : A plant of multipurpose medicinal uses*. Journal of Medicinal Plants Research. 2012 ; Vol. 6(9) : 1492-1496.

American Diabetes Association. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care. 2013 ; Vol. 36 (1) : S67-S74.

American Diabetes Association. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care. 2014; Vol. 37(Supplement 1); S81-S90.

Anderson J.W., Randles K.M., Kendall C.W.C., Jenkins D.J.A. *Carbohydrates and Fiber Recommendations for Individuals with Diabetes : A Quantitative Assessment and Meta-Analysis of the Evidence*. Journal of the American College of Nutrition. 2004 ; Vol. 23 (1) : 5-17.

Arnason T., Hebda R. J., Johns T. *Use of plants for food and medicine by Native Peoples of eastern Canada*. Canadian Journal of Botany. 1981 ; Vol. 59(11) : 2189-2325.

Auzias D., Labourdette J.-P. *Le petit futé du Niger*. Nouvelles éditions de l'Université de Paris, France. 2004.

Ayantunde A. A., Briejer M., Hiernaux P., Udo H. M., Tabo, R. *Botanical knowledge and its differentiation by age, gender and ethnicity in Southwestern Niger*. Human Ecology. 2008 ; Vol. 36(6) : 881-889.

Bako S. P., Bakfur M. J., John I., Bala E. I. *Ethnomedicinal and phytochemical profile of some savanna plant species in Nigeria*. International Journal of Botany. 2005 ; Vol. 1(2) : 147-150.

Beran D., Yudkin J. S. *Diabetes care in sub-Saharan Africa*. The Lancet. 2006 ; Vol. 368(9548) : 1689-1695.

Berkes F., Farkas C.S. *Eastern James Bay Cree Indians : Changing Patterns of Wild Food Use and Nutrition*. Ecology of Food and Nutrition. 1978 ; Vol. 7 : 155-172.

Birari R.B., Bhutani K.K. *Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential*. Drug Discovery Today. 2007; Vol. 12(19-20): 879-889.

Black P.L., Arnason J.T., Cuerrier A. *Medicinal plants used by the Inuit of Qikiqtaaluk (Baffin Island, Nunavut)*. Botany. 2011; Vol. 86: 157-163

Boston P., Jordan S., MacNamara E., Kozolanka K., Bobbish-Rondeau E., Iserhoff H., Mianscum S., Mianscum-Trapper R., Mistacheesick I., Petawabano B., Sheshamush-Masty M., Wapachee R., Weapenicappo J. *Using Participatory Action Research to Understand the Meanings Aboriginal Canadians Attribute to Rising Incidence of Diabetes*. Chronic Diseases in Canada. 1997 ; Vol. 18 (1).

Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. *Production of plant secondary metabolites : a historical perspective*. Plant Science, Elsevier. 2001 ; Vol. 161 : 839-851.

Bravo L. *Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*. Nutrition Reviews. 1998; Vol. 56(11) : 317-333.

Brouillet L., Coursol F., Meades S.J., Favreau M., Anions M., Bélisle P., Desmet P. *VASCAN, la Base de données des plantes vasculaires du Canada*. 2010+. <http://data.canadensys.net/vascan/> (consultée le 2019-05-06).

Bruce S.G., Riediger N.D., Zacharias J.M., Young T.K. *Obesity and Obesity-Related Comorbidities in Canadian First Nation Population*. Preventing Chronic Disease. 2011 ; Vol. 8 (1) : A03.

Burns Kraft T.F., Dey M., Rogers R.B., Ribnicky D.M., Gipp D.M., Cefalu W.T., ..., Lila M. A. *Phytochemical composition and metabolic performance-enhancing activity of dietary berries traditionally used by native North Americans*. Journal of agricultural and food chemistry. 2008 ; Vol. 56(3) : 654-660.

Cai S., Wang O., Wang M., He J., Wang Y., Zhang D., Zhou F., Ji B. *In vitro inhibitory effect on pancreatic lipase activity of subfractions from ethanol extracts of fermented oats (Avena sativa L.) and synergistic effect of three phenolic acids.* Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2012; Vol. 60: 7245-7251.

Calabrese E.J., Baldwin L.A. *Defining hormesis.* Human & Experimental Toxicology. 2002; Vol. 21: 91-97.

Calabrese E.J., Blain R.B. *Hormesis and plant biology.* Environmental Pollution. 2009; Vol. 157: 42-48.

Chakravarthy M.V., Booth F.W. *Eating, exercise and «thrifty» genotypes : connecting the dots towards an evolutionary understanding of modern chronic diseases.* Journal of Applied Physiology. 2004 ; Vol. 96 : 3-10.

Chika A., Bello S.O. *Antihyperglycaemic activity of aqueous leaf extract of Combretum micranthum (Combretaceae) in normal and alloxan-induced diabetic rats.* Journal of Ethnopharmacology. 2010; Vol. 129: 34-37.

Cho N., Shaw J. E., Karuranga S., Huang Y., da Rocha Fernandes J. D., Ohlrogge A. W., & Malanda B. *IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045.* Diabetes research and clinical practice. 2018; Vol. 138 : 271-281.

Cignarella A., Nastasi M., Cavalli E., Puglisi L. *Novel lipid-lowering properties of Vaccinium myrtillus L. leaves, a traditional antidiabetic treatment, in several models of rat dyslipidaemia : a comparison with ciprofibrate.* Thrombosis Research. 1996; Vol. 84(5): 311-322.

Cipollini M. L., Levey D. J. *Secondary metabolites of fleshy vertebrate-dispersed fruits: adaptive hypotheses and implications for seed dispersal.* The American Naturalist. 1997 ; Vol. 150(3) : 346-372.

Colagiuri S. *Diabesity : therapeutic options.* Diabetes, Obesity and Metabolism. 2010 ; Vol. 12 : 463-473.

Cryer P.E., Davis S.N., Shamooh H. *Hypoglycemia in Diabetes.* Diabetes Care. 2003 ; Vol. 26 (6) : 1902-1912.

Cullen H. *The weather of the future. Heat waves, extreme storms, and other scenes from a climate-changed planet.* HarperCollins Publishers. New York. 2010.

Danadian K., Balasekaran G., Lewy V., Meza M. P., Robertson R., Arslanian S. A. *Insulin sensitivity in African-American children with and without family history of type 2 diabetes*. *Diabetes Care*. 1999 ; Vol. 22(8) : 1325-1329.

Dandona P., Aljada A., Chaudhuri A., Mohanty P., Garg R. *Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes and inflammation*. *Circulation*. 2005; Vol. 111(11): 1448-1454.

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

Desnuelle P., Savary P. *Specificities of lipases*. *Journal of Lipid Research*. 1963 ; Vol 4 (4) : 369-384.

Dudonné S., Dubé P., Anhe F. F., Pilon G., Marette A., Lemire M., ..., Desjardins Y. *Comprehensive analysis of phenolic compounds and abscisic acid profiles of twelve native Canadian berries*. *Journal of Food Composition and Analysis* . 2015 ; Vol. 44 : 214-224.

Dyck R., Osgood N., Lin T.H., Gao A., Stang M.R. *Epidemiology of diabetes mellitus among First Nations and non-First Nations adults*. *CMAJ*. 2010 ; Vol. 182 (3) : 249-256.

Edirisinghe I., Burton-Freeman B. *Anti-diabetic actions of Berry polyphenols—Review on proposed mechanisms of action*. *Journal of Berry Research*. 2016 ; Vol. 6(2) : 237-250.

Eid H.M., Brault A., Ouchfoun M., Thong F., Vallerand D., Musallam L., Arnason J.T., Sweeney J., Haddad P.S. *Ligonberry (Vaccinium vitis-idaea) mobilizes L6 muscle GLUT4 transporters and exerts anti-obesity and antidiabetic effects in vivo*. *Austin Journal of Endocrinology and Diabetes*. 2014; Vol. 1(3): 1-11.

Eid H.M., Haddad P.S. *Mechanism of action of indigenous antidiabetic plants from the boreal forest of northeastern Canada*. *Advances in Endocrinology*. 2014; Vol. 2014: 1-11.

Eid H.M., Haddad P.S. *The antidiabetic potential of quercetin: underlying mechanisms*. *Current medicinal chemistry*. 2017 ; Vol. 24(4) : 355-364.

Eid H. M., Ouchfoun M., Saleem A., Guerrero-Analco J. A., Walshe-Roussel B., Musallam L., ..., Haddad P. S. *A combination of (+)-catechin and (-)-epicatechin underlies the in vitro adipogenic action of Labrador tea (Rhododendron Groenlandicum), an antidiabetic medicinal plant of the eastern James Bay Cree pharmacopeia*. *Journal of ethnopharmacology*. 2016 ; Vol. 178, 251-257.

El-Abhar H.S., Schaalán M.F. *Phytotherapy in diabetes: Review of potential mechanistic perspectives*. World Journal of Diabetes. 2014 ; Vol. 5 (2) : 176-197.

Elavarasi S., Saravanan K. *Ethnobotanical study of plants used to treat diabetes by tribal people of Kolli Hills, Namakkal District, Tamilnadu, Southern India*. International Journal of PharmTech Research. 2012 ; Vol. 4(1) : 404-411.

Elujoba A.A., Ajulo O.O., Iweibo G.O. *Chemical and biological analyses of Nigerian Cassia species for laxative activity*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 1989 ; Vol. 7(12) : 1453-1457.

Fabricant D.S., Farnsworth N.R. *The value of plants used in traditional medicine for drug discovery*. Environmental Health Perspectives. 2001; Vol. 109(1): 69-75.

Finkel T., Holbrook N.J. *Oxidants, oxydative stress and the biology of ageing*. Nature. 2000 ; Vol. 408 : 239-247.

Franz M.J., Zhang Z., Venn B.J. *Lifestyle Interventions to Stem the Tide of Type 2 Diabetes*. Dans: Temple N., Wilson T., Bray G. *Nutrition Guide for Physicians and Related Healthcare Professionals*. Nutrition and Health. Humana Press, Cham. 2017 : 103-112.

Fraser M.-H., Cuerrier A., Haddad P.S., Arnason J.T., Owen P.L., Johns T. *Medicinal plants Cree communities (Québec, Canada): antioxidant activity of plants used to treat type 2 diabetes symptoms*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 2007; Vol. 85: 1200-1214.

Fuglestad, F. *A history of Niger*. 1983 : 1850-1960.

Fuldner Kraft T. *Protective Potential of Fruits Against Diabetes and Its Complications* (Thèse de doctorat, Université d'Illinois, Etats-Unis). 2010.

de la Garza A.L., Milagro F.I., Boque N., Campion J., Martinez J.A. *Natural inhibitors of pancreatic lipase as new players in obesity treatment*. Planta Medica. 2011; Vol. 77(8) :773-785.

Gazzaneo L. R. S., De Lucena R. F. P., de Albuquerque U. P. *Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in an region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil)*. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine. 2005; Vol. 1(1) : 9.

Geels J. *Niger*. Bradt Travel Guides Ltd. England. 2006.

Ghorbani A., Moradi Marjaneh R., Rajaei Z., Hadjzadeh M. A. R. *Effects of Securigera securidaca extract on lipolysis and adipogenesis in diabetic rats*. Cholesterol. 2014.

Gilani A.H., Shaheen F., Zaman M., Janbaz K.H., Shah B.H., Akhtar M.S. *Studies of Antihypertensive and Antispasmodic Activities of Methanol Extract of Acacia nilotica Pods*. Phytotherapy Research. 1999 ; Vol 13 : 664-669.

Goldin A., Beckman J.A., Schmidt A.M., Creager M.A. *Advanced Glycation End Products, Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury*. Circulation. 2006 ; Vol. 114 : 597-605.

Gonzalez-Castejon M., Rodriguez-Casado A. *Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity : A review*. Pharmacological Research, Elsevier. 2011 ; Vol. 64 : 438-455.

Guerrero-Analco J.A., Muhammad A., Saleem A., Martineau L.C., Mussalam L., Eid H.M., Shang N., Black P., Cuerrier A., Haddad P.S., Arnason J.T. *Bioactive Phytochemicals from Canadian Boreal Forest Species Used Traditionally by Eastern James Bay Cree to Treat Diabetes Mellitus*. Chapter 4 in R. Jetter (ed.), *Phytochemicals—Biosynthesis, Function and Application*. Recent Advances in Phytochemistry. 2014; Vol. 44. Springer International Publishing

Haddad P. S., Musallam L., Martineau L. C., Harris C., Lavoie L., Arnason J. T., ..., Coon Com, E. *Comprehensive evidence-based assessment and prioritization of potential antidiabetic medicinal plants: a case study from canadian eastern james bay cree traditional medicine*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012. Vol. 2012.

Haman F., Fontaine-Bisson B., Batal M., Imbeault P., Blais J.M., Robidoux M.A. *Obesity and type 2 diabetes in Northern Canada's remote First Nations communities : the dietary dilemma*. International Journal of Obesity. 2010 ; Vol. 34 : S24-S31.

Hanley A.G.J., Harris S.B., Mamakeesick M., Goodwin K., Fiddler E., Hegele R.A., Spence J.D. *Complications of Type 2 Diabetes Among Aboriginal Canadians*. Diabetes Care. 2005 ; Vol. 28 (8) : 2054-2057.

Harbilas D., Martineau L.C., Harris C.S., Adeyiwola-Spoor D.C.A., et al. *Evaluation of the antidiabetic potential of selected plant extracts from the Canadian boreal forest used to treat symptoms of diabetes : part II*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 2009 ; Vol. 87 : 479- 492.

Harrigan R.A., Nathan M.S., Beattie P. *Oral Agents for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus : Pharmacology, Toxicity and Treatment*. Annals of Emergency Medicine. 2001 ; Vol. 38 (1) : 68-78.

Harris C. S., Cuerrier A., Lamont E., Haddad P. S., Arnason J. T., Bennett S. A., Johns T. *Investigating wild berries as a dietary approach to reducing the formation of advanced glycation endproducts: Chemical correlates of in vitro antiglycation activity*. Plant foods for human nutrition. 2014 ; Vol. 69(1) : 71-77.

Haslam E. *Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs : Possible Modes of Action*. Journal of Natural Products. 1996 ; Vol. 59 (2) : 205-215

Heck A.M., Yanovski J.A., Calis K.A. *Orlistat, a New Lipase Inhibitor for the Management of Obesity*. Pharmacotherapy. 2000 ; Vol. 20 (3) : 270-279.

Heinrich M. *Ethnobotany and its role in drug development*. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives. 2000 ; Vol. 14(7) : 479-488.

Heinrich M., Ankli A., Frei B., Weimann C., Sticher O. *Medicinal plants in Mexico: healers' consensus and cultural importance*. Social Science & Medicine. 1998; Vol. 47(11): 1859–1871.

Helal E.G.E., El-Wahab S.M.A., El Refaey H., Mohammad A.A. *Antidiabetic and Antihyperlipidemic Effet of Balanites aegyptiaca Seeds (Aqueous Extract) on Diabetic Rats*. The Egyptian Journal of Hospital Medecine. 2013 ; Vol. 52 : 727-739.

Hill R.J. *Poisonous plants of Pennsylvania*. Commonwealth of Pennsylvania, Department of General Servicesstate Bookstore. 1986.

Hummer K.E. *Rubus pharmacology: antiquity to the prensent*. American Society for Horticultural Science. 2010 ; Vol. 45(11) : 1587-1591.

Inngjerdigen K., Nergård C. S., Diallo D., Mounkoro P. P., Paulsen B. S. *An ethnopharmacological survey of plants used for wound healing in Dogonland, Mali, West Africa*. Journal of ethnopharmacology. 2004 ; Vol. 92(2-3) : 233-244.

Jeune Afrique http://www.jeuneafrique.com/Chiffres-pays_69_Niger (consulted on november 27th, 2012).

Johansen J.S., Harris A.K., Rychly D.J., Ergul A. *Oxidative stress and the use of antioxydants in diabetes : Linking basic science to clinical practice*. Cardiovascular Diabetology. 2005 ; Vol 4. (5) : 1-11.

Karppinen K., Zoratti L., Nguyenquynh N., Häggman H., Jaakola L. *On the development and environmental regulation of secondary metabolism in Vaccinium spp. berries*. Frontiers in Plant Science. 2016; Vol. 7(655): 1-9.

Klein S., Sheard N.F., Pi-Sunyer X., Daly A., Wylie-Rosett J., Kulkarni K., Clark N.G. *Weight Management Through Lifestyle Modification for the Prevention and Management of Type 2 Diabetes : Rationale and Strategies*. Diabetes Care. 2004 ; Vol. 27 (8) : 2067-2073.

Koca I, Koca AF. *Poisoning by mad honey: A brief review*. Food and Chemical Toxicology. 2007; Vol. 45; 1315-1318.

Kopelman P.G. *Obesity as a medical problem*. Nature. 2000 ; Vol. 404 : 635-643.2

Kuzmina E., Dannenbaum D., Torrie J. *Cree Diabetes Information System (CDIS) 2009 Annual Report*. Public Health Department, Cree Board of Health and Social Services of James Bay. 2010. Version révisée en janvier 2011. Québec.

Lazar M.A. *How obesity causes diabetes: not a tall tale*. Science. 2005 ; Vol. 307(5708) : 373-375.

Ladio A. H., Lozada M. *Patterns of use and knowledge of wild edible plants in distinct ecological environments: a case study of a Mapuche community from northwestern Patagonia*. Biodiversity & Conservation. 2004 ; Vol. 13(6) : 1153-1173.

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 using quantitative ethnobotany*. Journal of Ethnopharmacology, Elsevier. 2006 ; Vol. 105 : 55-63.

Lewis W.H., Elvin-Lewis M.P.F. *Medical Botany : Plants affecting human health*. 2^e éd. New Jersey : Wiley & Sons ; 2003.

Li S., Brault A., Sanchez Villavicencio M., Haddad P.S. *Rhododendron groenlandicum (Labrador tea), an antidiabetic plant from the traditional pharmacopoeia of the Canadian Eastern James Bay Cree, improves renal integrity in the diet-induced obese mouse model*. Pharmaceutical biology. 2016; Vol. 54(10): 1998-2006.

Li S., Pasquin S., Eid H.M., Gauchat J.-F., Saleem A., Haddad P.S. *Anti-apoptotic potential of several antidiabetic medicinal plants of the eastern James Bay Cree pharmacopoeia in cultured kidney cells*. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2018; Vol. 18(37): 1-15.

Lin D., Xiao M., Zhao J., Li Z., Xing B., Li X., ... Chen H. *An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes*. Molecules. 2016 ; Vol. 21(10) : 1374.

Little T.J., Horowitz M., Feinle-Bisset C. *Modulation by high-fat diets of gastrointestinal function and hormones associated with the regulation of energy intake: implications of pathophysiology of obesity*. American Journal of Clinical Nutrition. 2007; Vol. 86: 531-541.

Lunagariya N.A., Patel N.K., Jagtap SC, Bhutani KK. *Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art and clinical perspectives*. EXCLI Journal. 2014; Vol. 13: 897-921.

Lund-Andersen H. *Transport of Glucose for Blood to Brain*. Physiological Reviews. 1979 ; Vol. 59 (2) : 305-352.

Madubuike G. K., Onoja S. O., Ezeja M. I. *Antioxidant and Hepatoprotective Activity of Methanolic Extract of Cassia sieberiana Leaves in Carbon Tetrachloride-induced Hepatotoxicity in Rats*. J Adv Med Pharmaceut Sci. 2015 ; Vol. 2(1) : 1-9.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. *Polyphenols : food sources and bioavailability*. The American Journal of Clinical Nutrition. 2004 ; Vol. 79 : 227-247.

Marbella A.M., Harris M.C., Diehr S., Ignace G., Ignace G. *Use of Native American Healers Among Native American Patients in an Urban Native American Health Center*. Arch Fam Med. 1998 ; Vol. 7 : 182-185.

Marín L., Miguélez E.M., Villar C.J., Lombó F. *Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties*. BioMed research international. 2015; Vol. 2015.

Marles R.J., Farnsworth N.R. *Antidiabetic plants and their active constituents*. Phytomedicine. 1995 ; Vol. 2(2) : 137-189.

McDougall G.J., Kulkarni N.N., Stewart D. *Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity in vitro*. Food Chemistry, Elsevier. 2009 ; Vol. 115 : 193-199.

McNeely W., Benfield P. *Orlistat*. Drugs. 1999 ; Vol. 56 (2) : 241-249.

Mela D.J., Sacchetti D.A. *Sensory preferences for fats: relationships with diet and body composition*. The American journal of clinical nutrition. 1991; Vol. 53(4), 908-915.

Mendes A.A., Oliveira P.C., de Castro H.F. *Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase*. Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic. 2012 ; Vol. 78 : 119-134.

Miller W.C., Lindeman A.K., Wallace J., Niederpruem M. *Diet composition, energy intake, and exercise in relation to body fat in men and women*. The American journal of clinical nutrition. 1990; Vol. 52(3) : 426-430.

Misra A., Singhal N., Khurana L. *Obesity, the Metabolic Syndrome, and Type 2 Diabetes in Developing Countries : Roles of Dietary Fats and Oils*. Journal of American College of Nutrition. 2013; Vol. 29 (3) : 289S-301S.

Moore P.E., Kruse H.D., Tisdall F.F., Corrigan R.S.C. *Medical Survey of Nutrition among the Northern Manitoba Indians*. The Canadian Medical Association Journal. 1946 ; Vol. 54. 223-233.

Motcho K.H. *Cadre de vie et systèmes de santé à Niamey (Niger)* (Doctoral dissertation, Bordeaux 3, 1991).

Mukherjee M. *Human digestive and metabolic lipases – a brief review*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2003; Vol. 22: 369-376.

Nagao T., Hase T., Tokimitsu I. *A green tea extract high in catechins reduces body fat and cardiovascular risks in humans*. Obesity. 2007; Vol. 15(6): 1473-1483.

Nagao T., Meguro S., Hase T., Otsuka K., Komikado M., Tokimitsu I., Yamamoto T., Yamamoto K. *A catechin-rich beverage improves obesity and blood glucose control in patients with type 2 diabetes*. Obesity. 2009; Vol. 7(2): 310-317.

Nakai M., Fukui Y., Asami S., Toyoda-Ono Y., Iwashita T., Shibata H., ..., Kiso Y. *Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase in vitro*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005 ; Vol. 53(11) : 4593-4598.

Neel J.V. *Diabetes Mellitus : A «Thrifty» Genotype Rendered Detrimental by «Progress» ?* American Journal of Human Genetics. 1962 ; Vol. 14(4) : 353.

Neel J.V. *The «Thrifty Genotype» in 1998*. Nutrition Reviews. 1999 ; Vol. 57 (5) : S2-S9.

Ocloo A., Dongdem, J. T. *Mitochondria as pharmacological targets: The discovery of novel anti-obesity mitochondrial uncouplers from Africa's Medicinal Plants*. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. 2012; Vol. 9(2), 256-256.

Ogurtsova K., da Rocha Fernandes J.D., Huang Y., Linnenkamp U., Guariguata L., Cho N.H., Cavan D., Shaw J.E., Makaroff L.E. *IDF Diabetes Atlas : Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040*. Diabetes Research and Clinical Practice. Elsevier. 2017; Vol. 128 : 40-50.

Oi Y., Hou I-C., Fujita H., Yazawa K. *Antiobesity effect of Chinese black tea (Pu-erh tea) extract and gallic acid*. Phytotherapy Research. 2012; Vol. 26: 475-481.

Organisation Mondiale de la Santé (OMS). *Rapport mondial sur le diabète*. 2016.

Oubre A.Y., Carlson T.J., King S.R., Reaven G.M. *From plant to patient: an ethnomedical approach to the identification of new drugs for the treatment of NIDDM*. *Diabetologia*. 1997 ; Vol. 40(5) : 614-617.

Oztasan N., Altinkaynak K., Akçay F., Göçer F., Dane Ş. *Effects of mad honey on blood glucose and lipid levels in rats with streptozocin-induced diabetes*. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2005 ; Vol. 29(5) : 1093-1096.

Padwal R.S., Majumdar S.R. *Drug treatments for obesity : orlistat, sibutramine and rimonabant*. *The Lancet*. 2007 ; Vol. 369 : 71-77.

Pan A., Sun Q., Bernstein A.M., Schulze M.B., Manson J.E., Willet W.C., Hu F.B. *Red meat consumption and risk of type 2 diabetes : 3 cohorts of US adults and an update meta-analysis*. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2011; Vol. 94 : 1088-1096.

Pei K., Ou, J., Huang J., Ou S. *p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2016; Vol. 96(9): 2952-2962.

Popkin B.M., Adair L.S., Wen Ng S. *Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries*. *Nutrition Reviews*. 2012 ; Vol. 70 (1) : 3-21.

Prentki M., Nolan C.J. *Islet β cell failure in type 2 diabetes*. *The Journal of Clinical Investigation*. 2006 ; Vol. 116 (7).

Rajvaidhya S., Nagori B.P., Singh G.K., Dubey B.K., Desai P., Jain S. *A Review on Acacia arabica – An Indian Medicinal Plant*. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*. 2012 ; Vol. 3(7) : 1995-2005.

Rapinski M. *Ethnobotanique de la Nation crie d'Eeyou Istchee et variation géographique des plantes médicinales antidiabétiques* (Master thesis, University of Montreal), 2012.

Ríos J.L., Francini F., Schinella G.R. *Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus*. *Planta medica*. 2015 ; Vol. 81(12/13) : 975-994.

Ritz C., Baty F., Streibig J. C., Gerhard D. *Dose-response analysis using R*. *PloS one*. 2015 ; Vol. 10(12) : e0146021.

Robinson E. *The Health of the James Bay Cree*. *Can Fam Physician*. 1988 ; Vol. 34 : 1606-1613.

Rose A.J., Richter E.A. *Skeletal Muscle Glucose Uptake During Exercise : How is it Regulated?* Physiology. 2005 ; Vol. 20 : 260-270.

Saadou M. *Evaluation de la biodiversité biologique au Niger : éléments constitutifs de la biodiversité végétale*. Conseil National de l'Environnement pour un Développement Durable SE/CNEDD. Projet NER/ 97 / G 31 / A / 1 G / 99 "Stratégie Nationale et plan d'action - Diversité Biologique". 1998. 138p.

Saleem A., Harris C.S., Asim M., Cuerrier A., Martineau L., Haddad P. S., Arnason J.T. *A RP-HPLC-DAD-APCI/MSD method for the characterisation of medicinal Ericaceae used by the Eeyou Istchee Cree First Nations*. Phytochemical analysis. 2010 ; Vol. 21(4) : 328-339.

Sawadogo W.R., Schumacher M., Teiten M.H., Dicato M., Diederich M. *Traditional West African pharmacopeia, plants and derived compounds for cancer therapy*. Biochemical pharmacology. 2012 ; Vol. 84(10) : 1225-1240.

Saxena M., Saxena J., Nema R., Singh D., Gupta A. *Phytochemistry of Medicinal Plants*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2013 ; Vol. 1 (6) : 168-182.

Scalbert A., Manach C., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. *Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2005 ; Vol 45 : 287-306.

Seeram N.P. *Berry Fruits : Compositional Elements, Biochemical Activities, and the Impact of their Intake on Human Health, Performance and Disease*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2008 ; Vol. 56 : 627-629.

Sergent T., Vanderstraeten J., Winand J., Beguin P., Schneider Y-J. *Phenolic compounds and plant extracts as potential natural anti-obesity substances*. Food Chemistry, Elsevier. 2012 ; Vol. 135 : 68-73.

Shils M.E., Shike M. (Eds.). *Modern nutrition in health and disease*. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

Singh R., Barden A., Mori T., Beilin L. *Advanced glycation end-products : a review*. Diabetologia. 2001 : Vol. 44 : 129-146.

Song R. *Mechanism of metformin: a tale of two sites*. Diabetes care. 2016 ; Vol. 39(2) : 187-189.

Sop T.K., Oldeland J., Schmiedel U., Ouedraogo I., Thiombiano A. *Population structure of three woody species in four ethnic domains of the sub-sahel of Burkina Faso*. Land Degradation & Development. 2011 ; Vol. 22(6) : 519-529.

Spoor D.C.A., Martineau L.C., Leduc C., Benhaddou-Andaloussi A., et al. *Selected plant species from the Cree pharmacopoeia of northern Quebec possess anti-diabetic potential*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 2006 ; Vol. 84 : 847-858.

Tam TW, Liu R, Arnason JT, Krantis A, Staines WA, Haddad PS, Foster BC. *Actions of ethnobotanically selected Cree anti-diabetic plants on human cytochrome P450 isoforms and flavin-containing monooxygenase 3*. Journal of Ethnopharmacology. 2009; Vol. 126: 119-126.

Thomas D.E., Elliot E.J., Naughton G.A. *Exercise for type 2 diabetes mellitus*. Cochrane Database Syst Rev. 2006 ; Vol. 3.

Tiwari A.K., Rao J.M. *Diabetes mellitus and multiple therapeutic approaches of phytochemicals : Present status and future prospect*. Current Science. 2002 ; Vol. 83 (1) : 30-38.

Touré A., Xu X., Michel T., Bangoura M. *In vitro antioxydant and radical scavenging of Guinean kinkeliba leaf (Combretum micranthum G. Don) extracts*. Natural Product Research. 2011 ; Vol. 25 (11) : 1025-1036.

Trotter R.T., Logan M.H., Etkin N.L. *Plants in indigenous medicine and diet*. New York: Redgrave. 1986 :91-112.

Tuomilehto J., Lindstrom J., Eriksson J.G., Valle T.T. et al. *Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance*. The New England Journal of Medicine. 2001 ; Vol. 344 (18) : 1343-1350.

U.S. Department of State, 2012 (<http://www.state.gov/r/pa/ei/bgn/5474.htm>).

Verma L., Khatri A., Kaushik B., Patil U. K., Pawar R. S. *Antidiabetic activity of Cassia occidentalis (Linn) in normal and alloxan-induced diabetic rats*. Indian Journal of Pharmacology. 2010 ; Vol. 42(4) : 224.

Vivian R.P., McMillan C., Moore P.E., Robertson E.C., Sebrell W.H., Tisdall F.F., McIntosh W.G. *The Nutrition and Health of the James Bay Indian*. The Canadian Medical Association Journal. 1948 ; Vol. 59 (6) : 505-518.

Whiting D.R., Guariguata L., Weil C., Shaw J. *IDF Diabetes Atlas : Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030*. Diabetes Research and Clinical Practice. 2011; Vol. 94 : 311-321.

Williams D.J., Edwards D., Hamering I., Jian L., James A.P., Johnson S.K., Tapsell L.C. *Vegetable containing phytochemicals with potential anti-obesity properties : A review*. Food Research International, Elsevier. 2013 ; Vol. 52 : 323-333.

Wink M. *Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores*. Theoretical and applied genetics. 1988 ; Vol. 75(2) : 225-233.

World Health Organization. *Prevention of diabetes mellitus*. Report of a WHO Study Group. Geneva: World Health Organization. 1994. No. 844.

World Health Organization. *WHO Traditional medicine strategy 2002-2005*. World Health Organization, 2002.

World Health Organization. 2019 (<http://www.who.int/countries/ner/fr/>) consulté le 14 novembre 2019.

You Q., Chen F., Wang X., Jiang Y., Lin S. *Anti-diabetic activities in phenolic compounds in muscadine against alpha-glucosidase and pancreatic lipase*. LWT – Food Science and Technology. 2012; Vol. 46: 164-168.

Young T.K., Reading J., Elias B., O'Neil J.D. *Type 2 diabetes mellitus in Canada's First Nations : status of an epidemic in progress*. The Canadian Medical Association Journal. 2000 ; Vol. 163 (5) : 561-566.

Yuda N., Tanaka M., Suzuki M., Asano Y., Ochi H., Iwatsuki K. *Polyphenols extracted from black tea (Camellia sinensis) residue by hot-compressed water and their inhibitory effect on pancreatic lipase in vitro*. Journal of food science. 2012 ; Vol. 77(12) : H254-H261.

Zerbo A., Koudou J., Ouédraogo N., Ouédraogo R., Guissou I.P. *Antioxydant and antibacterial activities of Piliostigma reticulatum (DC.) Hochst extracts*. African Journal of Biotechnology. 2010 ; Vol. 9 (33) : 5407-5411.

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