

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE ET DE L'ENVIRONNEMENT

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

ANNEE : 2013

N^o : 57

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Environnement

Présentée et soutenue le 14 Décembre 2013

Par

Anastasie MANGA

**Sujet : Valorisation médicinale d'une plante des jachères, *Icacina oliviformis*
(Poiret) Raynal (Icacinaceae) : études chimiques et pharmacologiques**

Jury :

Président :	Bienvenu	SAMBOU	: Maître de conférences
Rapporteur :	Aliou	GUISSE	: Professeur titulaire
Rapporteur :	Mady	CISSE	: Maître de conférences
Examineur :	Guata Yoro	SY	: Professeur titulaire
Directeur de Thèse :	Emmanuel	BASSENE	: Professeur titulaire
Co-encadreur de Thèse :	Abdoulaye	GASSAMA	: Maître assistant

Dédicaces

Cette thèse représente l'aboutissement du soutien et des encouragements qui m'ont été prodigués tout le long de ma scolarité par les parents et amis.

Je dédie ce travail à :

- Mes chers enfants Fulbert Sédar et Jacques Emmanuel Burlo
- Tous mes frères et sœurs
- Mon amour Jean Joseph Badji
- Ma tante Christine Diédhiou
- La famille Senghor
- La famille Traoré de Oussouye
- Thimotée Miyouna
- Mme Kady Badji Diatta.
- Catherine et famille
- Tous mes camarades de promotion

In Memoriam

- A ma mère et mon père
- A mes amies Pascaline et Maty
- A Seydou Traoré

N'eut été vos conseils avisés et votre soutien permanent, je ne serais jamais arrivé à ce stade. Que la terre vous soit légère.

Remerciements

Nous ne saurions introduire ce travail sans dire tous nos remerciements et notre profonde gratitude:

A nos Maîtres et membres du jury :

Pr Emmanuel BASSENE, professeur titulaire, chef de département du laboratoire de pharmacognosie et botanique (FMPO). Je vous exprime ma profonde gratitude pour m'avoir accepté dans votre laboratoire malgré vos multiples occupations. Vos qualités scientifiques, votre disponibilité, votre générosité et votre modestie ont été d'un apport considérable dans l'élaboration de ce mémoire de thèse. Soyez assuré de notre profonde administration, de notre respect et de notre reconnaissance éternelle.

Dr Abdoulaye GASSAMA, Maître assistant à l'université Assane SECK de Ziguinchor, Je vous exprime ma profonde gratitude pour la confiance que vous m'avez accordée dès le premier jour. Je vous remercie pour votre modestie, votre soutien matériel et moral, votre disponibilité sans faille à diriger la réalisation de ce travail.

Pr Guata Yoro SY, professeurs à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie, Grace à votre goût du travail bien fait, nous avons beaucoup apprécié votre apport dans la réalisation de ce travail et malgré vos nombreuses occupations. Veuillez croire, à l'assurance de notre sincère reconnaissance.

Pr Bienvenu SAMBOU, Maître de conférences à la Faculté des Sciences et Techniques, Directeur de l'Institut des Sciences de l'Environnement. Vous me faites un grand plaisir en acceptant de présider ce jury malgré vos multiples occupations. Vos qualités Scientifiques vous ont valu toute l'estime dont vous jouissez aujourd'hui. Veuillez accepter mes considérations les plus sincères.

Pr Aliou GUISSSE, professeur à la Faculté des Sciences et Techniques. Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail, malgré vos occupations. Nous ne pouvons vous remercier pour votre contribution à notre formation.

Pr Djibril FALL, Maître de conférences à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie pour votre entière disponibilité à juger notre travail malgré votre calendrier très chargé.

Pr Mady CISSE, Maître de conférences à l'école supérieure polytechnique. Nous avons été touchés par la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de siéger dans ce jury. Nous vous remercions pour votre disponibilité et votre compréhension.

Au personnel du Laboratoire de Pharmacognosie et Botanique de l'Université Cheikh Anta DIOP de Dakar : Pr Emmanuel BASSENE, Dr Alioune Dior FALL, Dr William DIATTA, Dr Kady DIATTA BADJI, Abdou SARR, Moussa MANGA, Francis TENDENG, Madame DIONE, Ibrahima FALL, Madame BASSENE, Mor YADE, Elimane SARR, Mbaye DIENG, Brigitte BASSENE, Charlot DIATTA, Claire Rose. Que DIEU nous préserve de tout esprit maléfique.

Au personnel du Laboratoire de Pharmacologie de l'Université Cheikh Anta DIOP de Dakar : Pr Gatta Yoro Sy, Mr Birame Faye, Mr Mbassa.

Au personnel du Laboratoire de Chimie et Physique des Matériaux de l'Université Assane SECK de Ziguinchor : Dr Abdoulaye Gassama, Dr Maguette CAMARA, Dr Mbaye DIAGNE, Dr Chérif BALDE, Mme Fatoumata CAMARA SOUMARE, Mme Fatou KANE.

Je tiens tout particulièrement à remercier ma famille, mes parents, je leur exprime ici un immense merci pour leur amour, leur générosité et leur confiance en moi.

Je remercie aussi très chaleureusement ma grande sœur Ola MANGA pour son soutien inconditionnel.

Je remercie Jean Joseph BADJI de m'avoir aidé et soutenu durant tous ces années universitaires.

Je remercie également à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

En fin, notre travail de thèse a été réalisé grâce au soutien financier de l'Etat de Sénégal qui nous a accordé le Fond d'Impulsion pour la Recherche Scientifique et Technique (FIRST).

GLOSSAIRE

ADN:	Adénosine dinucléotide
AMP:	Adénosine monophosphate
ARN:	Adénosine ribonucléique
ARNm:	ARN messenger
CCM:	Chromatographie sur couche mince
COSY:	Correlated spectroscopy
DEPT:	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO:	Diméthyl sulfoxide
FAEM:	Fraction acétate d'éthyle méthanol
FEB :	Fraction éthanolique brute
HGPO :	Hyperglycémie provoquée par voie orale
HMBC:	Heteronuclear multiple bond correlation
HPLC :	Chromatographie liquide haute performance
HSQC:	Heteronuclear single quantum correlation
MS:	Spectrométrie de masse
LDL:	Low density lipoprotein
OMS :	Organisation mondiale de la santé
Rf :	Rapport frontal
RMN :	Radiation magnétique nucléaire
UV :	Ultra violet

INDEXE DES TABLEAUX

Tableau I :	Protocole de dosage du glucose.....	65
Tableau II:	Rendement de l'extraction par épuisement avec des solvants de polarité croissante	69
Tableau III :	Rendement de fractionnement de la fraction éthanolique brute (FEB)	69
Tableau IV :	R _f des composés flavonoïdiques après révélation.....	70
Tableau V :	R _f des composés tanniques après révélation	72
Tableau VI :	Attribution de numéro des atomes de carbones et d'hydrogènes de AG2 (DMSO-d ₆).....	81
Tableau VII :	Corrélation entre les atomes d'hydrogène du spectre COSY ¹ H- ¹ H (Figures 33, 34, et 35) de AG2	89
Tableau VIII:	Corrélations HMBC entre des atomes de carbones et d'hydrogènes	93
Tableau IX :	Comparaison du fragment sucre de AG2 et AG3 avec celui de la littérature.....	105
Tableau X :	Attribution du numéro des atomes de carbones et d'hydrogènes de AG3 (DMSO-d ₆)	108
Tableau XI :	Corrélations du spectre COSY ¹ H- ¹ H obtenu sur le spectre COSY (figures 51, 52 et 53) de AG3.....	118
Tableau XII :	Corrélations HMBC obtenues grâce à une interprétation des spectres HMBC (figures 54-56) de AG3.....	122
Tableau XIII:	Attribution du numéro des atomes de carbones et d'hydrogènes de AG4 dans CD ₃ OD	131
Tableau XIV:	Corrélation COSY ¹ H- ¹ H	140
Tableau XV :	Corrélation HMBC (figures 71 -76) de AG4.....	145
Tableau XVI :	valeurs moyennes de la glycémie (g/L) chez des rats normo glycémiques	190

Tableau XVII :	valeurs moyennes de la glycémie (g/L) sur un modèle de tolérance au glucose chez des rats	190
Tableau XIII :	valeurs moyennes de la glycémie (g/L) chez des rats Diabétiques de type 2	191

INDEXE DES FIGURES

Figure 1: <i>Icacina oliviformis</i> (Poiret) Raynal.....	7
Figure 2: <i>Icacina oliviformis</i>	8
Figure 3 : Distribution de <i>Icacina oliviformis</i> en Afrique.....	10
Figure 4 : Graines et tubercules de <i>Icacina oliviformis</i>	12
Figure 5 : Quelques structures chimiques de <i>Icacina</i>	16
Figure 6 : Structure chimique de l'alloxane	23
Figure 7 : Structure chimique de deux flavonoïdes O- et C-hétéroside.....	36
Figure 8 : Exemple de deux structures de flavonoïdes.....	36
Figure 9 : Structures de l'acide gallique et d'un tanin gallique.....	38
Figure 10 : Schéma de l'extraction des feuilles de <i>Icacina oliviformis</i>	50
Figure 11 : Schéma du fractionnement de la FEB	51
Figure 12 : Chromatogramme de la caractérisation des flavonoïdes visualisé sous UV	71
Figure 13 : Chromatogramme obtenue par la caractérisation des tanins	72
Figure 14: Spectre UV de la FAEM	73
Figure 15: Spectre LC/MS de la FAEM à 319 nm	73
Figure 16: Spectre MS du pic élué à 15 min en mode négatif.....	74
Figure 17: Spectre MS des pics détectés à 23 et 24 min en mode positif (isomères).....	74
Figure 18 : Chromatogramme HPLC analytique de la FAEM	75
Figure 19 : Spectre UV du pic 18 (temps de rétention 4,90 mn).....	75
Figure 20 : Spectre UV du pic 21 (temps de rétention 5,90 mn)	76
Figure 21 : Spectre UV du pic 25 (temps de rétention 7,80 mn).....	76
Figure 22: Spectre UV du pic 27 (temps de rétention 9,11mn).....	77
Figure 23: Spectre UV du pic 28 (temps de rétention 10,20 mn).....	77
Figure 24 : Chromatogramme HPLC semi préparatif de la FAEM.....	78

Figure 25 : Spectre ^1H de la molécule AG2.....	83
Figure 26 : Spectre ^{13}C de la molécule AG2.....	84
Figure 27 : Spectre de ^{13}C DEPT 135 de la molécule AG2.....	85
Figure 28 : Spectre HSQC de AG2	86
Figure 28 : Spectre HSQC de AG2 agrandissement	87
Figure 30 : Spectre COSY ^1H - ^1H de AG2	90
Figure 31 : Spectre du COSY ^1H - ^1H avec agrandissement de la zone aromatique de AG2	91
Figure 32 : Spectre COSY ^1H - ^1H de la partie osidique de AG2.....	92
Figure 33 : Spectre HMBC de AG2	95
Figure 34 : Spectre HMBC de AG2 avec agrandissement de la zone des phénols.....	96
Figure 35 : Spectre HMBC de AG2 avec agrandissement de la zone des protons aromatiques	97
Figure 36 : Spectre HMBC de AG2 avec agrandissement de la zone des carbones quaternaires sp^2	98
Figure 37 : ... Spectre HMBC de AG2 avec agrandissement de la zone osidique.	
Figure 38 : Spectre de masse de la molécule 1 (AG2)	100
Figure 39 : Spectre Infra Rouge de AG2 dans KBr	101
Figure 40: Spectre de ^1H de la molécule AG3 dans le DMSO-d_6	110
Figure 41: Spectre de ^1H de la molécule AG3 dans le DMSO-d_6 avec agrandissement.....	111
Figure 42: Spectre ^{13}C de AG3 dans DMSO-d_6	112
Figure 43 : Agrandissement du spectre carbone ^{13}C de AG3	113
Figure 44 : Spectre ^{13}C DEPT 135 de AG3	114
Figure 45 : Spectre HSQC de AG3 dans DMSO-d_6	115
Figure 46 : Spectre HSQC de AG3 avec agrandissement de la zone des protons aromatiques.....	116
Figure 47: Spectre HSQC de AG3 avec agrandissement de la zone osidique ..	117

Figure 48 : Spectre du COSY ^1H - ^1H de AG3 dans DMSO- d_6	119
Figure 49 : Spectre COSY ^1H - ^1H avec agrandissement de la zone protons aromatiques de AG3.....	120
Figure 50 : Spectre COSY ^1H - ^1H de AG3 avec agrandissement de la zone osidique.....	121
Figure 51 : Spectre HMBC de AG3 dans DMSO- d_6	123
Figure 52 : Spectre HMBC avec agrandissement de la zone des carbones quaternaires aromatiques et le OH (13,3ppm) de AG3	124
Figure 53: Spectre HMBC avec agrandissement de la zone protons aromatiques de AG3.....	125
Figure 54 : Spectre HMBC avec agrandissement de la zone osidique de AG3	126
Figure 55 : Spectre de masse de AG3 de formule brute $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$ de $M = 448$	128
Figure 56 : Spectre infra rouge de AG3 dans KBr.....	129
Figure 57: Spectre ^1H de AG4 dans CD_3OD	132
Figure 58 : Spectre ^1H de AG4 avec agrandissement	133
Figure 59 : Spectre ^{13}C de AG4 (CD_3OD).....	134
Figure 60 : Spectre ^{13}C de AG4 avec agrandissement.....	135
Figure 61 : Spectre de ^{13}C DEPT 135 mettant en évidence les CH/ CH_3 et CH_2 dans CD_3OD	136
Figure 62 : Spectre HSQC de AG4 dans CD_3OD	137
Figure 63: Spectre HSQC de AG4 avec zoom de la zone des protons aromatique (CD_3OD).....	138
Figure 64 : Spectre HSQC de AG 4 avec zoom de la zone aliphatique.....	139
Figure 65 : Spectre de COSY ^1H - ^1H de AG4 (CD_3OD).....	141
Figure 66 : Spectre COSY ^1H - ^1H de AG4 avec agrandissement de la zone des protons aromatiques	142

Figure 67 : Spectre COSY ¹ H- ¹ H de AG4 avec agrandissement de la zone 6,4 à 7,2 ppm	143
Figure 68 : Spectre COSY ¹ H- ¹ H de AG4 avec agrandissement de la zone aliphatique mettant en évidence le couplage entre H-17 et H-18	144
Figure 69 : Spectre HMBC de la molécule AG4	146
Figure 70 : Spectre HMBC de AG4 avec agrandissement de la zone aromatique.....	147
Figure 71 : Spectre HMBC de AG-4 avec agrandissement.....	148
Figure 72 : Spectre HMBC de AG-4 avec élargissement de 114 à 119 ppm...	149
Figure 73 : Spectre HMBC de AG-4 avec élargissement de la section aliphatique.....	150
Figure 74 : Spectre HMBC de AG-4 avec élargissement de la section 114 à 134 ppm	151
Figure 75 : Spectre de masse ESI+ de la molécule AG-4	153
Figure 76 : Spectre Infra-Rouge de AG-4.....	154
Figure 77 :Variations de la glycémie chez des rats normo-glycémiques après administration de la FEB et de la FA de feuilles de <i>Icacina oliviformis</i>	158
Figure 78 : Variations de la glycémie chez des rats soumis à un test de tolérance au glucose après administration de la FEB et de la FAEM de feuilles de <i>Icacina oliviformis</i>	159
Figure 79 : ...Variations de la glycémie chez des rats diabétiques de type 2 après administration quotidienne du glibenclamide et de la FAEM	160

Indexe des schémas

Schéma 1 : 2',3, 4',4'-tétrahydroxyflavone ; 6-C- β -D ou l-O-Glycopyranoside	80
Schéma 2 : Numérotation conventionnelle de la molécule AG2	105
Schéma 3 : Structure de la molécule AG3 (numérotation basée sur les $\delta^{13}\text{C}$)	106
Schéma 4 : Réarrangement de Wessely-Moser.....	108
Schéma 5 : Structure du <i>trans</i> (S,E)-(-)-Clovamide	130

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
PREMIERE PARTIE: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	4
Chapitre 1 : Généralités sur <i>Icacina oliviformis</i> (Poiret) Raynal	5
I. Systématique	5
II. Description botanique.....	7
II.1. Les racines	7
II.2. Les tiges	7
II.3. Les feuilles	8
II.4. Les fleurs.....	9
II.5. Les fruits	9
III. Répartition géographique	9
III.1. En Afrique	9
III.2. Au Sénégal.....	11
IV. Ecologie.....	11
V. Usages.....	12
V.1. Usages alimentaires.....	12
V.2. Usages en médecine traditionnelle	12
V.2.1. Les racines	12
V.2.2. Les feuilles.....	13
VI. Quelques données chimiques sur le genre <i>Icacina</i>	14
VI.1. Les graines.....	14
VI.2. les tubercules	14
Chapitre2 : Généralités sur le diabète	17
I. Régulation physiologique de la glycémie.....	17
I.1. Régulation hormonale	17
I.1.1. Système hypoglycémiant	17

I.1.1.1. Structure de l'insuline	17
I.1.1.2. Biosynthèse de l'insuline	18
I.1.1.3. Action physiologique de l'insuline.....	18
I.1.2. Système hyperglycémiant	19
I.2. Régulation nerveuse de la glycémie.....	20
II. Diabète sucré.....	20
II.1. Définition	20
II.2. Diabète de type 1.....	21
II.2.1. Physiopathologie du diabète de type 1.....	21
II.2.1.1. Prédisposition génétique	22
II.2.1.2. Facteurs environnementaux	24
II.3. Diabète de type 2.....	25
II.3.1. Physiopathologie du diabète de type 2.....	26
II.3.1.1. Facteurs génétiques	26
II.3.1.2. Facteurs métaboliques	26
II.3.1.3. Facteurs environnementaux	28
II.4. Stress oxydatif dans la pathologie du diabète.....	29
II.4.1. Oxydation par l'alloxane	29
II.4.2. Conséquences biochimiques du stress oxydant	30
II.4.2.1. Oxydation des lipides	30
II.4.2.2. Oxydation de l'ADN	31
II.4.2.3. Oxydation des protéines	32
II.4.3. Substances naturelles anti-oxydantes.....	32
II.4.3.1. La vitamine C	33
II.4.3.2. La vitamine E	33
II.4.3.3. Le β -carotène.....	34
II.4.3.4. Les polyphénols.....	34
II.5. Phytothérapie antidiabétique	38
Conclusion partielle	46

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE	47
Chapitre 3 : Etudes Phytochimiques des feuilles de <i>Icacina oliviformis</i>	
(Poiret) Raynal (Icacinaceae)	48
I. Extraction et fractionnement.....	48
I.1. Matériel	48
I.1.1. Matériel végétal	48
I.1.2. Matériel de laboratoire	48
I.2. Méthodes	49
I.2.1. Extraction par des solvants de polarité croissante	49
I.2.2. Fractionnement de la FEB sur colonne de silice	51
II. Identification des principes actifs	51
II.1. Caractérisation de la FEB et FAEM par CCM.....	52
II.1.1. Matériel	52
II.1.2. Méthodes	52
II.1.2.1. Caractérisation des flavonoïdes	52
II.1.2.2. Caractérisation des tanins	52
II.1.2.3. Caractérisation des alcaloïdes	53
II.2. Analyses spectrales.....	53
II.2.1. Spectrométrie d'absorption (UV, IR).....	54
II.2.1.1. Principe de la spectrométrie UV-visible.....	54
II.2.1.2. Principe de la spectrométrie Infra-Rouge (IR)	54
II.2.1.3. Matériel	54
II.2.2. Chromatographie liquide haute performance (HPLC).....	55
II.2.2.1. Principe	55
II.2.2.2. Matériel	55
II.2.3. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	56
II.2.3.1. Principe	56
II.2.3.2. Matériel	59
II.2.4. Spectrométrie de masse (SM)	59

II.2.4.1. Principes.....	59
II.2.4.2. Matériel.....	59
II.3. Méthode d'identification de molécules.....	59
Chapitre 4 : Etudes de l'activité anti-hyperglycémiant des feuilles de	
<i>Icacina oliviformis</i>	62
I. Matériel	62
I.1. Matériel biologique.....	62
I.2. Matériel de laboratoire.....	62
II. Méthodes.....	63
II.1. Mise en place des modèles diabétiques.....	63
II.2. Dosage du glucose sérique.....	64
II.3. Recherche de l'activité des fractions sur le glucose sanguin	66
II.3.1. Essais chez des rats normo-glycémiques.....	66
II.3.2. Essais chez les rats en hyperglycémie temporaire	66
II.3.3. Essais chez les rats diabétiques de type 2 ou alloxaniques	67
II.4. Analyse statistique et expression des résultats	68
Chapitre 5 : Résultats et discussions.....	69
I. Etude chimique.....	69
I.1. Rendements des extractions	69
I.1.1. Extraction par gradient de polarité croissant	69
I.1.2. Séparation sur colonne.....	69
I.2. Identification des principes actifs.....	70
I.2.1. Chromatographie sur couches minces (CCM).....	70
I.2.1.1. CCM des flavonoïdes.....	70
I.2.1.2. Chromatographie sur couches minces des tanins.....	71
I.2.2. Analyses spectrales	73
I.2.2.1. Attribution des résonances du produit AG2	79
I.2.2.2. Interprétation des spectres de AG2.....	102
I.2.2.3. Nature du sucre	104

I.2.2.2. Attribution des résonances du produit AG-3	106
I.2.2.3. Attribution des résonances du produit AG-4	120
I.2.2.3. Analyse des spectres de AG-4.....	155
II. Etudes pharmacologiques	157
II.1. Action de la FEB et de la FA sur la glycémie chez des rats normo- glycémiques	157
II.2. Action de la FEB et de la FAEM chez des rats soumis à un test de tolérance au glucose	158
II.3. Action de la FEB et de la FAEM chez des rats diabétiques de type2	159
II.4. Discussion	160
Conclusion partielle	162
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	163
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	166
ANNEXES	189

INTRODUCTION GENERALE

Les plantes médicinales font parties de l'histoire de tous les continents. A travers des siècles, le savoir faire concernant les plantes s'est transmis de génération en génération (CTA, 2007). Dans certaines sociétés traditionnelles, la prise en charge médicamenteuse de pathologies dites chroniques est en grande partie assurée par l'utilisation de plantes médicinales et alimentaires (Sharma et al, 2008). Les plantes médicinales revêtent un enjeu particulier pour les pays du tiers monde et particulièrement les populations africaines (Farnthworth, 1985).

Aujourd'hui, le recours à la médecine par les plantes connaît un regain d'intérêt dans les pays occidentaux, particulièrement pour traiter les déséquilibres entraînés par la vie moderne, qu'il s'agisse de stress ou des problèmes de poids (CTA, 2007). En effet, les plantes médicinales produisent des substances naturelles très diversifiées. Elles accumulent des métabolites secondaires qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme en particulier dans le domaine pharmacologique (Marouf et Joël, 2007). Ainsi, des recherches effectuées sur les plantes médicinales ont montré que celles-ci sont sources de principes actifs pouvant traiter diverses affections (Fall, 2012 ; Ozçelik et al, 2011) ou sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles. Les plantes sont souvent utilisées entièrement ou en partie (feuilles, tiges, écorces, racines, fruits) dans des préparations galéniques. Des plantes ou des substances extraites de celles-ci ont montré des propriétés anti-infectieuses, antidiabétiques, anti-inflammatoires, antalgiques, anti-palustres etc. (Sarr et al, 2011 ; Bever, 1986). Ainsi, l'utilisation des plantes sous forme préventive devient fréquente et n'est plus réservée au traitement de maladies. Selon Farnthworth (1985), plus de 70 % de la population africaine ont eu à utiliser des plantes médicinales dans le traitement de diverses affections. De même, l'OMS rapporte que plus de 80 % de la population africaine ont recours à la médecine

et à la pharmacopée traditionnelle (OMS, 2001). Mais la forte pression démographique pourrait entraîner une surexploitation de la flore avec une destruction inacceptable de l'écosystème (Sakande, 2004). En effet, en Afrique comme ailleurs, les forêts sont menacées par l'exploitation abusive et les coupes sauvages. Par conséquent, les plantes médicinales qui y poussent à l'état sauvage disparaissent donc rapidement, souvent pour toujours et la biodiversité s'en trouve considérablement diminuée (CTA, 2007).

Aujourd'hui, pour contribuer à la protection des plantes médicinales, la recherche devrait être appuyée afin d'isoler les principes ou molécules actifs. Ces dernières pourront servir de modèles pour la synthèse de nouvelles molécules répondant surtout à l'innocuité et à l'efficacité à l'image des médicaments conventionnels. En effet, l'utilisation de principes dosés et/ou de molécules synthétiques pourrait contribuer à la conservation des espèces dans leur biotope et donc à la protection de l'environnement.

Icacina oliviformis, est une plante de la pharmacopée traditionnelle sénégalaise dont les feuilles sont utilisées dans le traitement de plusieurs affections. En effet, des études ethnopharmacologiques menées sur cette plante ont montré son utilisation dans le traitement traditionnel du diabète, du paludisme et dans la prévention du rachitisme (Sarr et al, 2011 ; Ndiaye et al, 2008).

Des études phytochimiques faites sur le tubercule de la plante révèlent la présence de molécules comme l'icacenone, icacinol, β -sitostérol, stigmastérol et hardwikiol linoléate. Mais les feuilles de *Icacina oliviformis* n'ont pas encore fait l'objet d'investigations axées sur l'isolement et la caractérisation de molécules. Des travaux antérieurs portant sur les extraits aqueux et éthanolique de la feuille de *Icacina oliviformis* ont montré une activité anti-hyperglycémiant chez des rats normoglycémiques et sur un modèle de diabète induit par l'alloxane (Sarr et al, 2011 ; Ndiaye et al, 2008).

L'objectif de la présente étude est de rechercher le principe actif responsable de l'activité anti-hyperglycémiante.

Ainsi, ce travail est structuré en deux grandes parties :

La première partie, va concerner à une synthèse documentaire sur *Icacina oliviformis* et sur le diabète.

La seconde partie sera consacrée à une étude expérimentale sur l'activité antidiabétique des fractions de feuilles de *Icacina oliviformis* et sur l'isolement et détermination des structures de molécules contenus dans ces fractions.

PREMIERE PARTIE: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Le diabète est une maladie endocrinienne qui touche environ 2 % de la population mondiale. Le diabète de type 2 est le plus fréquent, c'est une forme insidieuse à développement lent qui apparaît généralement vers la cinquantaine. Il représente 85 à 90 % de la population diabétique. En Afrique, le recours aux plantes de la pharmacopée traditionnelle est courant. En effet, plus de 70 % de la population africaine ont eu à utiliser des plantes médicinales dans le traitement de diverses affections.

Beaucoup de substances naturelles produites par des végétaux (momordicine, rutine, isoquercétine...) sont utilisées dans la phytothérapie antidiabétique. Ce pendant, certaines substances apportées par l'alimentation (vitamine E, vitamine C, les polyphénols...) jouent le rôle d'antioxydants. En effet, les antioxydants lutterait contre le stress oxydatif responsable des complications du diabète avec comme conséquences l'oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN.

Icacina oliviformis est une plante de la pharmacopée traditionnelle sénégalaise dont les feuilles sont utilisées au Sénégal dans le traitement du diabète. C'est une espèce annuelle à tiges herbacées venant généralement en touffe sortant d'un gros tubercule profondément enfoui dans le sol. Peu exigeante, elle pousse sur des terres sableuses et pauvres. Elle serait une plante pionnière qui apparait souvent en premier dans les champs de jachère et serait aussi un indicateur biologique d'un état de dégradation ou de régénération. On la trouve dans la savane boisée soudano-guinéenne à l'ouest et au nord de l'Afrique centrale. Le fruit et le tubercule sont comestibles et renferment plusieurs métabolites (acides aminés, sucres, protéines, terpènes etc.).

Chapitre 1 : GENERALITES SUR ICACINA OLIVIFORMIS (POIRET) RAYNAL (ICACIACEAE)

I. Systématique

Icacina oliviformis appartient à la classe des Dicotylédones, sous classe des Dialypétales, série des Disciflores, ordre des Célastrales, famille des Icacinacées (Raphaël et al, 2012 ; Raynal, 1975; Reutter, 1923).

Icacina oliviformis est synonyme de *Icacina senegalensis* (Raynal, 1975).

Les appellations en langues locales (Berhaut, 1975 ; Kerharo et Adam, 1974 ; Berhaut, 1967) :

Badiaranké : mana sé

Balante : mtazi, foya, foe, songol

Bassari: a nagan, a narham

Baynouk: ba dingali, da vogo

Coniagui: a ndagna, dagan

Créole portuguais: manganasa

Diola : furaba, butima, kuraba, futimay, u ruba, bu bambulaf, hu timo

Foula : silla, manganaté, mankanaso

Mancagne : be nasin

Manding ma nkanaso

Mandjaque: be nasia, mankanas

Peul: mankanasé

Sérère: 'ba

Socé: manganaso

Tadanké: merill

Wolof : ba nkanas, ndangam

Icacina oliviformis a été connue dans la littérature depuis 1813 lorsque J. Poiret publia la description de *Hirtella olivaeformis* Poiret et l'attribua à la famille des Rosaceae. En 1823, Adrien de Jussieu décrit la même espèce comme *Icacina senegalensis* Adr. Juss. C'est ce nom qui est utilisé jusqu'à ce que J. Raynal (1975) la renomme *Icacina oliviformis* (Poiret) Raynal.

Icacina senegalensis var. *pubescens* Boutique (Boutique 1956) récoltée au Zaïre a été décrite comme une variété distincte à cause de la pubescence observée sur les tiges et sur les surfaces sub-axiales des feuilles (Fay, 1987).

En 1851, Miers décrit la famille des Icacinaceae et à cette époque, plus de 400 espèces regroupées dans environ 54 genres ont été décrites. Ce sont de grands arbres de la forêt tropicale, des arbustes ou des lianes (Kårehed, 2002 ; Villiers, 1973).

Permis les espèces de ce genre, figurent : *Icacina oliviformis*(ex *senegalensis*), *Icacina trichantha*, *Icacina mannii*, *Icacina claessensi*, *Icacina guessfeldtii*, *Icacina dubia*, *Icacina grandifolia*, *Icacina ledermannii*, *Icacina macrocarpa*, *Icacina mauritiana*, *Icacina poeppigiano* et *Icacina sarmentosa*. (Dei et al, 2011; Fay, 1987).

II. Description botanique

II.1. Les racines

Ce sont de gros tubercules napiformes qui peuvent atteindre 50 cm de large et peser jusqu'à 25 kg (Baumer, 1995; Berhaut, 1975 ; Kerharo et Adam, 1974 ; Berhaut, 1967). La partie comestible du tubercule est blanche avec des tâches jaunes habituellement mouchetées (National Research Council, 2008)



Tiges feuillées de *Icacina* (Photo : MANGA A, 2013) Fruits de *Icacina*

Figure 1: *Icacina oliviformis* (Poiret) Raynal

II.2. Les tiges

Les tiges sont herbacées venant généralement en touffe. Elle a une ou plus de 10 tiges annuelles, dressées, non ramifiées, atteignant 1m de haut en sortant d'un gros tubercule profondément enfoui dans le sol (Raphaël, 2011 ; National Research Council, 2008 ; Berhaut, 1975 ; Kerharo et Adam, 1974).

II.3. Les feuilles

Les feuilles sont simples ou entières (Villiers, 1973). Elles sont alternes et parfois denses sur les tiges. Les feuilles sont en cymes corymbeuses, lâches, et terminales.

Le limbe est ovale ou ovale elliptique. Il est long de 5 à 12cm et large de 5 à 8 cm. L'apex est en coin, glabres, arrondi, et finement poilus dessous. Le calice est court (Akoegnion, 2006 ; Berhaut, 1975 ; Hutchinson, 1958).



Figure 2 : *Icacina oliviformis* (Fay, 1987). A: Rameau feuillé. B, C: Feuilles. D: Fleurs. E1 et E2: Pétales vue des deux faces. F: Etamines. G: Ovaire et un style. H: Fuit. I: Diagramme florale

II.4. Les fleurs

Icacina oliviformis fleurit de mars à août (Raphaël, 2011 ; Berhaut, 1975 ; Kerharo et Adam, 1974). Les fleurs sont blanches ou blanches crème. Elles sont en cyme corymbiforme terminale arrondis ou allongée. La corolle est large de 7 à 10 mm. Elle a 5 pétales libres entre eux et pubescents à la face interne. Le calice est très court (National Research Council, 2008 ; Berhaut, 1975 ; Villiers, 1973). Les étamines sont libres. Le style est souvent excentrique et bifide parfois pubescent se terminant par un stigmate plus ou moins développé. L'ovaire est souvent asymétrique uniloculaire (Villiers, 1973).

II.5. Les fruits

Ce sont des drupes veloutées jaune ou rouge carmin à maturité. La longueur d'un fruit varie de 3 à 4 cm et la largeur est comprise entre 2 à 3 cm. Le fruit renferme une grosse graine unique sphérique ou ovoïde entourée par une mince couche (environ 0,2 cm) de pulpe blanche gélatineuse acide et sucrée au goût agréable. Cette pulpe est entourée d'un épicarpe fin recouverte de poils très courts. Dans un même endroit, la maturité des fruits est étalée sur plusieurs semaines (National Research Council, 2008 ; Baumer 1995 ; Berhaut, 1975).

III. Répartition géographique

III.1. En Afrique

Icacina oliviformis est une espèce commune de la savane boisée soudano-guinéenne dans l'ouest et le nord de l'Afrique centrale. On la trouve au Sénégal, en Guinée Bissau, en Gambie, au Ghana, au Bénin, au Nigéria, au Tchad, en République Centrafricaine, au Congo et au Soudan (Raphaël et al, 2011; Berhaut, 1975; Percival, 1968; Irvine, 1961; Boutique, 1960 ; Keay, 1958; Adams, 1957; Roberty, 1954 ; Andrews, 1952; Tisserant, 1950 ; Pereira de Sousa, 1949 ; Burt-Davy et Hoyle, 1937; Chevalier, 1913 ; De Wildeman, 1911 ; Oliver 1868).

Dans certains de ces pays, l'espèce est trouvée dans les forêts en reconstitution et/ou dans les zones de jachères (Timothée et Idu, 2011). Elle est très abondante au Sénégal, en Guinée-Bissau, au Ghana et République Centrafricaine (Fay, 1987 ; Irvine 1961; Rosevear, 1961). Selon Cunningham (Cunningham, 1993) cité par Mbatchou et Dawda, 2012), certaines espèces du genre *Icacina* sont retrouvées aussi en Zambie. Par contre, *Icacina oliviformis* serait inconnue dans certains pays de l'Afrique de l'ouest comme la Sierra Leone, le Liberia, la Côte-d'Ivoire, le Mali, le Burkina Faso, le Niger et le Cameroun. (Fay, 1987 ; Peyre de Fabrègues et Lebrun 1976 ; Lebrun et al 1972 ; Keay, 1958).

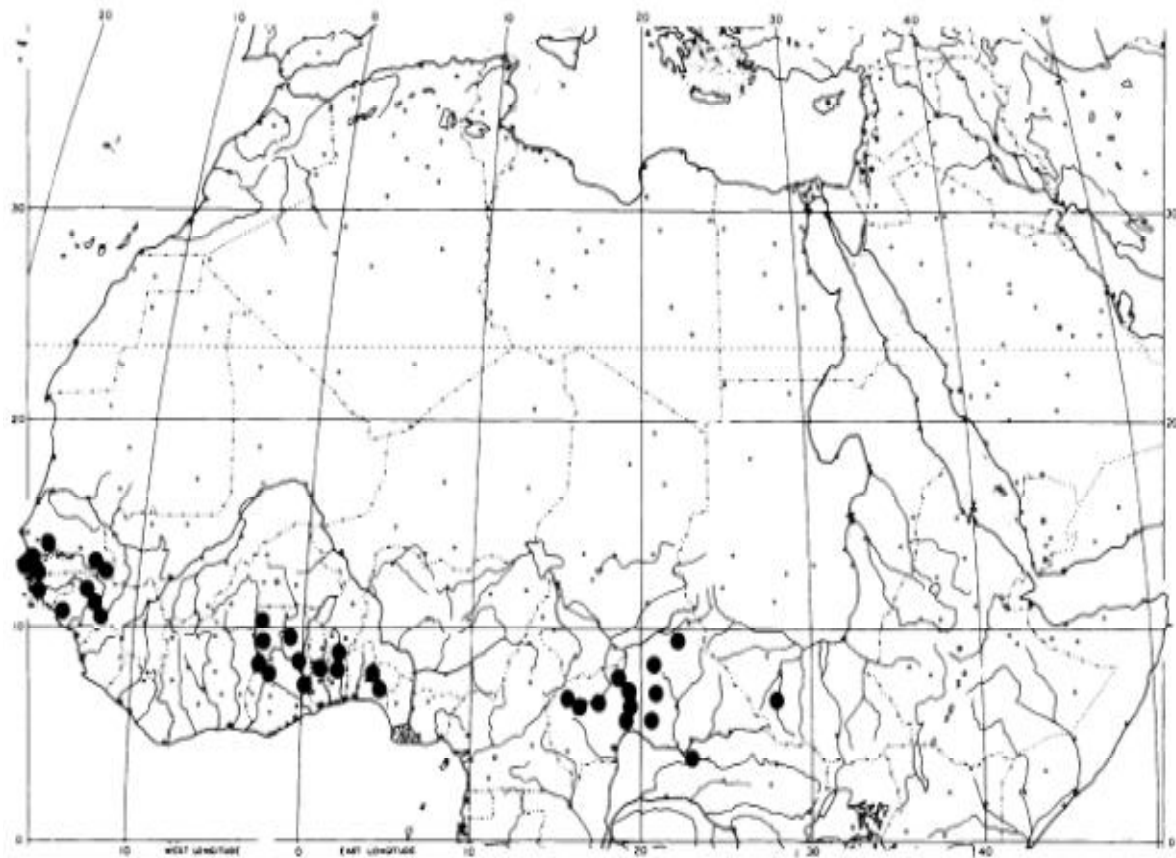


Figure 3: Distribution de *Icacina oliviformis* en Afrique (Fay, 1987)

III.2. Au Sénégal

Icacina oliviformis est commune au sud du Sénégal à partir de Kaolack. Elle est très abondante en moyenne Casamance dans les savanes boisées, en Casamance maritime dans les jachères des champs d'arachide, de mil ou de cassave (manioc), dans le Sine Saloum à l'est et au sud de Kaolack (Berhaut, 1975 ; Kerharo et Adam, 1974).

IV. Ecologie

C'est une espèce annuelle (Berhaut, 1975) qui s'adapte à plusieurs associations phytoécologiques et à plusieurs formations pédologiques.

Icacina oliviformis est une pyrophyte et pousse mieux sous un régime de brulis annuels (Fay, 1993). C'est une espèce peu exigeante qui pousse sur des terres sableuses et pauvres. Elle serait une plante pionnière qui apparaît en premier dans les champs de jachère. Et grâce au développement de son système racinaire, *Icacina oliviformis* jouerait un rôle contre l'érosion éolienne et hydrique (communication personnelle : Dr Maleiny Diatta). D'après Diatta, *Icacina oliviformis* serait un indicateur biologique d'un état de dégradation ou de régénération des terres appauvries.

Les abeilles sont les principaux vecteurs de pollinisation de *Icacina oliviformis*. Six espèces d'abeilles se sont révélées plus fréquentes. Parmi ces hyménoptères pollinisateurs figurent : *Dactylurina staudingeri* Gribondo (Apidae) le plus fréquent ; *Apis mellifera* L. (Apidae) ; *Meliponula bocandei* Spinola (Apidae) (Fay, 1993). Divers nuisibles attaquent les tiges et les jeunes fruits (Fay, 1993). Dans son biotope, *Icacina oliviformis* peut se trouver en association avec plusieurs espèces comme : *Lophira lanceolata*, *Terminalia laxiflora*, *Pericopsis angolensis*, *Hymenocardia acida*, *Erythrophleum africanum*, *Piliostigma thonningii*, *Amblygonocarpus andongensis* (Fay, 1993).

V. Usages

V.1. Usages alimentaires

Icacina oliviformis est une plante alimentaire indigène (Guillemin et al, 1830) dont le mésocarpe des fruits mûres est consommé dans plusieurs pays et généralement par les enfants (Baumer, 1995 ; Berhaut, 1975 ; Tisserant, 1950 ; Dalziel, 1937). Ces fruits de cueillette, riches en éléments minéraux et en sucres, joueraient un rôle important dans l'équilibre alimentaire des populations locales (Gueye et al, 2011).

Les graines et les tubercules étaient utilisés lorsqu'il y avait une pénurie des produits alimentaires de base, en période de disette (Kerharo, 1974). Ce sont les éléments les plus consommés dont la farine est utilisée pour produire du couscous (Cerighelli, 1919).



Tubercules de *Icacina* (Fay, 1987)

Graines de *Icacina* (Moses, 2013)

Figure 4 : Graines et tubercules de *Icacina oliviformis*

V.2. Usages en médecine traditionnelle

V.2.1. Les racines

Selon Berhaut (1975), les racines sont employées pour traiter divers affections. Ainsi, la racine est d'abord considérée en usage interne et externe comme revigorante. Elle est utilisée contre le rachitisme, l'anorexie, l'infection bucco-dentaire, le lymphatisme, la cachexie, les maladies de voies respiratoires,

l'impuissance et comme purgatif de dérivation pour les œdèmes généralisés, le météorisme abdominal et toutes les intoxications ou envenimations.

La poudre de racines aurait un effet contre les maux de ventre, les caries dentaires. En cas de fatigue, le macéré de la poudre de racines est donné en bain et en boisson.

Le décocté des racines serait un adjuvant thérapeutique contre les dermatoses, les maux de tête, de poitrine, de reins, de coryza.

Au Togo, le tubercule serait utilisé pour traiter l'hernie (Raphaël, 2011). En Gambie, les racines additionnées avec des feuilles de *Mangifera indica* sont bouillies dans l'eau. Le décocté ainsi obtenu serait un bon remède contre le paludisme.

V.2.2. Les feuilles

Selon Kerharo et Adam (1974), *Icacina oliviformis* est un grand médicament des casamançais, ayant rang de panacée.

Le décocté concentré de feuilles donné en bain et boisson agirait contre l'hémorragie interne consécutive à un choc, la toux et la bronchite. Il lutterait aussi contre les morsures de serpents. Les feuilles en association avec celles de l'*Annona senegalensis* seraient utilisées dans le traitement externe des asthénies (fatigue) (Kerharo et Adam, 1974). Le décocté de la poudre des feuilles de *Icacina oliviformis* est recommandée par les guérisseurs contre le paludisme et les fièvres (Sarr et al, 2011).

Des études sur le plan pharmacologique ont été réalisées sur *Icacina oliviformis*. Ainsi, d'après Sarr et al (2011), l'extrait méthanolique de feuilles de *Icacina oliviformis* a révélé une action inhibitrice sur la croissance de *Plasmodium falciparum* qui est chloroquino-sensible (3D7) et chloroquino-résistants (7G8). Cependant, cet extrait lyophilisé n'a aucun effet hémolytique sur les globules rouges.

Sarr et al (2011), rapportent aussi que le test de cytotoxicité effectué sur la lignée de cellules Hépatiques 1-6 révèle une constance d'inhibition $IC_{50} > 100$ µg/mL. En plus, aucune toxicité est notée sur les cellules des fibroblastes dermiques humains normaux même à des concentrations supérieures à 500 µg/mL (Sarr et al, 2011).

Des travaux antérieurs (Ndiaye et al, 2008), portant sur les extraits éthanolique et aqueux de feuilles de *Icacina oliviformis*, ont montré une activité anti-hyperglycémiant chez des rats normoglycémiques et sur un modèle de diabète induit par l'alloxane.

VI. Quelques données chimiques sur le genre *Icacina*

VI.1. Les graines

Des analyses nutritionnelles des graines et des racines tubéreuses de *Icacina oliviformis* (Icacinaceae) en République Centrafricaine a révélé que les graines contiennent 80,7 % d'extraits non azotés, 14,0 % de protéines brutes et 0,5 % de matières grasses brutes (poids sec). Les racines contiennent 84,5 % d'extraits non azotés, 4,4 % de protéines brutes et 1,6 % matières grasses brutes (poids sec). La teneur moyenne en eau des graines fraîches est de 18,3 %, et celle de la racine fraîche est d'environ 59 % (Fay, 1991).

Le profil des acides aminés et des protéines des graines est comparable à celui d'une protéine de bonne qualité, mais la digestion de cette protéine n'a pas été étudiée (Fay, 1991).

VI.2. les tubercules

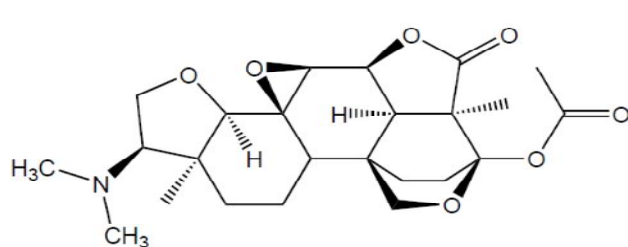
Une analyse chimique de la farine du tubercule séché au soleil a confirmé la présence de résines (facteurs anti-nutritifs) identifiées comme étant des terpènes (Dei et al, 2011 ; Vanhaelen et al, 1986). Les fortes concentrations de résines pourraient être responsables de la faible performance de croissance des oiseaux expérimentés (Dei, et al, 2011).

Comme rapporté par Dei et al, (2011), l'analyse chimique de la farine de tubercules séchés au soleil a révélé la présence de certains acides aminés essentiels et non essentiels. Les acides aminés essentiels qui ont été détectés sont : l'arginine, la glycine, l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la phénylalanine, la méthionine, la thréonine, le tryptophane, la valine. Les acides aminés non essentiels sont : l'alanine, l'acide aspartique, la proline, la cystine, l'acide glutamique, la sérine, la tyrosine (Dei et al, 2011).

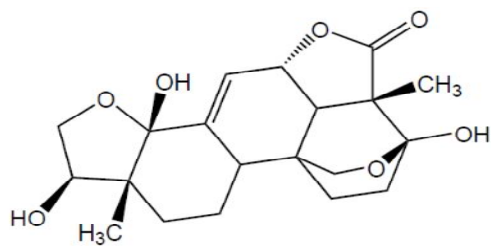
Selon Woot-Tsuen et coll. (1968), la farine produite à partir du tubercule de *Icacina oliviformis* est composée de : eau (11,7 %), protéines (10,3), matières grasses (0,7 %), glucides (74,5 %), cendres (2,8 %), calcium (150mg / 100g), fer (7mg / 100g).

Pour la farine des graines la composition est la suivante : eau (12,3 %), protéines (8 %), lipides (0,1 %), glucides (72,73 %) et cendres (0,5 %) (Moses et al, 2013).

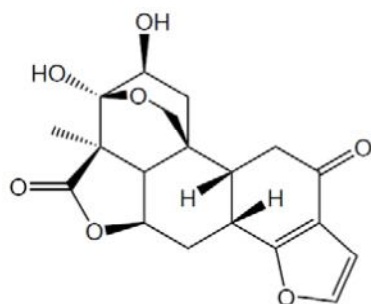
Certains genres *d'Icacina* renferment des substances terpéniques. En effet, une étude phytochimique sur le tubercule révèle la présence d'icacenone (0,08 %), d'icacinol (0,03 %), de β -sitostérol (55 %), de stigmastérol (45 %) et hardwikiollinoléate (Soicke et al, 1991 ; Vanhaelen et al 1986 ; On'Okoko et al, 1985).



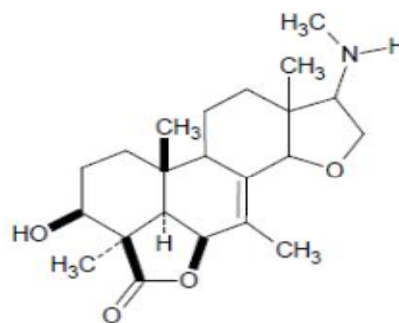
Icacinol



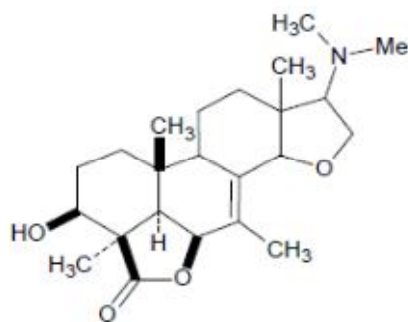
O-acetylIcacine



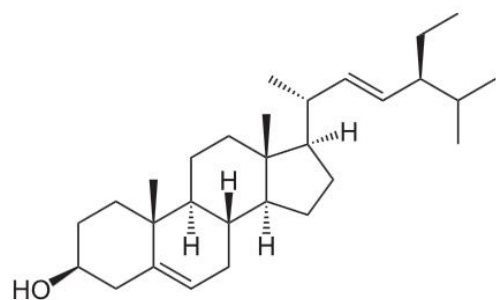
Icacenone



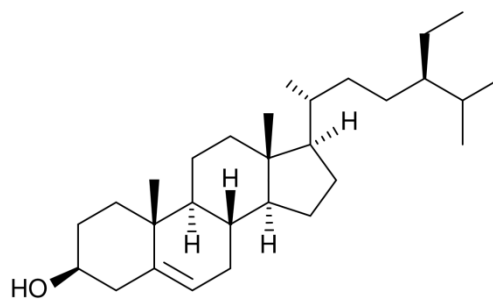
Icaceine



De-N-méthyllicaceine



Stigmastérol



β-sitostérol

Figure 5 : Quelques structures chimiques de *Icacina* (Mbatchou et Dawda, 2012 ; Vanhaelen et al, 1986 ; On'Okoko et al, 1985)

Chapitre 2 : GENERALITES SUR LE DIABETE

I. Régulation physiologique de la glycémie

Il existe deux grands modes de régulation physiologique de la glycémie ; la régulation hormonale et la régulation nerveuse (Lehninger, 1985).

I.1. Régulation hormonale

A l'état normal, la régulation de la glycémie est sous le contrôle de deux systèmes : un système hyperglycémiant et un système hypoglycémiant (Lehninger, 1985).

I.1.1. Système hypoglycémiant

Ce système se résume pratiquement à l'action de l'insuline qui est la principale hormone hypoglycémiante. L'insuline est la seule hormone hypoglycémiante de l'organisme. Elle est produite par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Elle stimule l'absorption du glucose sanguin par des tissus comme le foie, les muscles squelettiques, les tissus adipeux et participe au stockage du glucose sous forme de glycogène. De plus, elle inhibe les voies de production hépatique de glucose ; la néoglucogenèse et la glycogénolyse. L'insuline intervient enfin dans la régulation du métabolisme lipidique en inhibant la lipolyse des triglycérides adipocytaires et en facilitant leur synthèse de même que celle des protéines dans le tissu adipeux (Grimaldi et al, 2001).

I.1.1.1. Structure de l'insuline

L'insuline est un polypeptide de poids moléculaire égal à 6000 daltons. Elle est constituée de deux chaînes d'acides aminés reliées par deux ponts disulfures de façon covalente.

La chaîne A renferme 21 acides aminés et la chaîne B en a 30 acides aminés. La chaîne A possède un pont bisulfure intra-caténaire entre deux résidus de cystéine situés en position 6 et 11. Il existe en outre deux ponts disulfures inter-

caténaire localisés d'une part entre deux résidus de cystéine situés en position 7 sur les deux chaînes, d'autre part entre un résidu de cystéine en position 19 de la chaîne B et un résidu cystéine en position 20 de la chaîne A. Cette structure existe dans les molécules d'insuline de la plupart des espèces et en particulier chez l'homme (Lehninger, 1985).

I.1.1.2. Biosynthèse de l'insuline

La pro-insuline produite est une chaîne polypeptidique unique contenant entre autres une séquence d'environ 30 résidus absente dans l'insuline, appelée peptide de connexion ou peptide C. Le peptide C unit l'extrémité C-terminale de la chaîne B à l'extrémité N-terminale de la chaîne A de la future molécule d'insuline. La pro-insuline est transformée en insuline au niveau de l'appareil de Golgi. Cette transformation se fait précisément au niveau des granules de sécrétion sous l'action d'enzymes.

La sécrétion de l'insuline se fait selon deux modes : un mode continu qui permet de maintenir un taux basal d'insuline circulante et un mode diphasique qui fait suite à un stimulus qui est souvent l'absorption d'aliments (Lehninger, 1985).

I.1.1.3. Action physiologique de l'insuline

L'insuline agit essentiellement sur trois organes cibles et sur le métabolisme glucidique et lipidique de divers tissus périphériques, en favorisant l'entrée de certains substrats dans les cellules et en agissant sur le métabolisme cellulaire de ces substrats.

Au niveau du foie, siège principal de la glycogénèse, l'insuline stimule la synthèse de glucokinase, une hexokinase spécifique du foie, qui favorise le stockage du glucose en glycogène.

Au niveau du tissu adipeux, l'insuline stimule la lipogenèse (stockage des triglycérides). C'est aussi la seule hormone antilipolytique de l'organisme. Elle diminue également la glycogénolyse et la protéolyse.

Au niveau des muscles striés, l'insuline stimule la synthèse du glycogène (par stimulation de l'hexokinase), mais aussi et surtout la glycolyse. Elle inhibe la protéolyse et la lipolyse musculaire, favorisant le transport actif de certains acides aminés à travers la membrane cellulaire. D'une façon générale, dans les différents tissus périphériques, il y'a une augmentation de l'utilisation du glucose. L'insuline stimule tout d'abord le transport du glucose dans la cellule. En normo-glycémie, l'insuline favorise la perméabilité des membranes cellulaires aux oses. Le glucose est transformé en G-6-P dont les trois voies métaboliques. Ces voies sont la glycolyse, la voie des pentoses-phosphates et la glycogénogenèse stimulées par l'insuline (Lehninger, 1985).

I.1.2. Système hyperglycémiant

Il fait intervenir quatre hormones que sont le glucagon, l'adrénaline, la Somatostatine hormone (STH) et le cortisol. Le glucagon et l'adrénaline sont des hormones d'urgence mises en circulation très rapidement lors d'une chute de la glycémie. Ces hormones stimulent la glycogénolyse hépatique. La STH et le cortisol jouent un rôle à long terme notamment dans l'activation de la néoglucogenèse ainsi que la glycogénolyse hépatique.

En cas de chute de la glycémie, on a une libération de l'adrénaline par la médullosurrénale. L'adrénaline libérée agit au niveau du foie en inhibant la sécrétion de l'insuline par les cellules bêta et en activant celle du glucagon par les cellules alpha. Elle inhibe également la capture du glucose par les muscles. L'action de l'adrénaline et du glucagon va se traduire par une hyperglycémie suite à une augmentation de la glycogénolyse.

Le glucagon est un facteur antagoniste de l'insuline. L'organe cible du glucagon est le foie alors que l'action de l'adrénaline est prépondérante au niveau des

muscles. Le glucagon a une action glycogénolytique, néoglycogénique et lipolytique. Il augmente le glucose sanguin en stimulant l'adénylcyclase des cellules hépatiques. Ceci entraîne une activation de la phosphorylase d'où une augmentation accrue du glycogène. Il augmente la néoglycogénèse hépatique, à partir des acides aminés disponibles et accroît le métabolisme (Kebieche, 2009)

I.2. Régulation nerveuse de la glycémie

Elle se fait par l'intermédiaire du système nerveux autonome qui module la sécrétion de l'insuline et du glucagon. Ces deux hormones interviennent en prépondérance dans la régulation physiologique de la glycémie.

La sécrétion de l'insuline est stimulée par l'innervation du système parasympathique qui a comme neurotransmetteur l'acétylcholine. Quant au glucagon, sa sécrétion est stimulée par l'innervation des nerfs sympathiques du pancréas par l'intermédiaire des récepteurs Bêta adrénergiques et de l'AMP cyclique.

Donc d'une manière générale, l'insuline va lutter contre les tendances à une hyperglycémie alors que le glucagon lutte contre les tendances à une hypoglycémie (Ganong, 1977).

II. Diabète sucré

II.1. Définition

Le diabète est défini par une élévation chronique de la concentration de glucose dans le sang (hyperglycémie) et regroupe, dans un véritable syndrome, plusieurs maladies de pathogénie différente (Rodier, 2001). L'hyperglycémie chronique est la cause principale des complications dégénératives (Menon et Ribeiro, 2011 ; Fontbonne et Simon, 2001).

C'est une maladie métabolique caractérisée par des troubles du métabolisme des glucides, des lipides et des protéines associés à des déficits absolus ou relatifs de l'action et/ou de la sécrétion d'insuline ou due à un excès des facteurs qui

s'opposent à son action (Nmila et al, 2002 ; Barrier et Osinki, 2001 ; Rodier , 2001).

Actuellement, le diabète est défini par une glycémie à jeun supérieures à 1,26 g/L (Grimaldi et al, 2001). Lorsque la glycémie mesurée à jeun est supérieure à 1,26 g/L, la personne est considérée comme diabétique. Ce chiffre a été retenu par le corpus médical parce que c'est à partir de cette valeur seuil qu'apparaît le risque de survenue de complications micro-vasculaires, et en particulier la rétinopathie (Grimaldi et al, 2001 ; Raccach, 2004 ; Kebieche, 2009).

II.2. Diabète de type 1

Le diabète de type 1 résulte d'une déficience absolue ou totale du taux d'insuline circulante (Kebieche, 2009). Ce type de diabète est principalement lié à une destruction auto-immune progressive des cellules bêta des îlots de Langerhans, survenant chez des sujets génétiquement prédisposés, et qui conduit en quelques années à un état d'insulinopénie absolue (Nmila et al, 2002 ; Sarfati, 2008). Le diabète de type 1 apparaît lorsque plus de 80 % des cellules bêta sont détruites. Il représente donc la cicatrice métabolique d'une maladie immunitaire. Il survient à tout âge, mais surtout avant l'âge de 20 ans (juvénile entre 15 et 24 ans ou infantile entre 0 et 14 ans) avec un pic de fréquence vers 12 ans (OMPI, 2002 ; Grimaldi et al, 2000). Le malade est presque toujours maigre. Ce diabète maigre s'accompagne de troubles acido-cétosiques (OMPI, 2002). Le diabète de type 1 représente 20 à 25 % des diabétiques (Hurte, 2003).

II.2.1. Physiopathologie du diabète de type 1

La physiopathologie du diabète de type 1 est complexe et multifactorielle (prédisposition génétique, réaction immunitaire, rôle de l'environnement). Il est probable qu'il existe une susceptibilité individuelle de développer un diabète insulinodépendant, et qu'un ou plusieurs facteurs environnementaux soient déterminants pour l'émergence clinique de ce diabète (Sarfati, 2008).

II.2.1.1. Prédisposition génétique

Le fait d'appartenir à la famille d'un diabétique est un facteur de risque particulier puisque 5 % des apparentés au premier degré développent un diabète soit environ 20 fois la prévalence de la population générale (Bysschaert, 2001).

De nombreux gènes interviennent probablement dans la susceptibilité au diabète de type 1 ; les facteurs génétiques sont essentiels mais n'explique pas entièrement le déterminisme de la maladie. La principale région génomique contrôlant cette prédisposition familiale est celle du complexe majeur d'histocompatibilité qui code pour les glycoprotéines HLA de classe 1 et 2. Elle est localisée sur le bras court du chromosome 6.

L'étude du complexe majeur d'histocompatibilité (système HLA) a permis de mieux comprendre la susceptibilité génétique du diabète de type 1. Les premières associations HLA-type 1 rapportées (positives avec HLA-B15 ; B8 et B18 et négatives avec HLA-B7) suggéreraient que les antigènes HLA de classe 1 seraient directement impliqués. Mais plus récemment, ce sont les antigènes de classe 2, HLA-DR3 et DR4 qui sont incriminés : plus de 90 % des sujets développant un diabète de type 1 et moins de 50 % dans une population générale sont en effet HLA-DR3 et/ou DR4 positifs. Le risque le plus élevé correspond aux hétérozygotes DR3-DR4 (Sarfati, 2008 ; Buysschaert, 2001). Le risque de diabète pour le frère ou la sœur d'un sujet diabétique insulino-dépendant est de 15 % s'il est HLA identique, de 4 à 5 % s'il est HLA mono-identique, et inférieur à 1 % s'il est HLA différent. Les sujets hétérozygotes HLA DR3/4 sont les plus exposés (risque relatif entre 30 et 50 %); inversement, les individus HLA DR2 et HLA DR15 semblent protégés (Sarfati, 2008).

o Réactions immunitaires

L'examen histologique du pancréas endocrine au moment de l'éclosion clinique d'un diabète de type 1 montre au sein des îlots de Langerhans une réduction drastique des cellules β ainsi qu'une infiltration de cellules mononuclées constituées de lymphocytes T ($CD4^+$ et surtout $CD8^+$), de macrophages et de lymphocytes B. Cette inflammation appelée « insulite » correspond à la réaction auto-immune dirigée contre certains antigènes exprimés entre autres par les cellules β des îlots (Buysschaert, 2001). Les auto-antigènes contre lesquels est dirigée la réaction immunitaire ne sont pas déterminés. Les mécanismes immunitaires responsables de l'insulite et de la destruction des cellules β demeurent controversés mais l'activation de la réaction auto-immune précède de plusieurs mois ou plusieurs années le syndrome hyperglycémique. La nature des facteurs déclenchant l'activation des lymphocytes cytotoxiques spécifiques reste également hypothétique (Menon et Ribeiro, 2011 ; Sarfati, 2008).

o Auto-anticorps

Des auto-anticorps anti-cellules d'îlots (ICA : Islet Cells Antibodies) et plus récemment, les auto-anticorps reconnaissant des antigènes insulaires identifiés sont détectées chez une majorité de sujets au moment du diagnostic. Ils sont qu'exceptionnellement observés à titres faibles, dans une population générale (Buysschaert, 2001).

Les auto-anticorps anti-cellules d'îlots de Langerhans (anti ICA) sont présents chez 60 à 85 % des diabétiques de type 1 au moment du diagnostic, chez 4 à 5 % de leurs parents au premier degré, et chez moins de 1 % dans la population générale.

Les anticorps anti-insuline sont retrouvés avant toute injection d'insuline chez 30 à 40 % des nouveaux diabétiques. Les anticorps antiglutamate décarboxylase (GAD) sont détectés chez 80 à 90 % des nouveaux diabétiques ; ils sont aujourd'hui les meilleurs marqueurs de l'auto-immunité au cours du diabète de

type 1 et tendent à supplanter le dosage des anticorps anti-îlots de Langerhans. Tous ces anticorps peuvent être observés des années avant la survenue du diabète insulino-dépendant et peuvent ainsi être utiles dans le cadre d'un dépistage familial ; leur titre diminue lorsque la destruction bêta-Langérhansienne est complète, après plusieurs années de diabète. Le rôle de ces anticorps est mal connu. Sécrétés par les lymphocytes B stimulés par les lymphokines, ils sont les témoins de la réaction immunitaire mais pourraient avoir un rôle plus direct dans la pathogénie du diabète de type 1 (Menon et Ribeiro, 2011 ; Sarfati, 2008).

II.2.1.2. Facteurs environnementaux

Des modèles expérimentaux démontrent qu'un diabète de type 1 peut être induit chez l'animal par une infection virale. Le rôle potentiel d'une infection virale dans la pathogénie du diabète de type 1 fut suspecté initialement à partir d'études épidémiologiques (augmentation de l'incidence du diabète en automne et en hiver, association significative entre le diabète et rubéole congénitale, oreillons, coxsackie B4, cytomégalovirus, virus Epstein-Barr) et par l'existence de modèles de diabètes viro-induits chez l'animal. Les mécanismes potentiels sont multiples : réaction antigène croisée (homologie entre protéines virales et autoantigènes), activation lymphocytaire T, modification de l'expression antigénique des cellules β .

L'alloxane, la streptozotocine, la pentamidine et le pyrinuron (raticide) affectent directement la cellule bêta mais la susceptibilité à chaque agent est variable selon les espèces.

L'implication possible du lait de vache ou des nitrosamines dans la pathogénie du diabète de type 1 a été envisagée, mais il n'existe aucune preuve dans ce domaine (Sarfati, 2008).

II.3. Diabète de type 2

Le diabète de type 2 est de loin le plus fréquent pour diverses raisons, notamment liées à la nutrition, à l'obésité, à la sédentarité (Nmila et al, 2002). Il représente 85 à 90 % de la population diabétique (Ndiaye et al, 2008 ; Raccach, 2004).

Le diabète de type 2 est classiquement caractérisé par une altération de la réponse insulinique au glucose associée à une déficience des effets de l'insuline sur les tissus périphériques (insulino-résistance) (Nmila et al, 2002). L'insulino-déficience responsable de l'hyperglycémie dans le diabète de type 2 est précédée par 10 à 20 ans d'hyperinsulinisme euglycémique, conséquence de l'insulino-résistance. La cellule bêta qui était initialement sensible aux stimuli insulino-sécréteurs devient progressivement moins sensible au glucose puis aux autres stimuli hyperglycémifiants. Cette insulino-déficience relative au début, devient absolue lorsque la glycémie à jeun atteint environ 2g/L.

Le diabète de type 2 est une forme insidieuse à développement lent qui apparaît généralement vers la cinquantaine chez les sujets atteints d'un syndrome métabolique (Ndiaye et al, 2008 ; Raccach, 2004 ; Vischer, 2003). Le diabète type 2 était considéré comme une pathologie exclusive de l'adulte. Il s'agit d'une maladie multifactorielle, ayant certes une influence génétique, mais pour laquelle l'environnement, et en particulier l'inactivité physique, le surpoids et la répartition abdominale des graisses sont des facteurs de risques majeurs. Or, alors que l'obésité devient un problème de santé publique dans le monde industrialisé et chez l'enfant en particulier (Campagna, 2003), le diabète de type 2 est maintenant une pathologie que l'on peut rencontrer en pédiatrie et qu'il faut pouvoir différencier du diabète de type 1 (Kent, 2005 ; Campagna, 2003 ; Raccach et al, 1999). Dans ce type de diabète, l'insulino-sécrétion pancréatique est déficitaire mais conservée. A cela, s'ajoute une utilisation périphérique de l'insuline qui est perturbée soit par une modification des récepteurs à l'insuline soit par modification de la structure de l'insuline elle-même. Cette forme de

diabète est retrouvée généralement chez l'adulte après l'âge de trente ans et dans 90 % des cas chez les sujets obèses (Campagna, 2003 ; Raccach et al, 1999).

II.3.1. Physiopathologie du diabète de type 2

Plusieurs facteurs interviennent dans l'étiopathogénie du diabète de type 2. Il est probable qu'un individu hérite la susceptibilité de développer un diabète de type 2 et qu'un ou plusieurs facteurs environnementaux soient déterminants pour en favoriser l'expression clinique (Raccach et al, 1999).

II.3.1.1. Facteurs génétiques

La place des facteurs génétiques est soulignée par les études familiales, la concordance se situant selon les études entre 60 et 100 % pour les jumeaux monozygotes. Le risque pour les apparentés au premier degré des sujets diabétiques de type 2 de développer à leur tour un diabète de type 2 est d'environ 40 %. Toutes les études convergent pour affirmer que le diabète de type 2 est une maladie polygénique ; il existe sans doute un très grand nombre de gènes de prédisposition au diabète de type 2. Différents gènes ont pu être identifiés comme des candidats potentiels (glucokinase, récepteur de l'insuline, récepteur du glucagon, IRS1, glycogène-synthétase), mais aucun de ces gènes n'est considéré comme un gène « majeur » du diabète de type 2 (sauf pour les formes de type MODY) (Sarfati, 2008 ; Raccach, 1999).

II.3.1.2. Facteurs métaboliques

o Insulino-résistance

Elle est définie comme une diminution d'efficacité de l'insuline comme facteur d'utilisation du glucose ; elle s'accompagne d'un hyperinsulinisme (insulino-sécrétion compensatrice). L'insulino-résistance n'explique pas seule la survenue du diabète de type 2, mais elle caractérise la plupart des diabètes de type 2 avec obésité. L'insulino-résistance aggrave les troubles de l'insulino-sécrétion («

épuisement pancréatique »). Un certain degré d'insulino-résistance est retrouvé dans de nombreuses situations cliniques en dehors du diabète (obésité, hypertension artérielle essentielle, grossesse) (Sarfati, 2008 ; Tchobrouisky, 1991).

L'insulino-résistance intéresse principalement les muscles striés squelettiques (diminution de la captation du glucose, diminution de l'oxydation du glucose et surtout du stockage sous forme de glycogène), le tissu adipeux (diminution de la captation du glucose, lipolyse accrue avec libération excessive d'acides gras responsables d'une mauvaise utilisation périphérique du glucose) et le foie (diminution de la captation du glucose, augmentation de la production hépatique de glucose).

O Mécanismes de l'insulino-résistance

Elle est à la fois génétiquement déterminée et favorisée par l'obésité. Son mécanisme interne est multifactoriel. Schématiquement l'insulino-résistance est due soit à des anomalies situées en amont des récepteurs à insuline, soit au sein ou mieux et plus probablement en aval de ceux-ci, en particulier au niveau des protéines IRS (IRS1/IRS2), substrats de récepteurs qui une fois stimulés (phosphorylées) servent d'ancrage pour d'autres molécules de signalisation.

La phosphatidyl inositol-3 kinase (PI-3 kinase) est une molécule dont une activation « anormale » conduit à un défaut de translocation des transporteurs de glucose (Glut-4) depuis le compartiment intracellulaire vers la membrane plasmique (Lutton et al, 1999).

Il existe :

- Des anomalies du nombre de récepteurs à l'insuline (l'hyperinsulinisme induit une diminution du nombre de récepteurs à l'insuline « down-régulation »), ou de l'affinité insuline-récepteur (avec réponse biologique maximale conservée au prix d'un hyperinsulinisme compensateur).

- Des anomalies post-réceptrices avec altération de la réponse biologique maximale. Au cours du diabète de type 2, ces anomalies coexistent, mais les anomalies post-récepteur prédominent et sont d'autant plus marquées que l'équilibre métabolique est mauvais. L'hyperglycémie chronique et l'excès d'acides gras libres aggravent l'insulino-résistance, tout comme l'obésité ou l'inactivité physique.

L'insulino-résistance du diabète de type 2 peut être mise en évidence par de nombreuses méthodes (élévation du rapport insulémie sur glycémie, test de tolérance à l'insuline, clamp euglycémique hyper-insulinémique) (Sarfati, 2008).

II.3.1.3. Facteurs environnementaux

L'obésité augmente considérablement le risque de survenue d'un diabète de type 2, particulièrement lorsqu'il s'agit d'une obésité androïde.

Une surcharge graisseuse, abdominale et préviscérale, même en l'absence de surpoids évident, est également un facteur de risque, la notion d'une prise de poids de 15 à 20 kg par rapport au poids des 18-20 ans est souvent retrouvée même en l'absence d'obésité vraie.

L'obésité androïde est source d'insulino-résistance (diminution du nombre de récepteurs membranaires à l'insuline).

La prévalence du diabète de type 2 augmente dans certaines populations, dès lors qu'elles changent radicalement de mode de vie (migration en zone urbaine, abandon des activités traditionnelles etc.). L'inactivité physique est source d'insulino-résistance. Des études d'interventions ont montré que l'augmentation modérée de l'activité physique (30 à 45 minutes de marche par jour) dans un groupe à risque prévenait ou retardait l'apparition d'un diabète de type 2 (Sarfati, 2008).

II.4. Stress oxydatif dans la pathologie du diabète

A côté de l'hyperglycémie chronique, et la glycation non enzymatique des protéines, un facteur très important impliqué dans la genèse de ces complications du diabète est le stress oxydatif. En effet, le métabolisme cellulaire normal produit de manière continue de faibles quantités d'espèces oxygénées activées dont font partie les radicaux libres ($O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet (1O_2). Le patient diabétique présente une surproduction des ROS (espèces réactives de l'oxygène), une diminution des antioxydants, ce qui génère un état de stress oxydatif élevé et une altération des systèmes de défense antioxydant qui semblent contribuer à l'initiation et à la progression des complications à l'origine des micros et des macro-angiopathies (Gardes et al, 2003 ; Dey lucey et al, 2002).

II.4.1. Oxydation par l'alloxane

L'alloxane est un composé organique basé sur un squelette de l'hétérocyclique de la pyrimidine. Ce composé a une haute affinité pour l'eau existant sous forme mono-hydratée. Les données caractérisant l'alloxane dans les conditions standards sont les suivantes (Lenzen, 2008) :

Nom chimique : 2, 4, 5,6(1H, 3H)-pyrimidine tétraone monohydrate.

Structure chimique : $C_4H_2N_2O_4$

Masse moléculaire : 160,09 g/mol.

Point fondant : 253°C

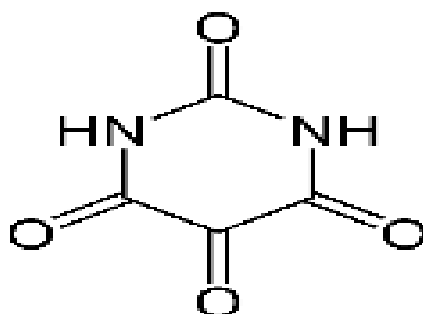


Figure 6 : Structure chimique de l'alloxane.

L'alloxane est un agent oxydant fort qui exerce une activité cytotoxique sur les cellules β par le produit de sa réduction, l'acide diallurique (Lenzen, 2008 ; Grankvist et al, 1981). Il établit un cycle d'oxydoréduction avec formation de radicaux superoxydes, associé à l'internalisation de fortes doses de calcium dans le cytosol provoquant ainsi la destruction rapide des cellules β (Lenzen et al, 1996 ; Ammon et al, 1983). Cet effet délétère est inhérent à la vulnérabilité de ces cellules au stress oxydatif en raison d'une part, de leur pauvreté en Cu^{2+} / Zn^{2+} , en super oxyde dismutase, en catalase et en glutathion peroxydase, d'autre part au faible contenu en glutathion réduit (Grankvist et al, 1981). Cette fragilité intervient dans les mécanismes qui conduisent à la destruction des cellules β sous l'effet d'agents diabétogènes comme l'alloxane (Lenzen et al. 1996 ; Ammon et al, 1983 ; Grankvist et al, 1981).

II.4.2. Conséquences biochimiques du stress oxydant

II.4.2.1. Oxydation des lipides

Les acides gras polyinsaturés sont les cibles privilégiées des ERO radicalaires en raison de leurs hydrogènes bis-allyliques facilement oxydables. Plus l'acide gras est insaturé, plus il est susceptible d'être peroxydé, c'est-à-dire dégradé par un processus oxydant non enzymatique. Il s'agit d'un enchaînement de réactions radicalaires organisées en trois phases successives : l'initiation, la propagation et la terminaison (Halliwell et Gutteridge, 2007 ; Halliwell et Gutteridge, 1999).

La phase d'initiation consiste en la création d'un radical d'acide gras ($\text{R}\cdot$) à partir d'un acide gras (RH) par soustraction d'un atome d'hydrogène provenant d'un groupement méthylène $-\text{CH}_2-$ bis allylique. Cette déshydrogénation peut être provoquée par un initiateur radicalaire tel que le $\cdot\text{OH}$ et le $\text{HOO}\cdot$. Le radical lipidique $\text{R}\cdot$ subit ensuite un réarrangement moléculaire pour donner un radical avec une structure de diène conjugué, plus stable, qui peut réagir avec une molécule d' O_2 et former un radical peroxy ($\text{ROO}\cdot$) (Esterbauer et al

1992). Ce radical est suffisamment réactif pour arracher à nouveau, un hydrogène à un acide gras polyinsaturé voisin, propageant ainsi la réaction.

Il est généralement admis que chaque radical $R\bullet$ peut être à l'origine d'une centaine de molécules d'hydroperoxyde avant que survienne la phase de terminaison. L'hydroperoxyde lipidique (ROOH) formé peut être oxydé en présence de métaux de transition divalents de Fe^{2+} ou Cu^{2+} et entraîner la formation d'alcanes et d'aldéhydes toxiques dont le malonyldialdéhyde (MDA) ou le 4-hydroxynonenal (4-HNE). La réaction en chaînes peut être interrompue (phase de terminaison) par l'association de deux radicaux libres et la formation d'un composé stable ou le plus souvent par la réaction du radical avec une molécule antioxydante (Delattre et al, 2005).

La peroxydation de lipides fournit ainsi une grande variété de produits, dont certains peuvent réagir avec les protéines et l'ADN. Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malonyldialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonénal (4-HNE) ont été étudiés comme marqueur de la peroxydation lipidique (Marnett, 1999).

II.4.2.2. Oxydation de l'ADN

Les ADN nucléaires et mitochondriaux constituent une cible cellulaire importante. Cinq classes principales de dommages oxydatifs de l'ADN médiés par $OH\bullet$ peuvent être générées. Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaires, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines (Cadet et al, 2002). Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées. Mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin. Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes

mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine (Kebieche, 2009).

II.4.2.3. Oxydation des protéines

Les modifications oxydatives des protéines par les ERO provoquent l'introduction d'un groupement carbonyle dans la protéine (Levine, 2002). Ces réactions d'oxydation sont fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Fe^{2+} ou le Cu^{2+} . Les réactions d'oxydation de protéines peuvent être classées en deux catégories : d'une part, celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne peptidique, et d'autre part, les modifications des peptides par addition de produits issus de la peroxydation lipidique comme le 4-HNE. De telles modifications conduisent généralement à une perte de fonction catalytique ou structurale des protéines affectées (Levine, 2002) et deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéases et sont donc éliminées. L'oxydation de la cystéine est réversible mais peut également perturber les fonctions biologiques du GSH ou de certaines protéines. Le rôle des protéines dans la cellule est tel que leur dysfonctionnement peut bouleverser le fonctionnement cellulaire (Delattre et al, 2005).

II.4.3. Substances naturelles anti-oxydantes

Etant donné l'implication du stress oxydant dans la pathologie diabétique, il est intéressant de considérer l'apport potentiellement bénéfique des antioxydants. Du fait que les antioxydants agissent en synergie et de façon à éviter un éventuel déséquilibre de la balance antioxydants/pro-oxydants, il est souvent souhaitable de les administrer en association (Sharma et al, 2000 ; Paolisso et al, 1993).

II.4.3.1. La vitamine C

L'acide L-ascorbique ou vitamine C est considéré comme le plus important antioxydant dans les fluides extracellulaires. C'est un piègeur très efficace des ions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène, de l'hypochlorite, des radicaux hydroxyles et peroxydes, et de l'oxygène singulet. Le rôle antioxydant de la vitamine C est basé sur sa réaction avec les radicaux peroxydes aqueux, le produit formé étant le radical ascorbyle. En piégeant les radicaux peroxydes dans la phase aqueuse avant qu'ils initient la peroxydation lipidique, la vitamine C protège les biomembranes et les lipoprotéines (Delattre et al, 2005 ; Richelle et al, 2001).

II.4.3.2. La vitamine E

Le terme générique de vitamine E désigne en fait une famille constituée des tocophérols et tocotriénols, la forme la plus active étant l' α -tocophérol. Cette vitamine est décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les érythrocytes chez l'homme. Situé dans les lipoprotéines et dans les membranes, l' α -tocophérol est capable, d'une part, de piéger chimiquement l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) en s'oxydant en quinone, d'autre part, de réagir avec le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$). Mais son principal rôle biologique est de réagir avec les radicaux peroxydes ($\text{ROO}\bullet$) pour former un radical tocophéryle. L' α -tocophérol est régénéré essentiellement selon deux voies ; d'une part, la vitamine C, ou l'acide ascorbique, est capable de réduire le radical tocophéryle, d'autre part, une enzyme spécifique, glutathion dépendante, la tocophéryl réductase, est capable de réduire le radical tocophéryle en α -tocophérol (Delattre et al., 2005).

II.4.3.3. Le β -carotène

Le β -carotène est apporté par l'alimentation. Il est doué de plusieurs capacités. C'est un précurseur de la vitamine A et il capte l'oxygène singulet sous faible pression d'oxygène. Avec les autres caroténoïdes, la vitamine A a le pouvoir de terminer les réactions en chaînes de lipoperoxydation. Il protège les structures cellulaires contre l'agression oxydante (Goudable et Favier, 1997).

II.4.3.4. Les polyphénols

Les végétaux regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. Ce sont des composés ubiquistes que l'on retrouve dans les plantes. Ils attirent l'attention des chercheurs depuis quelques années à cause de leurs propriétés antioxydantes. En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (Delattre et al, 2005).

o Les flavonoïdes

✓ Définition, classification et structure

Ce sont des composés phénoliques des végétaux qui constituent un groupe d'une extrême diversité. Ce sont des pigments quasi universels des végétaux presque toujours hydrosolubles. Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles assurant ainsi la protection des tissus contre les agressions des ultraviolets (Bruneton, 1993 ; Rajnerayanama et al, 2001 ; Sakande, 2004 :).

Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau Flavone ou 2-Phényl chromone portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides. Le noyau flavone est lui-même un dérivé du noyau flavane de base (Bruneton, 1993)

Les flavonoïdes se répartissent en quinze familles de composés, dont les plus importantes sont les suivantes : flavones, flavonols, flavanones, flavononols, isoflavones, isoflavanones, chalcones, aurones et anthocyanes. Les composés de chaque sous classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle intermédiaire. Les flavonoïdes se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme d'hétérosides qui résultent de la combinaison du groupe réducteur d'un ose avec une substance non glucidique : l'aglycone ou la génine, avec élimination d'eau. La partie osidique peut être mono-, di- ou trisaccharidique. La partie glycarique est formée soit d'hexoses (D-glucose, D-galactose, D-allose...) ou pentoses (D-apiose, L-arabinose, L-ramnose...) ou avec des acides (D-glucuronique, D-galacturonique...). La partie osidique peut être linéaire ou ramifiée. La liaison génine-ose existe entre un hydroxyle phénolique ou d'un hydroxyle de l'hétérocycle oxygéné et un -OH ou un -CH de la fonction hémiacétalique du ou des oses. On obtient alors des O-hétérosides ou des C-hétérosides (figure 7).

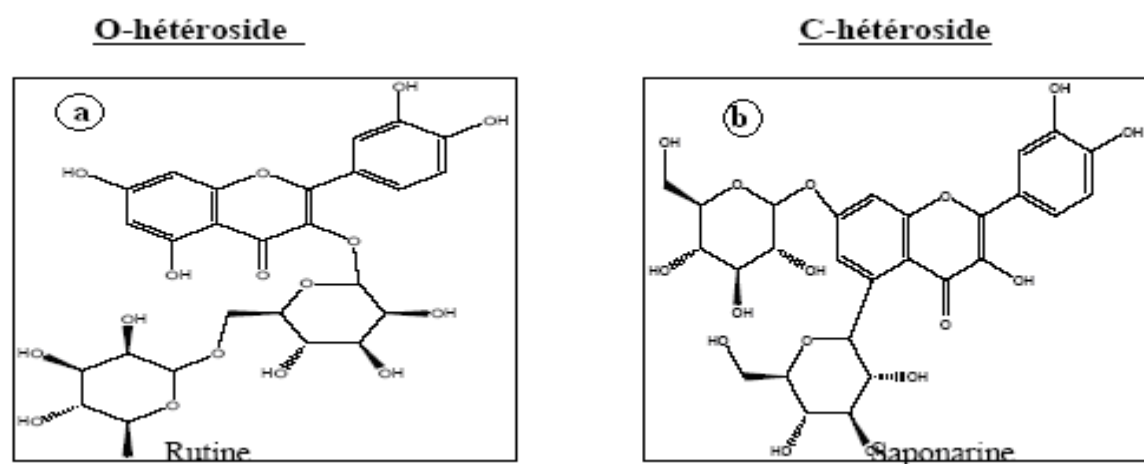


Figure 7 : Structure chimique de deux flavonoïdes O- et C-hétéroside

Il existe différentes génines :

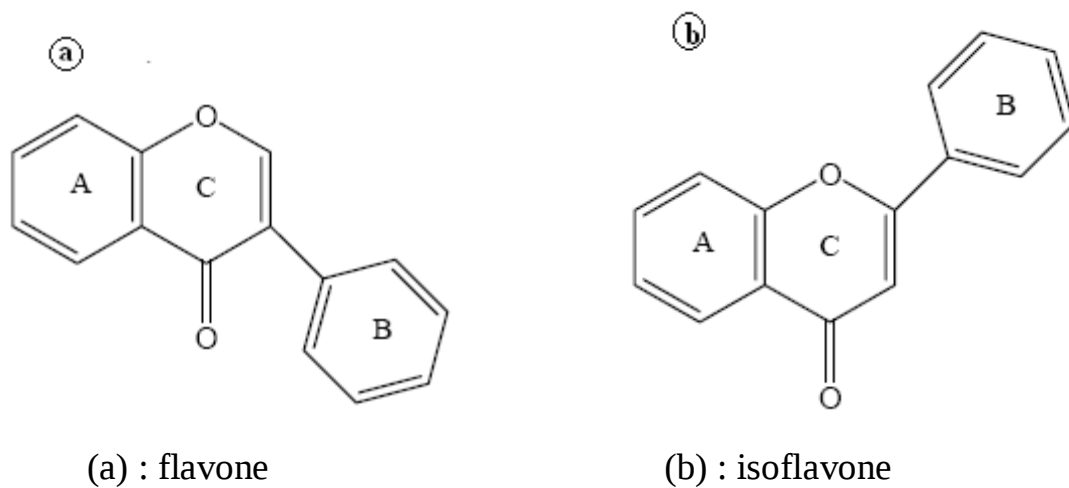


Figure 8 : Exemple de deux structures de flavonoïdes

✓ **Propriétés anti oxydantes des flavonoïdes**

Les polyphénols et surtout les flavonoïdes sont des antioxydants puissants susceptibles d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules (Van Acker et al, 1996). En effet, les flavonoïdes sont des piègeurs efficaces des radicaux libres les plus prooxydants, particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique, puisqu'ils préviennent comme cette dernière comme l' α -tocophérol. Ils formeraient des espèces radicalaires intermédiaires peu réactives (Laughton et al, 1989 ; Puppo, 1992). De plus, ils ont une activité chélatrice des métaux tels que le cuivre et le fer qui, à l'état libre, peuvent être à l'origine de la production de radicaux libres par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss (Van Acker et al, 1996 ; Puppo, 1992). Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de l'oxydation des LDL (De Whalley et al, 1990 ; Laughton et al, 1989).

o **Les tanins**

✓ **Définition, classification et structure**

Les tanins sont des substances d'origine végétale qui ont la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible, le cuir (Bruneton, 1999). Cette propriété de tanner provient de la création de liaisons entre les molécules de tanins et les fibres de collagène de la peau. Ce sont des polyphénols de masse moléculaires allant jusqu'à 20 000 Da (Hagerman, 2002). Selon leur structure biochimique, il est usuel de distinguer deux classes de tanins : les tanins hydrolysables (THs) et les tanins condensés (TCs) (Brunet, 2008 ; Muller-Harvey, 2001).

La structure chimique des tanins présente de nombreux groupements hydroxyles et phénoliques qui leur confèrent la propriété de former des complexes avec de nombreuses macromolécules telles que des protéines et des hydrates de carbones, ou encore avec des ions métalliques (Bravo, 1998 ; Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992).

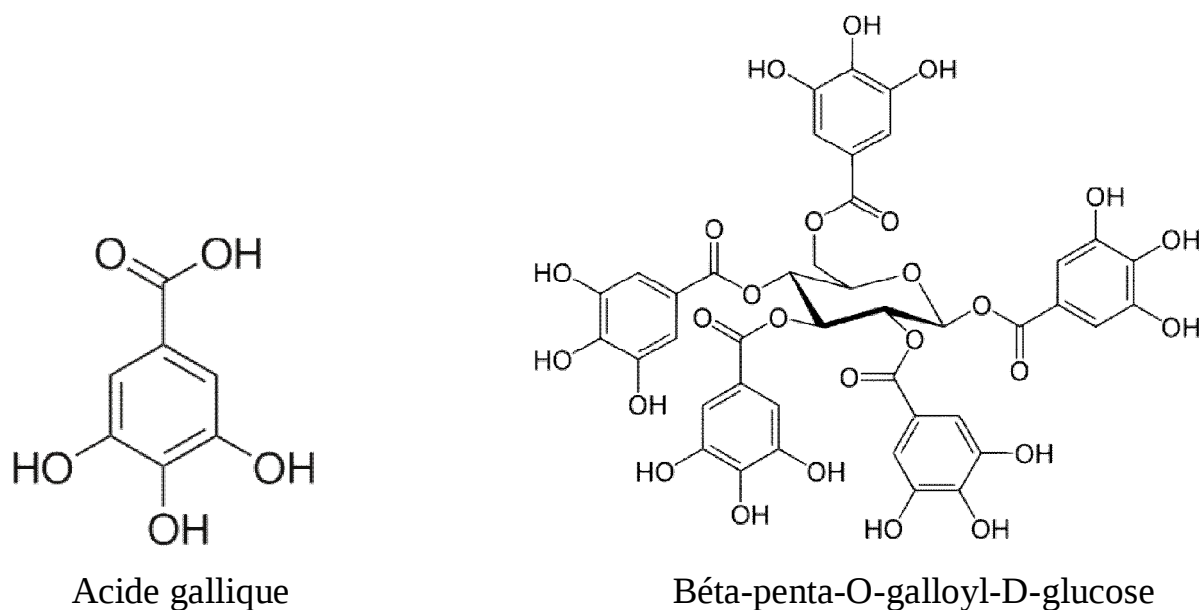


Figure 9 : Structures de l'acide gallique et d'un tanin gallique (Brunet, 2008)

✓ Propriétés anti oxydantes des tanins

De nombreux tanins présentent des propriétés anti-oxydantes par le piégeage des radicaux libres ou encore par l'inactivation des ions pro-oxydantes (Lim et al, 2007 ; Bruneton, 1999). Grâce à leurs fonctions phénoliques, qui ont un fort caractère nucléophile, les tanins sont d'excellents piégeurs de radicaux libres. Les radicaux libres tels le fer et le cuivre sous forme libre, sont des espèces chimiques instables très réactives. Ils s'attaquent à l'ADN et perturbent le processus de réplication, induisant des mutations cancérigènes (Brunet, 2008 ; Ellis, 2001 ; Richelle et al, 2001).

II.5. Phytothérapie antidiabétique

Le contrôle adéquat quotidien de la glycémie est très difficile à atteindre dans la plupart des cas ce qui conduit à long terme à l'émergence de complications très sérieuses. L'essor récent de la phytothérapie offre une opportunité pour trouver des molécules naturelles susceptibles d'exercer des effets bénéfiques sur la régulation du métabolisme glucidique en évitant les effets secondaires des substances synthétiques (Eddouks et al, 2007). Pour pallier aux effets

secondaires des traitements antidiabétiques, la recherche de nouveaux médicaments, à partir de plantes utilisées traditionnellement contre le diabète, se sont multipliées ces dernières années. En effet, les guanidines furent extraits pour la première fois à partir de *Galega officinalis*, qui constituent une source naturelle pour la l'hémi-synthèse des biguanides les moins toxiques que les guanidines (Dey lucey et al, 2002). D'autres composés végétaux montrent une activité biologique, antidiabétique.

Il a été montré que les flavonoïdes ont une action inhibitrice de l'aldose réductase. Cette enzyme convertit le D-glucose en sorbitol. Des travaux ont porté sur une quarantaine de flavonoïdes et substances apparentées (flavones, flavanones, isoflavones, catéchines...) qui se sont montrés tous inhibiteurs « in vitro » de l'aldose réductase à des concentrations variantes.

Tomas-Barberan et coll (1986), ont étudié l'activité inhibitrice de quinze flavonoïdes provenant de différentes plantes de la famille des Labiaceae vis-à-vis de l'aldose réductase de cristallin des rats. A quelques exceptions près, tous ces composés se sont montrés inhibiteurs plus ou moins puissants de l'aldose réductase. Et que le plus intéressant est l'axillarine ou le 5,7,3',4'-tétrahydroxy-3,6-diméthoxyflavone. Les flavones sont les meilleurs inhibiteurs de l'aldose réductase de tous les dérivés flavoniques. Dans ce groupe des flavones, les hétérosides sont les plus actifs que les génines correspondantes.

o Substances naturelles et plantes antidiabétiques

***Momordica charantia* (CUCURBITACEAE)**

Les différents organes de la plante et particulièrement le fruit sont utilisés pour le traitement du diabète (Karunanayake et al., 1990 ; Rivera, 1942)

Principes actifs:

- polypeptide P (polypeptide) (Marles and Farnsworth, 1995)
- Une administration sous cutanée du polypeptide P, chez des diabétiques de type 1, entraîne une action insulino-mimétique.

- Charantine (hétérosides stéroïdes) Dey Lucey et al, 2002)

Des études ont rapporté que:

- Le jus de *M. charantia* peut améliorer la tolérance au glucose chez les diabétiques de type 2 (Welihinda et al, 1986).
- L'extrait aqueux de *M. charantia* diminue la glycémie post prandial avec une réduction du taux de l'hémoglobine glycosylée (Srivastava et al, 1993).
- Il augmente l'utilisation hépatique du glucose et inhibe la néoglucogenèse, il réprime l'insulinorésistance en augmentant le taux des transporteurs membranaires de glucose (Al-Achi, 2005).

***Trigonelle foenumgricum* :**

Principes actifs:

- Trigonelline (Alcaloïde) (Dey Lucey et al, 2002 ; Marles and Farnsworth, 1995).

Les extraits bruts ont montré les effets suivants :

- Diminution de la glycémie post prandiale.
- Diminution du taux de glucagon, somatostatine, insuline, cholestérol total et des triglycérides
- Augmentation du taux d'HDL Cholestérol (Ribes et al, 1984).
- Resensibilisation des cellules à l'action de l'insuline (Al-Achi, 2005).

***Allium cepa et Allium sativum* (LILIACEAE)**

Elles sont utilisées comme hypoglycémiant. La drogue est constituée par le bulbe de la plante.

Principes actifs: ce sont des dérivés de la cystéine (Al-Achi, 2005 ; Dey Lucey et al, 2002 ; Marles and Farnsworth, 1995 ; Augusti, 1975).

- Allyl propyldisulfide (*Allium cepa*)
- Diallyl disulfide oxide ou Allicine (*Allium sativum*)

- Ces deux composés (dérivés de la cystéine) sembleraient agir par compétition avec l'insuline sur son récepteur (Al-Achi, 2005 ; Dey Lucey et al, 2002 ; Marles and Farnsworth, 1995).
- L'insuline est une protéine disulfurée inactivée par les albumines et autres composés riches en groupement –SH. Ainsi, l'Allyl propyldisulfide déplacerait ces composés par phénomène de compétition avec l'insuline pour le groupement –SH, produisant une potentialisation de l'effet de l'insuline qui préviendrait les augmentations d'acides gras (Augusti et Benaim, 1975).

Panax ginseng

Principes actifs :

- Ginsenoside (Hétéroside stéroïdique)
- Cette plante provoquerait une augmentation du nombre de transporteurs de glucose, une stimulation de la synthèse de l'insuline (Al Achi, 2005).

***Blighia sapida* (SAPINDACEAE)**

La drogue est constituée par le fruit. Deux principes actifs ont été isolés des graines.

Principes actifs:

- Hypoglycine A
- Hypoglycine B
- Les hypoglycines ont une action hypoglycémiante certaine qui est indépendante de la présence du pancréas et des glandes surrénales.
- L'hypoglycine A est deux fois plus active que l'hypoglycine B.
- L'hypoglycine A inhibe la formation glycogène hépatique à partir du glucose (Holt et al 1966).
- Les hypoglycines bloqueraient l'oxydation des acides gras à longues chaînes en inhibant les bêta-oxydations. L'organisme utiliserait alors d'autres voies pour produire son énergie, en l'occurrence il va oxyder de grandes quantités de

glucose d'où la diminution du glycogène hépatique et une baisse de la glycémie (Holt et al 1966).

***Catharanthus roseus* (APOCYNACEAE)**

Tous les organes sont utilisés dans la médecine populaire. La partie aérienne est surtout réputée antidiabétique. Dans tous les pays, l'infusion des feuilles est utilisée dans le traitement des diabétiques et donne une amélioration plus ou moins notable des symptômes de la maladie (Farnsworth, 1961).

Principes actifs : ce sont des alcaloïdes

- Lochnerine et Leurosine : ont une action hypoglycémiant de longue durée caractérisée par un début lent.
- Vindoline et Leurosine : exercent à doses égales une action plus puissante que celle du Tolbutamide.
- Isovindoline (chlorhydrate) est le plus hypoglycémiant des alcaloïdes expérimentés. Il exerce à dose égale, une action presque aussi puissante que celle de l'Acétohexamide (Farnsworth, 1961).

***Eugenia jambolana* (MYRTACEAE) (Sharma et al 2008)**

Divers organes tels que les feuilles, écorces et fruits sont utilisés comme drogue dans le traitement de maladies variées. La semence embryonnée sert spécialement dans le traitement du diabète.

- Une ingestion de 75 cg/jour de poudre de la graine entraîne non seulement une amélioration nette des signes cliniques et biologiques de la maladie diabétique, mais aussi une disparition de la cétose qui est une complication grave du diabète (Berhaut, 1967)

***Momordica charantia* (CUCURBITACEAE) (Kerharo, 1976).**

Tous les organes sont utilisés, mais surtout le fruit, dans le traitement du diabète.

Principes actifs :

- Momordicine
- Charantine

***Sclerocarya birrea* (ANACARDIACEAE)**

La drogue est constituée de feuilles d'une part et d'écorces de tronc ou des racines d'autre part.

Des tanins galliques et catéchiques ainsi que des flavonoïdes ont été mis en évidence dans les feuilles. Ces derniers sont précisément des hétéromonosides (glucose ou rhamnose), du Kaempférol et du quercétol.

Principes actifs :

- Kaempférol
 - Quercétol
- La poudre de feuilles est dépourvue d'activité chez le rat à glycémie normale, par contre l'activité hypoglycémiant est nette chez l'animal hyperglycémique, elle est proportionnelle à la dose administrée et l'hyperglycémie modérée s'annule pratiquement pour des doses de 1g/kg (Giono-Barber, 1971).
- une particularité de la plante est signalée (Gueye, 1973): son administration à des rats hypoglycémiques entraîne une augmentation du taux de sucre sanguin. Il apparait donc que la drogue agit sur un système régulateur de la glycémie, lequel est d'abord hyperglycémiant. Cependant, son mécanisme d'action exact n'a pu être déterminé.

***Scoparia dulcis* (SCROFULARIACEAE)**

La drogue est constituée de la plante entière.

Des traces d'alcaloïdes ont été signalées dans les feuilles de *Scoparia dulcis*, et aussi une substance amère insoluble. Par ailleurs, d'autres chercheurs ont fait état de la présence de triterpénoïdes dans les feuilles, tiges et racines (Kerharo, 1976).

Principes actifs :

- Amelline

- L'activité antidiabétique a été signalée par Nath et Banerjee (1943). En effet, après avoir extrait l'Amelline de la plante, elle a été utilisée dans des expériences qui se sont avérées concluantes. Ainsi, par voie orale, à raison de 15 à 20 mg/jour, l'Amelline produit une chute lente de la glycémie, alors que la glucosurie tombe graduellement à zéro.

Sur 15 malades traités régulièrement par administration buccale d'Amelline, on a assisté à une régression des signes du diabète (Nath et Banerjee, 1943).

***Tecoma stans* (BIGNONIACEAE)**

La drogue est constituée de feuilles.

Principes actifs :

- Técomine (alcaloïde)
- Técostamine (alcaloïde)

- L'extrait de feuilles entraîne une amélioration des symptômes du diabète et une régression de la glycémie.

- Après la découverte de la técomine et de la técostamine, leur action hypoglycémiant fut confirmée et semble être comparable à celle du tolbutamide.

- on a découvert qu'en même temps que les principes hypoglycémiants n'agissent qu'en présence d'un minimum de cellules bêta actives, mais le mécanisme d'action exact n'a pu être élucidé (Hammouda et al, 1963)

***Terminalia macroptera* (COMBRETACEAE)**

Ce sont les écorces des racines qui renferment des flavonoïdes qui sont utilisés pour l'activité antidiabétique (Diouk, 1991).

***Cassia occidentalis* L (CESALPINIACEAE)**

La drogue est constituée de graines.

Les principes responsables de l'activité hypoglycémiant sont des alcaloïdes (Seck, 1991)

***Ranunculus repens* L (RANUNCULACEAE)**

La drogue est constituée de feuilles. Les jeunes pousses de feuilles sont utilisées en décoction et en infusion dans le traitement du diabète sucré (Kebiech, 2009).

Les principes responsables sont des flavonoïdes.

- L'évaluation de l'effet antihyperglycémique des extraits de flavonoïdes chez les rats a mis en évidence une tolérance élevée des tissus au glucose, ce qui attribue une action insulino-mimique à ces substances qui stimulent la néoglycogénèse favorisant ainsi le stockage du glucose.
- Par ailleurs, il a été observé que les flavonoïdes de *R. repens* stimulent la sécrétion de l'insuline qui internalise le glucose dans le foie et qui le transforme en glycogène.
- Les résultats obtenus de l'étude de l'activité préventive des extraits flavonoïdiques comme la quercétine possèdent également un pouvoir chémoprotecteur de ces composés contre l'effet délétère et diabéto-gène de l'alloxane qui se manifeste par le maintien de l'équilibre redox des cellules pancréatiques malgré l'effet prooxydant et cytotoxique de l'alloxane (Kebiech, 2009).

***Cuminum nigrum* Linn (OMBELLIFERES) (Ahmad et al, 2000)**

La drogue est constituée de graines. Ces graines sont utilisées comme expectorant, antihelminthique, diurétique, galactagogue, carminative et antidiabétique.

- Les principes actifs des flavonoïdes.
- Selon Ahmad et al (2000), les flavonoïdes de *Cuminum nigrum* ont un effet hypoglycémique chez des lapins normaux et diabétiques ;

***Phyllanthus sellowianus* Muller (Hnatyszyn et al, 2002)**

La drogue est constituée d'écorces de tiges.

- Les principes actifs sont des composés flavoniques (Rutine, Isoquercétine).

- Les fractions butanoliques et aqueuses administrées à une dose égale à 200 mg/kg à des souris entraîne une réduction significative de la concentration du glucose dans les 6 à 9 heures.
- La réduction du glucose dans le sang obtenue est identique à l'effet hypoglycémique du glibenclamide à 10 mg/kg qui est utilisé comme référence pour l'activité hypoglycémique.
- L'analyse phytochimique des fractions révèle la présence de composés flavoniques. La rutine et l'isoquercétine y sont majoritaires.

Conclusion partielle

Les plantes médicinales revêtent un enjeu particulier pour les pays de tiers monde. Ces végétaux accumulent des métabolites secondaires qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme en particulier dans le domaine pharmacologique. Beaucoup de plantes sont utilisées dans la phytothérapie antidiabétique.

Icacina oliviformis possède différentes propriétés dont la plupart sont connues en médecine populaire. Le plus souvent ces propriétés n'ont pas fait l'objet de recherches très poussées pouvant conduire à la détermination de molécules responsables de ces activités. Les feuilles de *Icacina oliviformis* auraient des propriétés antidiabétiques et c'est pourquoi nous nous proposons dans le cadre de ce travail d'identifier les fractions actives et de déterminer la structure des molécules qui seraient responsables de cet effet.

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

Une étude phytochimique et pharmacologique ont été réalisée sur les feuilles de *Icacina oliviformis*. La récolte des feuilles de *Icacina oliviformis* a été faite aux mois de février 2010 et 2011 en Casamance dans l'enceinte de l'Université de Ziguinchor où elle pousse spontanément.

Au plan chimique :

Après extraction de la poudre de feuilles, les composés de la fraction éthanolique brute (FEB) ont été séparés sur colonne de silice avec deux systèmes d'éluant. La fraction éluée à l'acétate d'éthyle/méthanol (FAEM) évaporée à sec est soumise à des méthodes d'analyses spectroscopiques (HPLC, RMN, IR, MS) ce qui a permis d'isoler trois molécules et de déterminer les structures. Il s'agit de deux nouveaux flavonoïdes C-glycosylé (AG2 et AG3) non connues des bases de données et le *trans* (S, E)-(-)-Clovamide (AG4). La CCM a montré outre les flavonoïdes, la présence de tanins dans la FEB et la FAEM.

Au plan pharmacologique :

Les tests ont été réalisés chez des rats normo-glycémiques, sur un test de tolérance au glucose et chez des rats diabétiques de type 2. La méthode à la glucose oxydase été utilisée pour doser le glucose sanguin. Chez des rats normo-glycémiques, la FEB (150 mg/kg, per os) entraîne une baisse du glucose sanguin ($0,57 \pm 0,03$ g/L vs $0,68 \pm 0,03$ g/L) ($p < 0,05$; $n = 5$). Sur un test de tolérance au glucose, la FEB (150 mg/kg, per os) et la FAEM (150 mg/kg, per os) préviennent de façon significative l'apparition d'un pic d'hyperglycémie. Chez des rats diabétiques de type 2, l'administration quotidienne de la FAEM (150 mg/kg, per os) entraîne un effet anti-hyperglycémiant au bout de 8 jours de traitement.

La FAEM est anti-hyperglycémiant sur des modèles d'hyperglycémie temporaire et chronique. Cela pourrait justifier l'utilisation traditionnelle de feuilles de *Icacina oliviformis* pour traiter le diabète de type 2.

Chapitre 3 : ETUDES PHYTOCHIMIQUES DES FEUILLES DE *ICACINA OLIVIFORMIS* (POIRET) RAYNAL (ICACINACEAE)

I. Extraction et fractionnement

I.1. Matériel

I.1.1. Matériel végétal

Il est constitué de poudre de feuilles de *Icacina oliviformis* récoltées au mois de février 2010 et 2011 en Casamance dans l'enceinte de l'Université Assane Seck de Ziguinchor où elle pousse spontanément. Elles ont été identifiées et séchées pendant 3 semaines à la température ambiante au laboratoire de pharmacognosie de la Faculté de Médecine et Pharmacie de l'Université de Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD). Un spécimen est déposé à l'herbier du laboratoire de pharmacognosie. Après récolte et séchage, la drogue a été broyée à l'aide d'un broyeur de type Bradender OHG Duisburg. La poudre fine ainsi obtenue après pulvérisation a été utilisée comme matière première pour faire l'extraction.

I.1.2. Matériel de laboratoire

- ✓ Balance électronique de précision type SARTORIUS ;
- ✓ Ballon, Bécher, Erlenmeyer, fiole ;
- ✓ Papier filtre, Entonnoir ;
- ✓ Evaporateur rotatif, ballon rodé ;
- ✓ Etuve, dessiccateur, verre de montre ;
- ✓ Eau distillée ;
- ✓ Solvants organiques : cyclohexane, chloroforme, dichlorométhane, éthanol, méthanol, acétate d'éthyle
- ✓ Colonne, silice.

I.2. Méthodes

I.2.1. Extraction par des solvants de polarité croissante

Un épuisement de la drogue a été réalisé par des solvants de polarité croissante avec successivement de l'hexane, du dichlorométhane, de l'éthanol et de l'eau (figure 10). En effet, 230 g de poudre sont introduits dans un ballon de 2 litres contenant 500 ml de solvant et le tout porté à ébullition à reflux pendant 4 heures. Après refroidissement et filtration, le filtrat ainsi obtenu est évaporé à sec par un rota-vapor, et est mis dans un verre de montre et placé dans un dessiccateur pour une évaporation complète du solvant d'extraction. Le marc issu de l'extraction hexanique est repris successivement dans les mêmes conditions que précédemment par 500 ml de dichlorométhane, d'éthanol puis d'eau. Les filtrats obtenus donnent respectivement après évaporation les fractions dichlorométhanique, éthanolique (FEB) et aqueuse (FA).

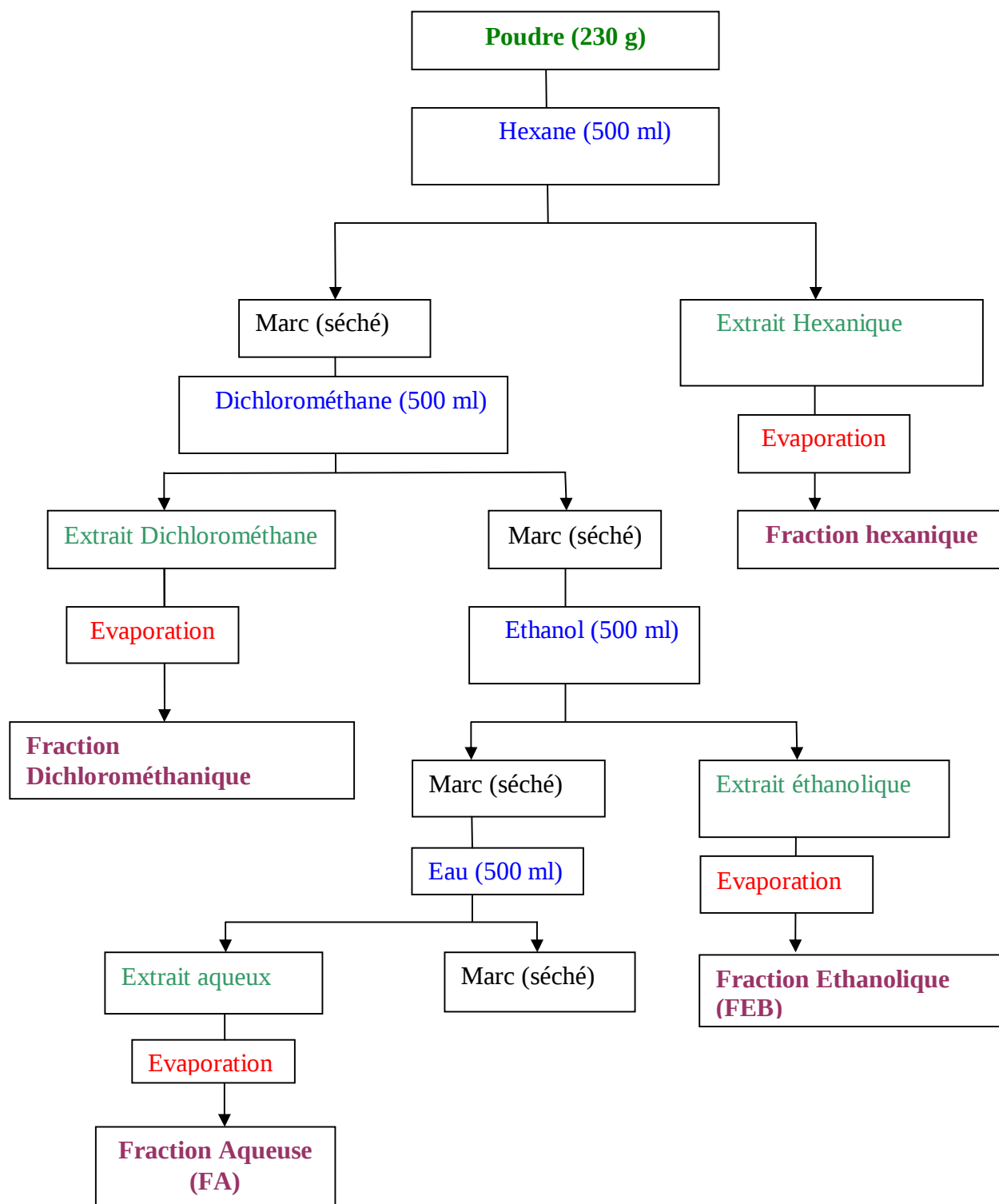


Figure 10 : Schéma de l'extraction des feuilles de *Icacina oliviformis*

I.2.2. Fractionnement de la FEB sur colonne de silice

8 g du résidu sec de la fraction éthanolique brute (FEB) sont fractionnés par chromatographie sur gel de silice (34 cm) au laboratoire de chimie et physique des matériaux (LCPM) de l'Université de Ziguinchor. L'élution est faite avec 1 litre suivant un gradient de polarité croissante successivement par un mélange de solvants avec Acétate d'éthyle / Cyclohexane (3 : 7 v/v) ; Acétate d'éthyle (AE) / Cyclohexane (7 : 3 v/v) et Acétate d'éthyle / Méthanol (9 : 1 v/v). Les trois phases obtenues successivement ont été évaporées séparément à sec (Figure 11).

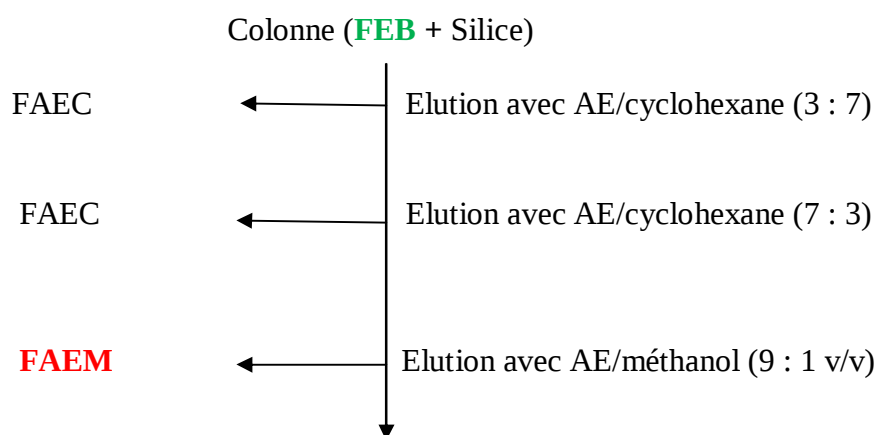


Figure 11 : Schéma du fractionnement de la FEB

FAEC : Fraction acétate d'éthyle /cyclohexane

La fraction Acétate d'éthyle / méthanol (FAEM) ainsi obtenue a été utilisée pour l'identification des molécules et mais aussi pour les tests pharmacologiques.

II. Identification des principes actifs

Deux principales méthodes ont été utilisées :

- ✓ Une chromatographie sur Couches Minces (CCM) ;
- ✓ Une méthode d'analyses spectrales : UV, IR, HPLC, RMN et SM.

II.1. Caractérisation de la FEB et FAEM par CCM

II.1.1. Matériel

Plaques Silicagel (E.Merck, Darmstadt, 60F₂₅₄ de dimension 5 x 10 cm d'épaisseur 0,5 mm), cuve chromatographique, étuve, lampe UV, solvants (méthanol, chloroforme, diéthylamine, acétate d'éthyle, eau, acide acétique, AlCl₃), Cinchonine, Quercetine, Acide Gallique.

II.1.2. Méthodes

La FEB et la FEAM retenues après bioguidage pharmacologique sur l'activité antidiabétique ont été analysés par CCM. En effet, 20 mg de la FEB et FAEM ont été dissous séparément dans 5 ml de méthanol. Les solutions ainsi obtenues sont utilisées pour faire la caractérisation.

II.1.2.1. Caractérisation des flavonoïdes

Quelques microlitres de la solution de FEB, de FAEM et de Quercétine (Q) ont été déposés sur une plaque chromatographique. Après séchage à l'air libre, la plaque était ensuite introduite dans une cuve chromatographique contenant le solvant de migration (éluant). L'éluant est composé d'un mélange d'acide acétique /eau (7,5 : 50, v/v). Après migration, la plaque a été révélée par une solution de chlorure d'aluminium (AlCl₃) à 5% dans le mélange eau / méthanol (1:1, v/v).

Après séchage, la plaque est observée sous la lumière ultra-violette U-V. L'observation de spots à fluorescence jaunâtre correspondant aux molécules de flavonoïdes, permet de déterminer les rapports frontaux (Rf) de chaque spot.

II.1.2.2. Caractérisation des tanins

Comme précédemment, après dépôt de quelques microlitres de la solution de la FEB, de la FAEM et de l'acide gallique (Ag), ces produits ont été élués avec un mélange de solvants composés d'acétate d'éthyle / méthanol / eau (40 : 8 : 5, v/v). La révélation a été faite par une solution de chlorure ferrique (FeCl₃) à 2%.

L'observation de spots de couleur bleu noire correspondant aux molécules de tanins, permet de déterminer les rapports frontaux (Rf).

II.1.2.3. Caractérisation des alcaloïdes

Le dépôt se fait de la même manière que pour les tanins et les flavonoïdes avec comme témoin la Cinchonine. L'élution a été faite avec une solution de chloroforme / diéthylamine (45 : 5, v/v), la révélation a été faite en versant une solution du réactif de Dragendorff sur la plaque qui est ensuite séchée à l'air libre. Une observation de tâches de couleur rose correspondant aux alcaloïdes permet de déterminer les rapports frontaux (Rf).

II.2. Analyses spectrales

Après avoir isolé une substance naturelle, le problème se pose d'identifier ce produit c'est-à-dire de déterminer sa formule aussi complète que possible. Pour ce faire, plusieurs méthodes peuvent être utilisées. Actuellement, celles qui donnent plus d'informations sur la structure sont les analyses spectroscopiques de masse (SM) et de résonance magnétique nucléaire (RMN) couplées à la chromatographie liquide haute performance (HPLC). A côté de ces méthodes, nous avons la spectrométrie d'absorption (ultra violet et infra rouge) qui donne moins d'informations. Les spectres infra rouge, bien que fournissant moins d'informations que la RMN et la spectrométrie de masse, donne un spectre complexe qui est un reflet de tous les détails de la structure moléculaire. Convenablement interprétés, ils fournissent sur les molécules étudiées, des renseignements qui peuvent être très précis. Les spectres IR contrairement aux spectres ultra violet sont individuels (spécifiques) en ce sens que seules deux molécules parfaitement identiques peuvent avoir exactement le même spectre. Les spectres UV ne sont intéressants que pour certains groupes chimiques présentant des insaturations. C'est ainsi que la spectrométrie UV contribue de façon importante à l'identification des flavonoïdes.

II.2.1. Spectrométrie d'absorption (UV, IR)

II.2.1.1. Principe de la spectrométrie UV-visible

C'est une spectrométrie qui a pour base l'absorption d'énergie dans l'UV et le visible. On distingue :

- o L'UV lointain dont la longueur d'onde varie de 100 à 200 nm et l'énergie absorbée comprise entre 140 et 280 Kcal.mol⁻¹ ;
- o L'UV proche : entre 200 et 400 nm, énergie entre 80 et 140 Kcal.mol⁻¹ ;
- o Le visible : entre 400 et 800 nm, énergie entre 35 et 80 Kcal.mol⁻¹.

Les bandes d'absorption observées sur le spectre dans l'UV correspondent à la présence dans la molécule de groupement non saturés. L'UV ne donne que des renseignements sur le degré d'insaturations d'une molécule d'où la nécessité d'utiliser d'autres méthodes pour avoir de plus amples informations.

II.2.1.2. Principe de la spectrométrie Infra-Rouge (IR)

C'est la spectrométrie vibrationnelle et rotationnelle. Notons cependant que la vibration est le phénomène le plus important. Une molécule soumise à une radiation IR absorbe une partie de cette irradiation conformément à la loi de Beer-Lambert et commence à vibrer.

A chaque groupe d'atomes susceptibles d'entrer en vibration ou en rotation à une longueur d'onde donnée correspond une bande d'absorption caractéristique des liaisons chimiques présentes dans ce composé. L'absorption d'une radiation infra rouge aura pour effet de faire vibrer successivement les liaisons des atomes présents dans une molécule. Cette absorption conduit au spectre IR qui bien interprété permet d'identifier les fonctions présentes dans le composé.

II.2.1.3. Matériel

- o Spectromètre UV
- o Spectromètre Moyen Infrarouge (IR) à Transformée de Fourier TENSOR 27 a été utilisé. Le système optique comprend :

- ✓ RockSolid, Interféromètre à miroirs en coin de cube, système à alignement permanent.
- ✓ Domaine de mesure 8000-340 cm^{-1}
- ✓ Résolution meilleure que 0,9 cm^{-1}
- ✓ Optique: compacte, scellée et desséchée pour travailler sous atmosphère stabilisée avec compartiment échantillon indépendant
- ✓ Compartiment échantillon: grand volume 255 x 270 x 160mm (l x p x h)
- ✓ IntelliSense, reconnaissance automatique des composants optiques (sources, détecteurs, séparatrices, laser)
- ✓ Polarimètre.

II.2.2. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

II.2.2.1. Principe

C'est une chromatographie de partage ou d'adsorption caractérisée par la finesse des particules de la phase solide (phase stationnaire), ceci nécessite à cet effet une forte pression pour obtenir un écoulement de la phase mobile (Bassène, 2012).

II.2.2.2. Matériel

- ✓ HPLC analytique: colonne LUNA 5 μ , C18 (2) 100A, 250 x 4,6 mm
- ✓ HPLC semi préparative: colonne LUNA 5 μ , C18 (2) 100A, 250 x 15 mm

Avec un CLHP chaîne DIONEX comprenant différents éléments :

- ✓ Une pompe : ultimate 3000 pump,
- ✓ Un injecteur : ASI-100 Automated Sample,
- ✓ Un four : STH585 column Oven,
- ✓ Un détecteur: UVD340S,
- ✓ Un logiciel d'acquisition : Chromeleon 6.8,
- ✓ Une température de colonne égale à 30°C,

- ✓ Un solvant d'élution : Eau + acide trifluoroacétique (TFA) (0,025%) (solution A) / CH₃CN (solution B) dans un rapport de 20% d'acétonitrile en isocratique,
- ✓ Une injection par 100 µl d'une solution de FAEM de C = 100mg/ml.

II.2.3. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

II.2.3.1. Principe

La RMN est une technique basée sur l'absorption de rayonnement électromagnétique par la matière. Elle renseigne sur la formule développée d'un composé chimique. Chaque noyau atomique possède une charge en rotation appelée spin. Un noyau est observable en RMN s'il présente des propriétés magnétiques caractérisées par l'existence d'un nombre de spin I non nul (Silverstein et al, 2007 ; Clayden et al, 2003).

Lorsque des noyaux à spin non nul (¹H, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁷O, ¹⁹F et ³¹P) sont placés dans un champ magnétique, ils prennent différentes orientations correspondant à des niveaux d'énergie basse et élevée. La transition du niveau d'énergie basse à celui d'énergie haute se fait par absorption d'une radiation. Il existe des valeurs particulières du champ magnétique et de la fréquence pour laquelle une transition est observée. On dit que les noyaux entrent en résonance. La RMN consiste à faire varier l'orientation en induisant des transitions entre les différents niveaux énergétiques (Silverstein et al., 2007 ; Clayden et al., 2003). Les atomes plus classiquement étudiés en RMN sont ¹H et ¹³C qui ont un spin I égal à ½.

Le spectre RMN permet l'établissement de la structure moléculaire d'un composé par la détermination de la nature et de l'environnement des atomes en résonance. L'analyse des spectres RMN fait appel à 3 éléments :

- Déplacement chimique : lié entre autre à la densité électronique du noyau et rend compte des écarts entre les signaux obtenus pour les noyaux de la même espèce mais soumis à des environnements différents.

- Couplage spin spin : rend compte de l'interaction entre les différents protons voisins au niveau du signal d'un type de proton. Il permet également d'identifier les protons qui se couplent réciproquement à partir de la constance de couplage.
- Intégration des signaux du spectre : elle rend compte de la proportionnalité entre le nombre de protons responsables des signaux et la surface des signaux.
- o Déplacement chimique (Koehn et Carter, 2005).

Le déplacement chimique est noté « δ » et exprimé en parties par million (ppm). Il permet d'avoir une idée du groupement chimique dans lequel se trouve le proton ou le carbone.

Le TMS (tétraméthylsilane : $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$) est utilisé comme référence car sa résonance se produit à un champ plus fort que dans la plupart des cas. Son pic d'absorption est situé à l'extrême droite du spectre et correspond à l'origine de l'échelle de mesure des déplacements chimiques. Le TMS est choisi en raison de sa bonne sensibilité due à ses 12 protons équivalents. De plus, inerte et très volatile, le TMS peut être facilement éliminé au moment de la récupération du produit.

Le déplacement chimique d'un proton correspond à la différence de valeur du champ pour lequel il résonne et l'origine de l'échelle.

Le proton possède une très haute sensibilité mais l'inconvénient majeur est que son spectre présente une échelle très étroite de ses déplacements chimiques. Par contre ^{13}C à l'opposé du spectre RMN du proton, a une grande échelle de déplacements chimiques mais une intensité très faible.

Signalons que le solvant de dissolution de la molécule à analyser par RMN ne doit pas comporter de protons (exemple chloroforme deutéré : CDCl_3)

- RMN bidimensionnelle

En RMN bidimensionnelle les taches observées correspondent à des interactions entre noyaux. S'il s'agit d'une interaction ^1H - ^1H , on parle de corrélation homonucléaire. Si deux noyaux de natures différentes interagissent, on a une corrélation hétéronucléaire (^1H - ^{13}C).

- HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy)

Le spectre du proton est inséré horizontalement et celui du ^{13}C verticalement. Les taches décelées correspondent à la connexion en ^1J (une liaison) entre un carbone et un proton. En d'autres termes, il permet de corréler chaque carbone d'une molécule avec le ou les hydrogènes qui lui sont liés par covalence. Chacune des liaisons C-H de la molécule correspond à un pic de corrélation sur le spectre HSQC. La position du pic au niveau du spectre est fonction des déplacements chimiques du proton et du carbone (Koehn et Carter, 2005).

- HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation spectroscopy)

Le spectre du proton est inséré horizontalement et celui du ^{13}C verticalement. Les taches décelées correspondent à la connexion entre un carbone et un proton non plus à ^1J , mais en ^2J et ^3J . Cependant, dans ces couplages longue distance, il peut y avoir des artefacts correspondant à des couplages en ^1J (Koehn et Carter, 2005).

- COSY (Correlation Spectroscopy homonuclear)

Les informations fournies par un spectre COSY se traduisent aussi en relation de proximité entre carbones si on dispose d'un spectre HSQC.

- DEPT

Dans le spectre du DEPT permet d'identifier d'une part les carbones quaternaires et d'autre part les CH, CH₂ et CH₃. Les carbones pairs (CH, CH₃) apparaissent en mode positif et les impairs (CH₂) en négatif.

II.2.3.2. Matériel

- Spectromètre : Les spectres RMN ^1H et ^{13}C sont réalisés avec un appareil de 600MHz, sonde TCI Avance III, marque Brüker.

II.2.4. Spectrométrie de masse (SM)

II.2.4.1. Principe

L'application de la spectrophotométrie de masse aux molécules organiques, implique leur bombardement par un faisceau d'électron de moyenne énergie sous vide poussé et l'analyse des fragments ainsi formés. La fragmentation se fait par l'ionisation des molécules. L'ionisation entraîne en effet une accumulation d'énergie qui en se dissipant peut entraîner la rupture des liaisons interatomiques et donner naissance à des fragments caractérisés par le rapport masse/charge (m/z).

Les différents fragments chargés ainsi produits sont accélérés avant de parvenir à un analyseur (filtre de masse) qui les sépare en fonction du rapport m/z .

Le spectre de masse représente sous forme graphique, l'abondance des ions sur la base de leur rapport m/z . Il fournit des renseignements sur la masse moléculaire, la disposition des groupes spécifiques dans la molécule ainsi que sur la formule de la molécule étudiée.

II.2.4.2. Matériel

- Spectromètre G1019 A (Hewlett Packard),
- mode ionisation par Electrospray (ESI).

II.3. Méthode d'identification de molécules

FAEM montrant une activité anti-hyperglycémiant intéressante chez des rats diabétiques de type 2 a été retenue pour identifier et déterminer la ou les molécules responsables de cette activité.

L'identification a été faite à l'aide de méthodes spectroscopiques. Une spectrométrie de masse est effectuée afin de déterminer la masse moléculaire de chaque composé isolé.

Ainsi, une expérience de chromatographie liquide couplée à la masse (LC/MS) a été d'abord réalisée sur la FAEM à l'Université d'Amiens au Laboratoire des Glucides avec une colonne Prevail™ C18. Une purification de la FAEM a été fait sur HPLC, et en suite des analyses de résonance magnétique nucléaire (RMN) mono et bidimensionnelles sont réalisées afin d'établir la formule développée de chaque molécule.

Pour une bonne compréhension de notre démarche de caractérisation structurale, il est important de rappeler quelques éléments clés de la RMN hétéronucléaire que nous avons utilisés.

Les déplacements chimiques des ^{13}C apportent une information structurale complémentaire à ceux du ^1H . Leur corrélation au moyen des spectres HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) et HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) a considérablement facilité l'élucidation de structures complexes de molécules organiques et a amélioré la fiabilité des solutions proposées. Il est aussi possible de réaliser des corrélations entre noyaux ^1H et ^{15}N , qui peuvent apporter une aide précieuse dans l'étude d'un grand nombre de molécules d'origine naturelle ou synthétique. Les exemples décrits ici ne concerneront que les corrélations ^1H - ^{13}C .

Un spectre HSQC corréle les δ des ^1H et des ^{13}C directement liés. Malgré la faible abondance isotopique du ^{13}C (1 %), c'est l'expérience de RMN 2D hétéro nucléaire la plus sensible. Elle ne donne toutefois pas d'information sur les carbones quaternaires. Ceux-ci sont accessibles grâce à l'expérience HMBC, qui corréle les δ des ^1H et des ^{13}C séparés par plus de 1 liaisons, leur nombre étant principalement 2 ou 3, mais possiblement plus si certaines conditions structurales sont réunies (systèmes aromatiques conjugués, systèmes plans).

Une corrélation HMBC C_A - H_B à travers n liaisons et une corrélation HSQC C_B -

H_B indiquent que C_A et C_B sont séparés par $n-1$ liaisons. En considérant que n vaut 2 ou 3, cela signifie que C_A et C_B sont soit liés ensemble, soit liés à un atome commun indéterminé X . Si tous les voisins de C_A ou de C_B sont connus, le nombre de possibilités pour X est restreint par rapport à la situation où les listes de voisins de C_A et C_B ne sont pas totalement connues. Il faut donc en priorité analyser les corrélations des atomes dont les voisins sont tous connus.

Pour un méthyle n'ayant qu'un seul voisin, l'analyse des corrélations des groupes méthyles doit s'effectuer de manière prioritaire. Ceci est d'autant plus vrai que toutes les corrélations des protons d'un groupe méthyle sont toujours visibles. L'ordre dans lequel les corrélations sont choisies, soit pour attribuer des spectres, soit pour trouver une structure, est optimal lorsqu'il n'y a qu'un nombre minimal de possibilités de déduction. Il n'est cependant pas toujours possible de réduire ce nombre à 1 pour toutes les corrélations HMBC.

Les informations fournies par un spectre COSY (Correlation Spectroscopy homonucleaire) se traduisent aussi en relation de proximité entre carbones si on dispose d'un spectre HSQC: Une corrélation COSY H_A-H_B à travers n liaisons et les corrélations HSQC C_A-H_A et C_B-H_B indiquent que C_A et C_B sont séparés par $n-2$ liaisons. Dans le cas où n vaut 2, le spectre HSQC permet de détecter immédiatement si les 2 noyaux 1H (de δ différents) sont portés par le même carbone. Les corrélations à travers 3 liaisons permettent de déduire des liaisons entre atomes de carbone.

Pour faciliter l'exploitation simultanée des spectres COSY, HSQC et HMBC, il peut être commode d'identifier les atomes d'hydrogène et de carbone, non pas par leur déplacement chimique mais par un numéro donné arbitrairement. On utilise dans un premier temps le spectre de ^{13}C et on numérote les résonances par ordre de δ croissants ou décroissants. Le spectre HSQC est ensuite utilisé pour donner le même numéro à un 1H et un ^{13}C directement liés. Plusieurs signaux de 1H peuvent ainsi porter le même numéro. Les spectres COSY et HMBC se réduisent alors à un ensemble de paires de numéros d'atome, chacun

étant relié à une position particulière de la molécule étudiée. Une relation COSY (n_A , n_B) indique que C_A et C_B sont liés, et une relation HMBC (n_A , n_B) indique soit que C_A et C_B sont liés, soit que C_A et C_B sont liés au même atome X (en excluant un chemin de couplage de longueur strictement supérieure à 3 liaisons).

Le diméthyl sulfoxyde (DMSO- d_6) est utilisé comme solvant de dissolution lors de l'analyse.

Chapitre 4 : Etudes pharmacologiques de l'activité antihyperglycémiant des feuilles de *Ipomoea oliviformis*

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

Des rats mâles et femelles de souche Wistar de poids compris entre 125 et 165g ont été utilisés. Ces animaux ont été élevés à l'Université de Dakar dans l'animalerie du laboratoire de pharmacologie. Le choix des rats pour les tests pharmacologiques a été basé sur le poids et sur leur état de santé (aucune lésion oculaire, pas de femelles gravides ou allaitantes).

Le matériel végétal est constitué d'extraits de feuilles de *Ipomoea oliviformis*.

I.2. Matériel de laboratoire

- ✓ Balance électronique de précision type SARTORIUS ;
- ✓ Balance électronique de précision type Testut ;
- ✓ Chlorure de sodium ;
- ✓ Seringue de 10cc avec sonde métallique pour gaver les rats ;
- ✓ Seringue de 2cc pour l'injection sous-cutanée d'alloxane
- ✓ Pipette Pasteur en verre pour le prélèvement de sang ;
- ✓ Tubes à hémolyse contenant un anticoagulant (oxalate de potassium) et un anti-glycolytique (fluorure de sodium) ;
- ✓ Gants, coton, portoirs ;

- ✓ Centrifugeuses type JOUAN ;
- ✓ Spectrophotomètre type Biosystem ;
- ✓ Un kit de réactif de glucose (Biosystem S.A. ou RANDOX) ;
- ✓ Micropipettes et embouts adaptés ;
- ✓ Chronomètre ;
- ✓ Solution de monohydrate d'alloxane ;
- ✓ Solution glucosée de 50g /100ml ;
- ✓ Comprimés de Glibenclamide (DAONIL[®]) dosés à 5 mg ;
- ✓ Bandelettes réactives de type KETO-DIASTIX (Bayer)

II. Méthodes

L'activité antidiabétique des différentes fractions de feuilles de *Icacina oliviformis* a été étudiée chez différents modèles de rats de souche wistar soumis à un jeun de 14 heures. Les tests pharmacologiques ont été réalisés chez des rats normo-glycémiques, sur un modèle de rats soumis à un test de tolérance au glucose et chez des rats diabétiques de type 2.

II.1. Mise en place des modèles diabétiques

Pour un test de tolérance au glucose, l'installation du diabète temporaire a été faite par une administration par voie orale (per os) d'une solution de glucose 50% à la dose de 4 g/kg chez des rats normo-glycémiques.

Dans le cas du diabète permanent de type 2, le diabète a été provoqué par une administration sous-cutanée de monohydrate d'alloxane qui entraîne, chez des rats normo-glycémiques, une destruction des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, responsables de la sécrétion d'insuline. Cette carence en insuline entraîne une hyperglycémie permanente 48 heures après administration de l'alloxane.

- o Détermination de la glucosurie

La recherche du glucose dans les urines se fait par une méthode enzymatique au moyen de bandelettes réactives type Keto-diaistix.

o Prélèvements sanguins

Le prélèvement sanguin a été effectué au niveau du sinus rétro-orbitaire de l'animal à l'aide d'une pipette pasteur en verre. Le sang prélevé est mis dans des tubes contenant un mélange oxalate de potassium-fluorure de sodium. Après chaque prélèvement, la pipette a été rincée avec de l'eau physiologique. Les tubes ont été centrifugés à une vitesse de 9000 tours /mn pendant 15 min. Le surnageant ainsi formé (plasma) est utilisé pour doser le glucose.

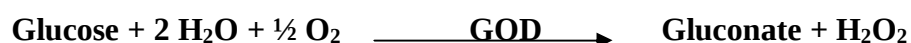
II.2. Dosage du glucose sérique (Trinder, 1969)

La glycémie peut être dosée par de très nombreuses méthodes, dont les plus anciennes sont colorimétriques alors que celles pratiquées actuellement sont enzymatiques.

Dans la présente étude, la glycémie a été déterminée suivant une méthode enzymatique ; méthode à la glucose oxydase, au laboratoire de biochimie du CHU de Fann (Dakar). Cette méthode a été réalisée grâce à un kit RANDOX (lot 1481 GL ; Réf. G2366).

o Principe

C'est une méthode de dosage qui consiste à oxyder le glucose sanguin par le glucose-oxydase (GOD). En présence du GOD, le glucose en solution aqueuse est oxydé par l'oxygène dissout en acide gluconique avec formation de peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée (H₂O₂).



En présence de peroxydase (POD), le H₂O₂ est décomposé et oxyde un chromogène, le 4-aminoantipyrine qui est incolore à l'état réduit.



La quinoneimine formée présente une coloration rose dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en glucose. Cette intensité a été mesurée au spectrophotomètre à 500 nm.

o Mode opératoire

Composition du kit de glucose

Le kit renferme un réactif (A) et un étalon (S) qui sont prêts à l'emploi :

✓ Réactif (A) : Phosphate 70mmol/l ;

Phénol 5mmol/l ;

Glucose oxydase > 10U/ml ;

Peroxydase > 1U/ml ;

4-aminoantipyrine 0,4 mmol/l ; pH 7,5.

✓ Glucose standard (S): Glucose 100 mg/dl (5,55mmol/l).

Préparation des solutions à doser

Le réactif (A) est maintenu à la température ambiante et à l'aide d'une micropipette la répartition des produits été réalisée selon le protocole décrit dans le tableau I.

Tableau I : Protocole de dosage du glucose

Tube Réactifs	Blanc	Etalon	Echantillon
Glucose standard (S)	-	10µl	-
Echantillon (plasma)	-	-	10µl
Réactif A (glucose-oxydase)	1000µl	1000µl	1000µl

L'ensemble de ces tubes ainsi préparés a été incubé à la température ambiante du laboratoire (25°C) ou au bain-marie pendant 10 ou 5 mn respectivement. A l'aide d'un spectrophotomètre, l'absorbance (A) de l'étalon et de l'échantillon est mesurée contre le blanc. La stabilité de la réaction est d'environ 40 mn. La concentration en glucose exprimée en g/l est lue directement sur l'appareil. La

concentration de l'échantillon peut être calculée en utilisant la formule générale :

$$\text{Concentration du glucose (g/l)} = \frac{A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{étalon}}} \times \text{Concentration étalon}$$

II.3. Recherche de l'activité des fractions sur le glucose sanguin

L'activité des feuilles de *Icacina oliviformis* sur la glycémie a été étudiée chez des rats de souche wistar. Les expériences ont été réalisées chez des rats normo-glycémiques, sur un test de tolérance au glucose et chez des rats diabétiques de type 2.

II.3.1. Essais chez des rats normo-glycémiques

Des rats ont été sélectionnés et répartis en lots de 5 rats chacun puis mis à jeun pendant 14 heures avant le début de l'expérience.

- **Lot 1 témoin ou contrôle** a reçu de l'eau physiologique à raison de 10 ml/kg, per os ;
- **Lot 2 traité** avec la fraction éthanolique brute (FEB) à la dose de 150 mg/kg de poids, per os;
- **Lot 3 traité** avec la FEB à la dose de 300 mg/kg, per os ;
- **Lot 4 traité** avec la fraction aqueuse (FA) à la dose de 300 mg/kg per os.

Un premier prélèvement sanguin a été effectué chez tous les rats avant administration du produit à T0 pour déterminer la glycémie de base (glycémie à jeun). Immédiatement après, les fractions et l'eau physiologique ont été administrées per os. Les prélèvements ont été faits toutes les heures pendant 4 heures correspondant respectivement à T1, T2, T3 et T4.

II.3.2. Essais chez les rats en hyperglycémie temporaire

Quinze rats ont été sélectionnés et répartis en lots de 5 rats chacun puis mis à jeun pendant 14 heures avant l'expérience.

- **Lot 1 témoin** reçoit de l'eau physiologique à raison de 10 ml/kg, per os ;
- **Lot 2 traité** avec la FEB à la dose de 150 mg/kg, per os ;
- **Lot 3 traité** avec la fraction acétate d'éthyle / méthanol (FAEM) à la dose de 150 mg/kg, per os ;

Le premier prélèvement sanguin a été effectué à T-90nm (1 h 30 min avant administration du glucose) pour déterminer la glycémie de base. En suite, les rats ont reçu immédiatement l'eau physiologique, la FEB ou la FAEM suivant les lots précités. Au temps T0 (1h 30 min après), un deuxième prélèvement a été effectué suivi immédiatement d'un gavage avec une solution de glucose à 50% à la dose de 4 g/kg per os pour tous les rats. Des prélèvements ont été effectués toutes les 30 min pendant deux heures correspondant respectivement à T30, T60, T90 et T120 mn.

II.3.3. Essais chez les rats diabétiques de type 2 ou alloxaniques

Le diabète de type 2 a été induit chez des rats par injection sous-cutanée d'une solution fraîchement préparée de monohydrate d'alloxane en solution dans du sérum physiologique 0,9 % à la dose de 120 mg/kg per os.

Deux jours après administration de l'alloxane, la glycosurie est déterminée à l'aide de bandelettes réactives de type Keto-Diastix[®]. Les rats présentant une glycosurie franche sont sélectionnés et répartis en 4 lots de 8 à 10 rats puis traités pendant une semaine :

- **Lot 1 témoins ou contrôle** qui reçoit de l'eau physiologique à raison de 10 ml/kg/j, per os ;
- **Lot 2 référence** traité par le glibenclamide à la dose de 0,3 mg/kg/j, per os (dose thérapeutique) ;
- **Lot 3 traité** par la FAEM à la dose de 150 mg/kg/j, per os;
- **Lot 4 traité** par la FAEM à la dose de 300 mg/kg/j, per os ;

Les prélèvements sanguins ont été effectués à J0 avant traitement puis toutes les 48 heures pendant 8 jours à J2, J4, J6 et à J8.

II.4. Analyse statistique et expression des résultats

Les résultats de la glycémie ont été exprimés sous la forme d'une moyenne $\pm$ erreur standard à la moyenne (Moy $\pm$ ESM). Ils ont été comparés à l'aide du test « t » de Student. La différence entre deux moyennes a été considérée comme significative lorsque $p < 0,05$, $n = 5$ est le nombre d'expériences dans chaque groupe.

Chapitre 5 : RESULTATS ET DISCUSSION

I. Etude chimique

I.1. Rendements des extractions

I.1.1. Extraction par gradient de polarité croissant

Les rendements de poids secs des fractions ont été calculés à partir de la poudre de feuilles. La fraction aqueuse (FA) représente le rendement le plus élevé (17,37%) suivi de la fraction dichlorométhanique (5,21%) puis de la fraction éthanolique (FEB) (3,67%). Le rendement le plus faible (1,80%) est obtenu par la fraction hexanique (Tableau II)

Tableau II: Rendement de l'extraction par épuisement avec des solvants de polarité croissante

Solvant d'extraction	Poids secs fractions (g)	Rendement (%)
Hexane	12	5,21
Dichlorométhane	4,15	1,80
Ethanol	8,45	3,67
Eau	39,97	17, 37

I.1.2. Séparation sur colonne

Le fractionnement a permis d'obtenir à partir de 8 g de la FEB une fraction acétate d'éthyle/méthanol (FAEM) majoritaire avec un rendement de 75%. Pour la fraction acétate d'éthyle /cyclohexane le rendement le plus élevé est obtenu pour le rapport 7/3 : v/v (15%) contre 3/7 : v/v avec seulement 12,5% (Tableau III).

Tableau III : Rendement de fractionnement de la FEB

Solvant d'élution	Poids fractions (g)	Rendement (%)
AE/ cyclohexane (3/7)	1	12
AE/ cyclohexane (7/3)	1,2	15
AE/ méthanol (9/1)	6	75

I.2. Identification des principes actifs

I.2.1. Chromatographie sur couches minces (CCM)

I.2.1.1. CCM des flavonoïdes

La caractérisation a révélé l'existence de groupes de composés flavonoïdiques qui dans le chromatogramme, représentent les deux spots visualisés en UV. Ces deux groupes de composés sont aussi bien présents dans la FEB et dans la FAEM avec une plus forte teneur dans la FAEM. Ces composés ont pratiquement le même rapport frontal tant pour le premier composé ($R_f = 0,66$ et $0,86$) que pour le deuxième composé ($R_f = 0,66$ et $0,88$) respectivement pour de la FEB et FAEM. La figure 12 représente le chromatogramme obtenu et les rapports frontaux (R_f) sont calculés, leurs valeurs sont consignées dans le tableau IV ci-dessous.

Tableau IV : R_f des composés flavonoïdiques après révélation

Produits à caractériser	R_f spots à fluorescence jaunâtre sous UV
Quercétine (Q)	0,33
Fraction acétate d'éthyle méthanol (FAEM)	0,66
	0,86
Fraction éthanolique brute (FEB)	0,66
	0,88

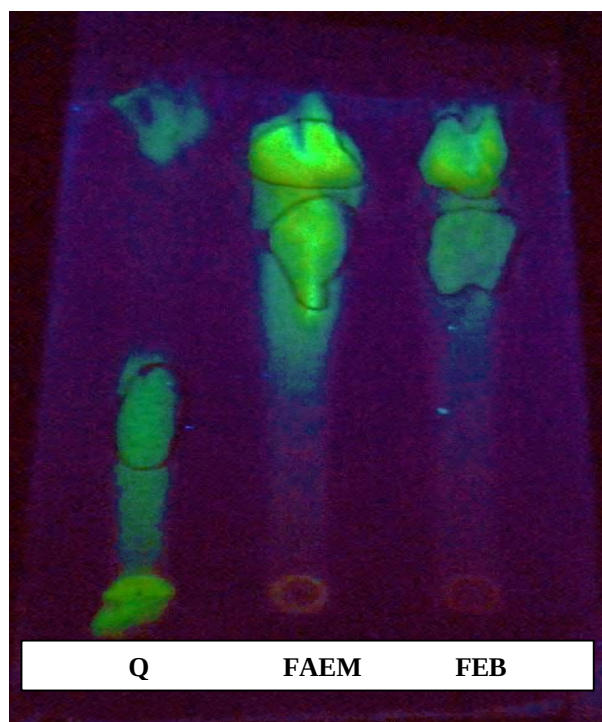


Figure 12 : Chromatogramme de la caractérisation des flavonoïdes visualisé sous UV

FEB = fraction éthanolique brute ; **FAEM** = fraction acétate d'éthyle méthanol ; **Q** = Quercétine

Eluant : Acide acétique / eau (7,5 : 50 v/v)

I.2.1.2. Chromatographie sur couches minces des tanins

La caractérisation a montré des spots caractéristiques des tanins. Ainsi, la CCM a révélé la présence d'un seul groupe de composés tanniques dans les deux fractions (FEB et FAEM). Le groupe de molécules présent dans FEB ($R_f = 0,88$) présentent un rapport frontal égal à celui de l'acide gallique utilisé comme témoin ($R_f = 0,88$) et pratiquement identique à celui de FAEM avec un $R_f = 0,89$. Le chromatogramme obtenu est représenté dans la figure 13 et les R_f calculés sont consignés dans le tableau V.

Tableau V : Rf des composés tanniques après révélation

Produits à éluer	Rf des taches
Acide Gallique (Ag)	0,88
Fraction acétate d'éthyle méthanol (FAEM)	0,89
Fraction éthanolique brute (FEB)	0,88

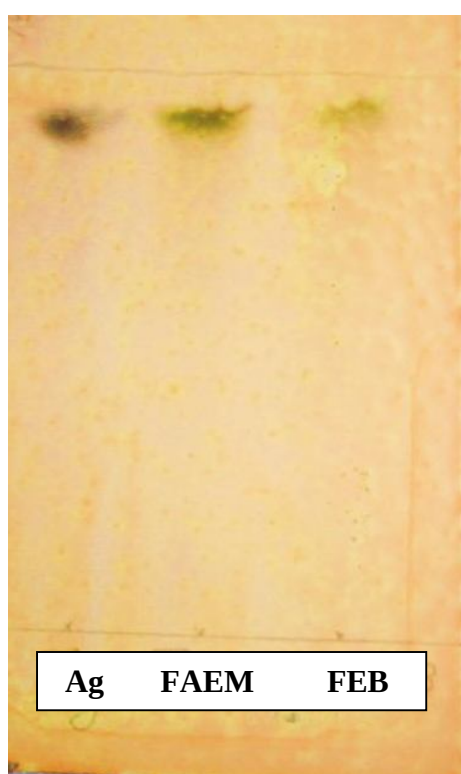


Figure 13 : Chromatogramme obtenue par la caractérisation des tanins

Ag = acide gallique ; **FAEM** = Fraction acétate d'éthyle / méthanol ; **FEB** = Fraction éthanolique brute

Eluant : Acétate d'éthyle / méthanol / eau (40 : 8 : 5 v/v)

I.2.2. Analyses spectrales

Le spectre UV de la FAEM est donné par la figure 14. On observe deux pics à 288,5 nm et 319,5 nm. Le spectre de masse du pic à 319 nm obtenu par LC/Ms est donné à la figure 15.

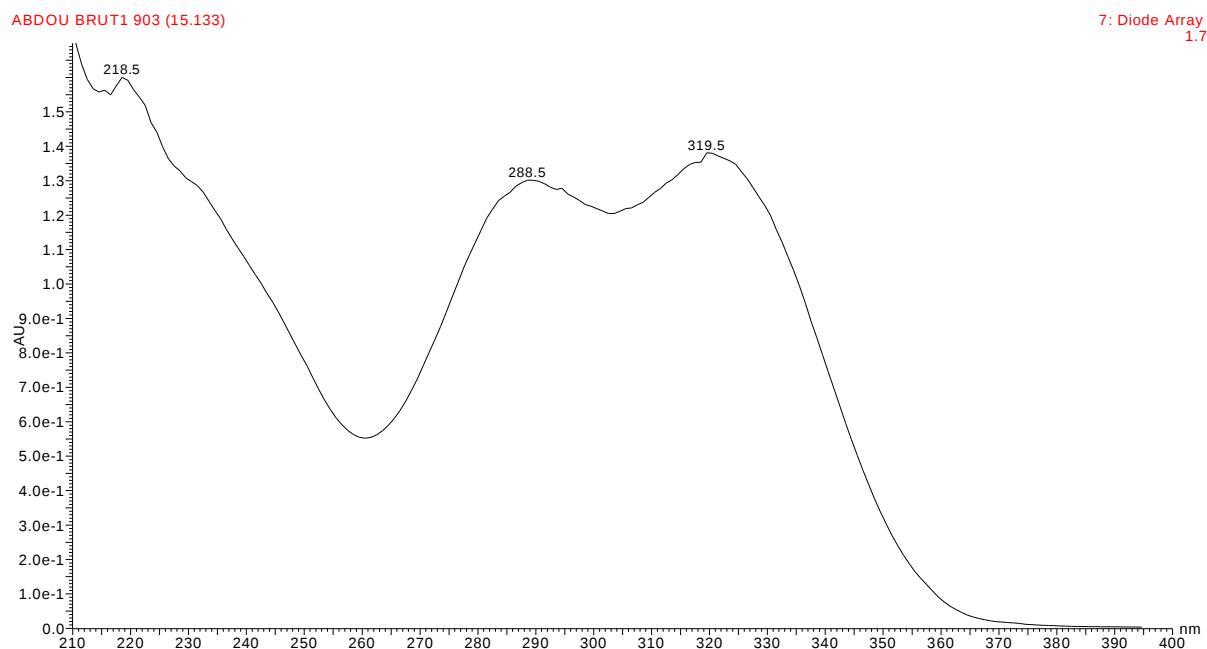


Figure 14: Spectre UV de la FAEM

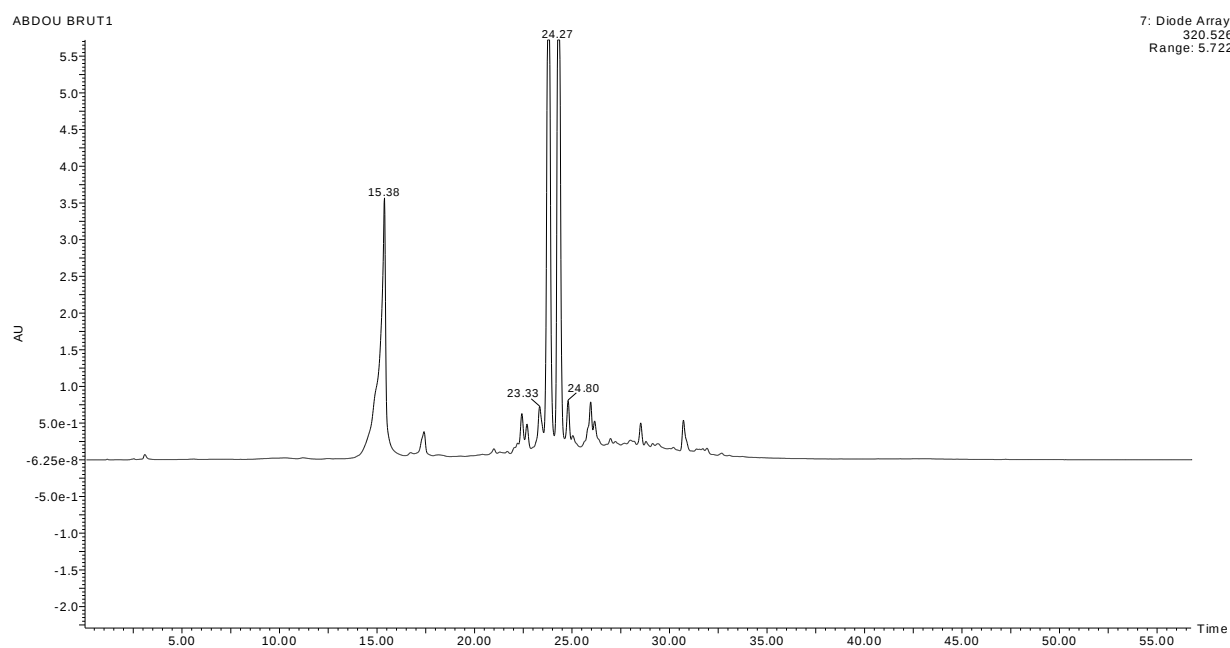


Figure 15: Spectre LC/MS de la FAEM à 319 nm

Les spectres MS des pics élués à 15 min en mode négatif et à 23 et 24 min en mode positif sont donnés respectivement par la figure 16 et la figure 17.

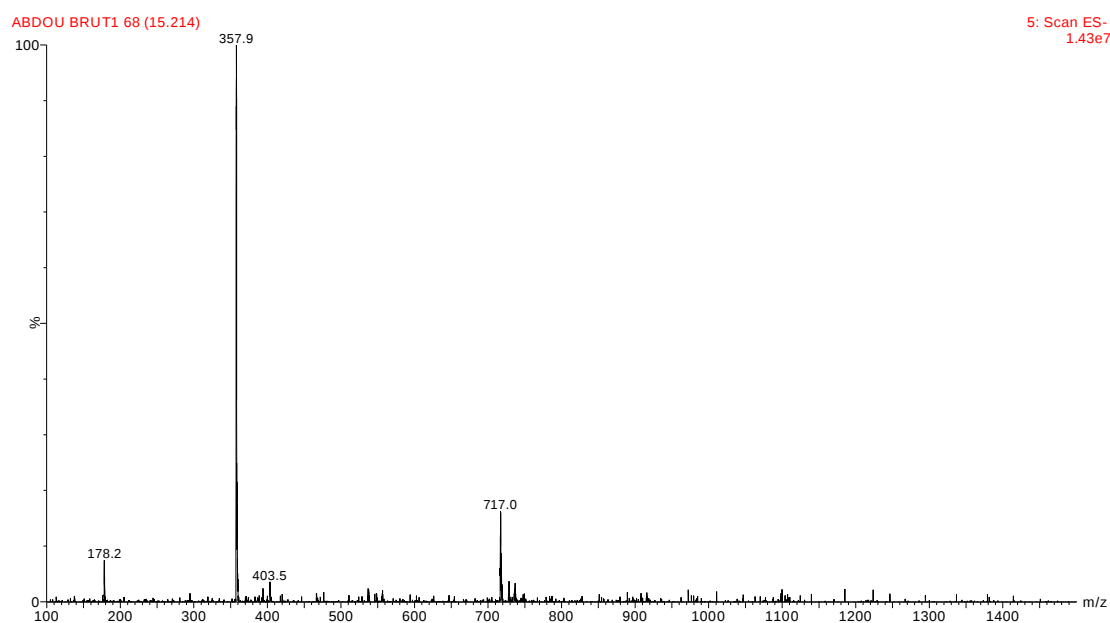


Figure 16: Spectre MS du pic élué à 15 min en mode négatif

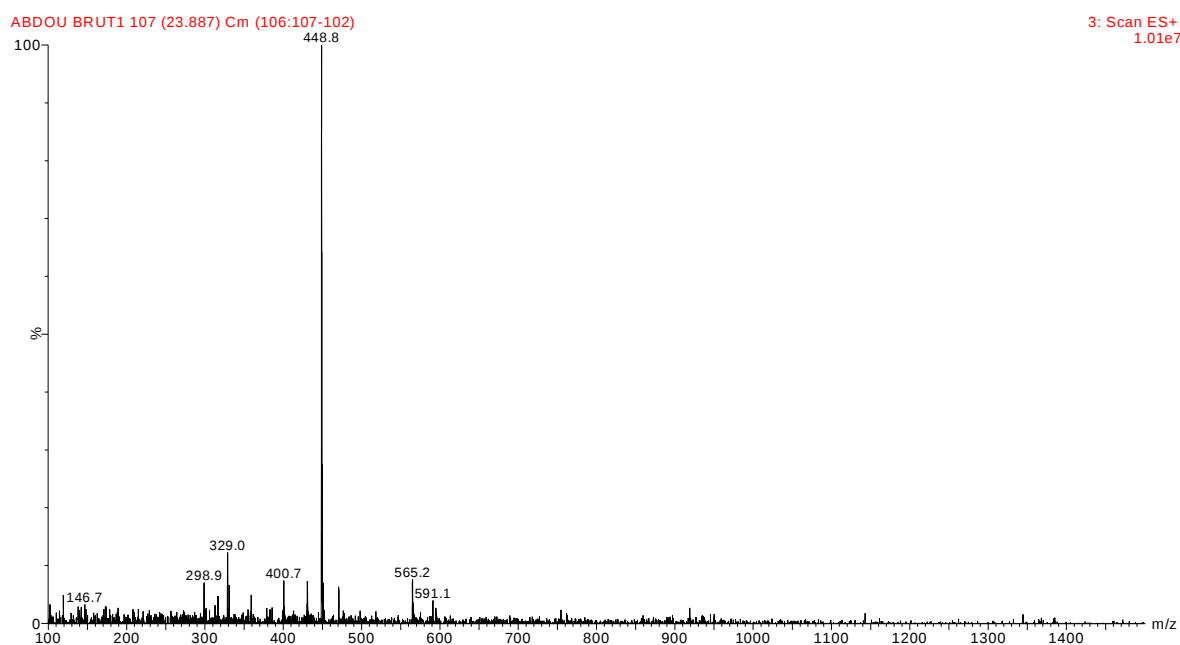


Figure 17: Spectre MS des pics détectés à 23 et 24 min en mode positif (isomères)

Le chromatogramme obtenu par HPLC analytique de la FAEM est représenté par la figure 18.

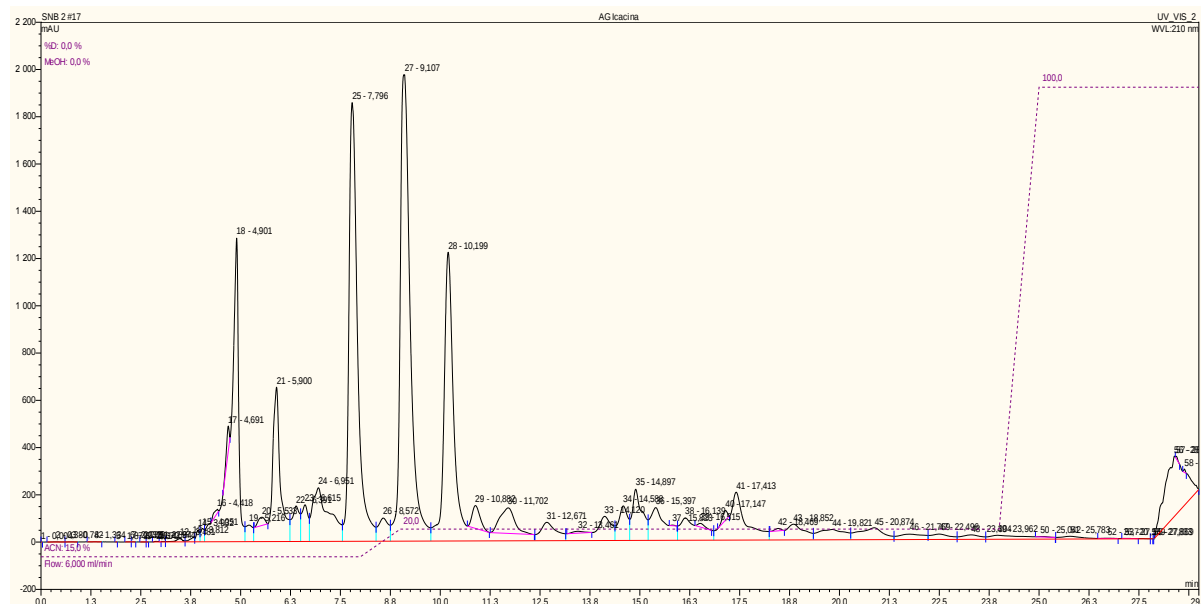


Figure 18 : Chromatogramme HPLC analytique de la FAEM

Nous remarquons cinq pics majoritaires : 18 (temps de rétention 4,90mn), 21 (5,90mn), 25 (7,80mn), 27 (9,11mn) et 28 (10,20 mn) dont les spectres UV sont représentés respectivement par les figures 19, 20, 21, 22 et 23.

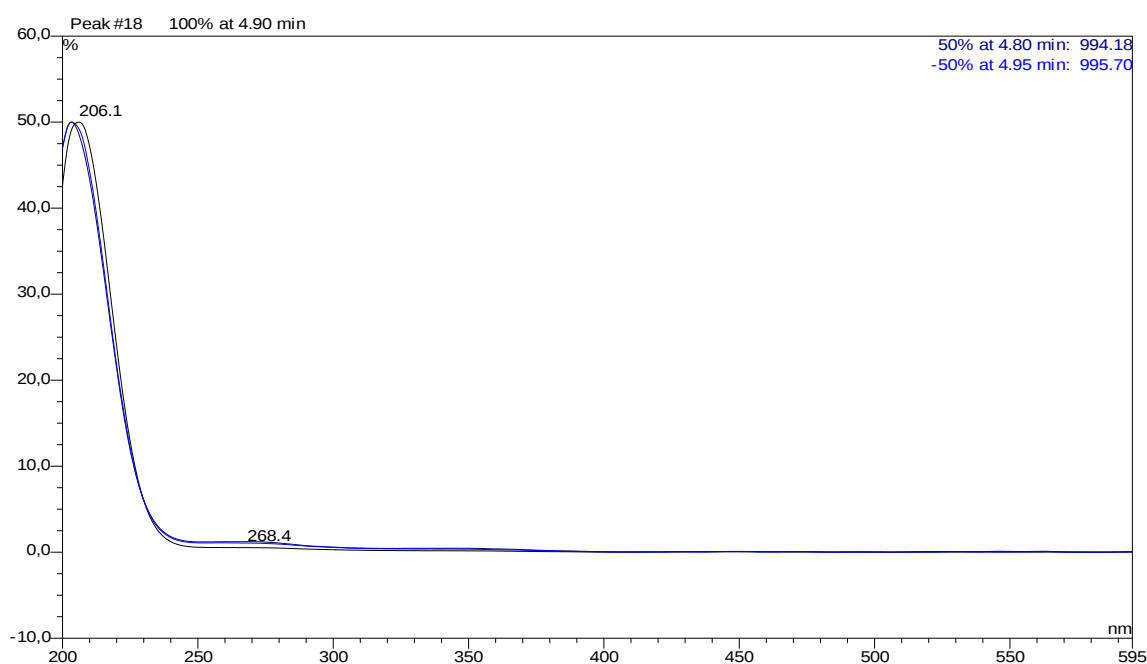


Figure 19 : Spectre UV du pic 18 (temps de rétention 4,90 mn)

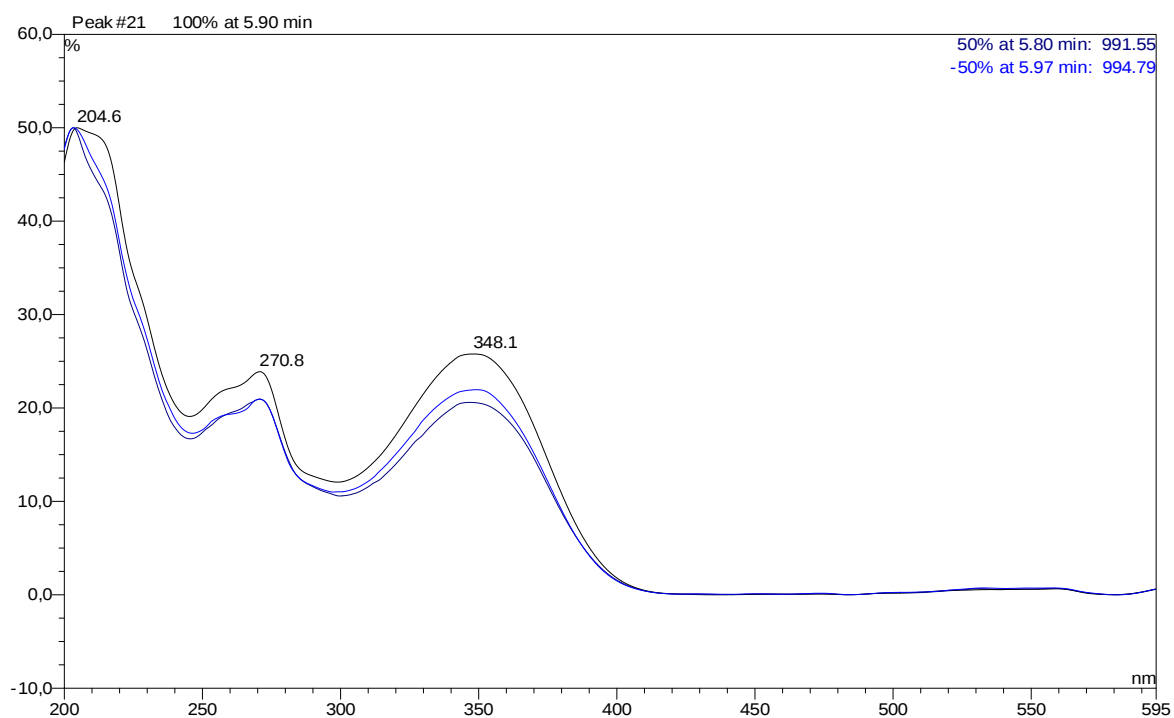


Figure 20 : Spectre UV du pic 21 (temps de rétention 5,90 mn)

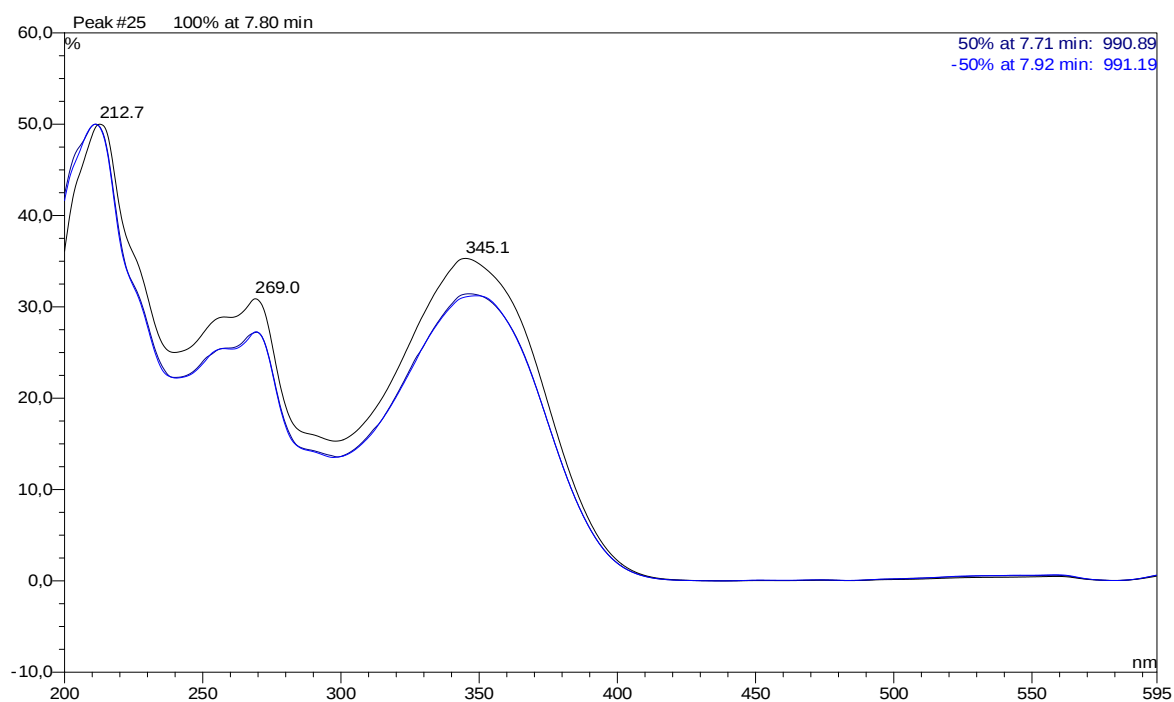


Figure 21 : Spectre UV du pic 25 (temps de rétention 7,80 mn)

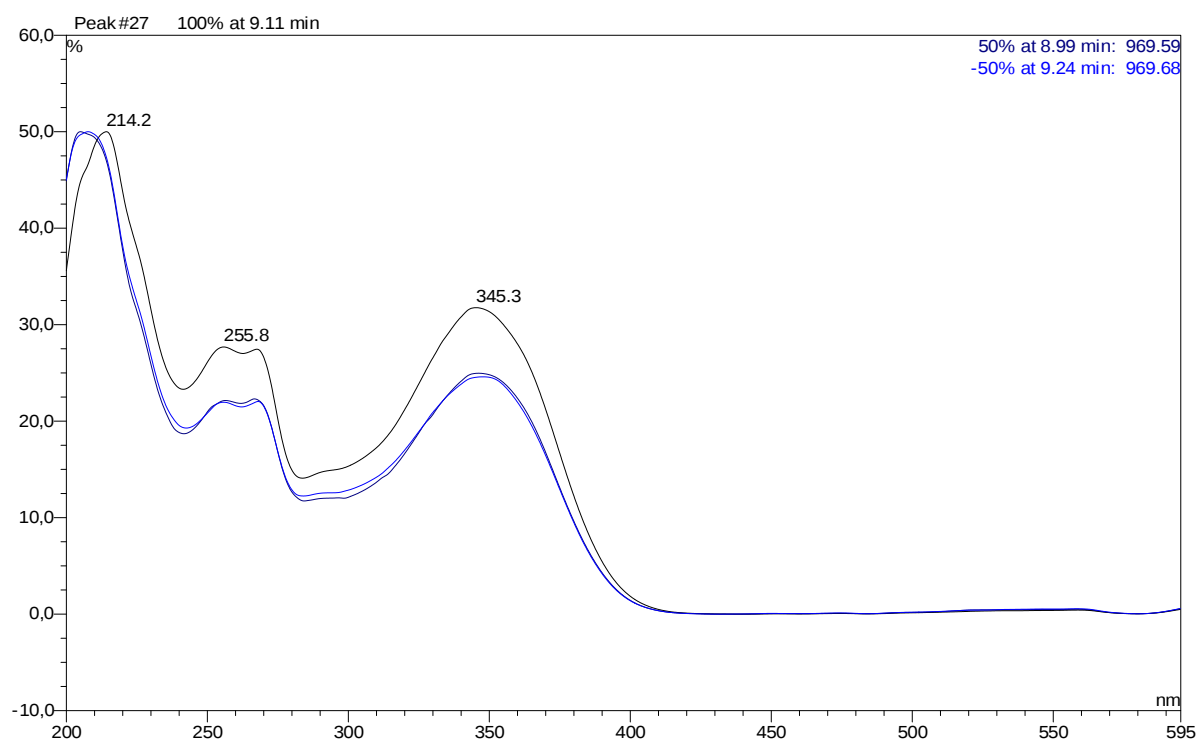


Figure 22: Spectre UV du pic 27 (temps de rétention 9,11mn)

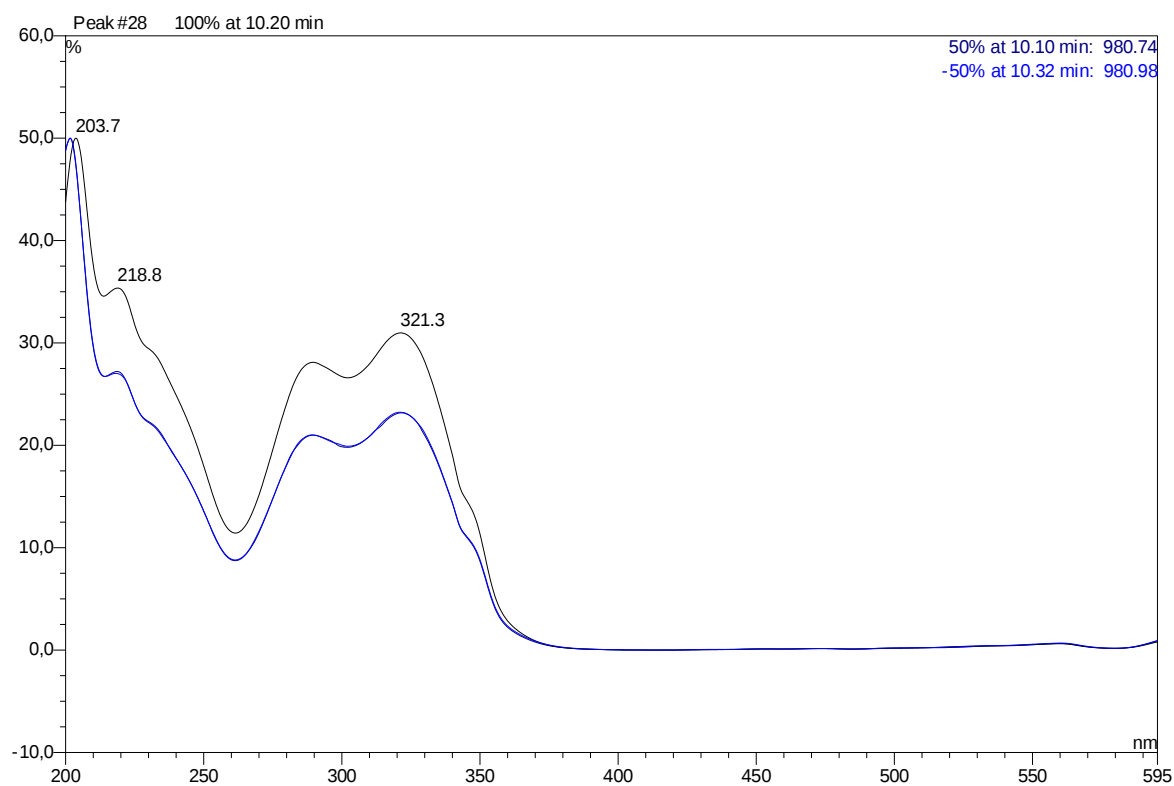


Figure 23: Spectre UV du pic 28 (temps de rétention 10,20 mn)

Remarquons aussi que les spectres des figures 20, 21 et 23 sont similaires et correspondent au comportement en UV des molécules de la famille des flavones. De plus le résultat de la LC/MS sur la FAEM a révélé l'existence d'isomères que nous confirmerons dans nos investigations structurales.

Le chromatogramme obtenu par HPLC semi-préparative de la FAEM est représenté par la figure 24.

En mode préparatif, avec une injection de 100 µl par séquence donc plus concentré qu'en analytique (5 µl par séquence); nous n'avons pas reproduit le même résultat, car le pic 21 de l'HPLC analytique a disparu (figure 22). Ainsi nous observons quatre pics majoritaires (figure 24) qui sont isolés. Il faut simplement noter que les spectres UV des pics à 14, 17, 20 et 21 mn sont respectivement identiques aux pics des figures 19, 26, 28 et 29 observés en analytique.

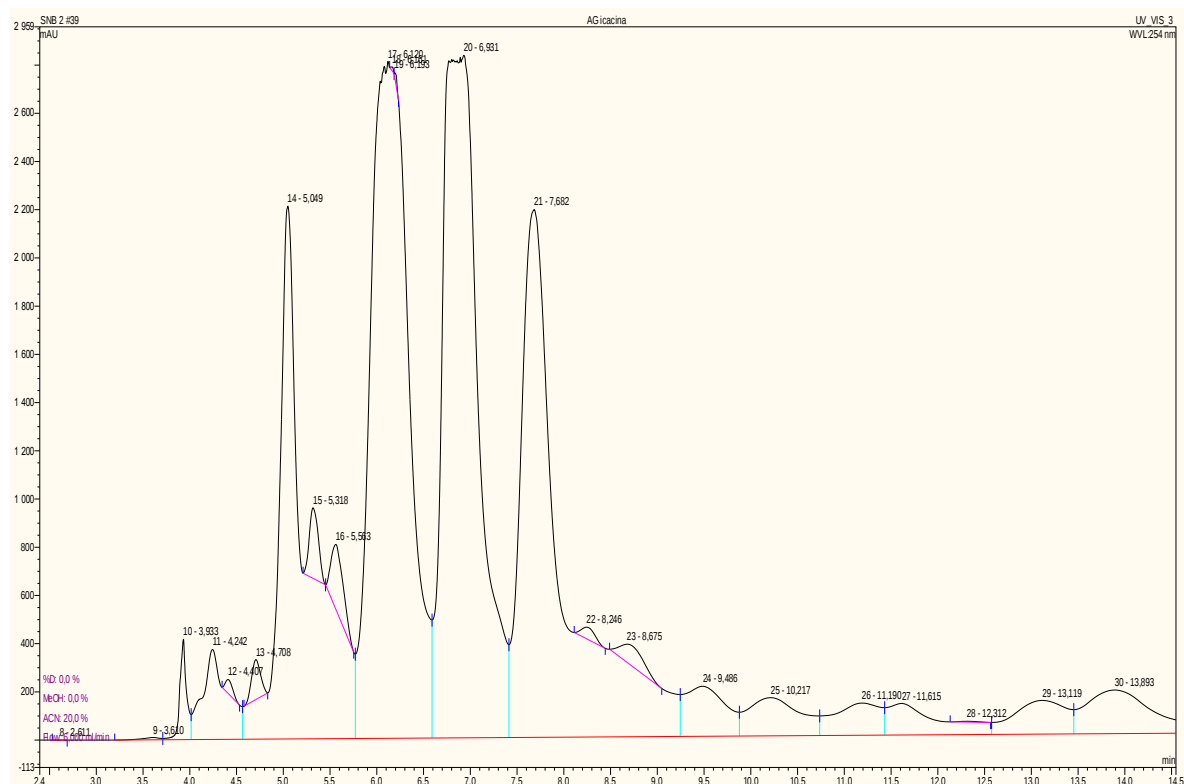


Figure 24 : Chromatogramme HPLC semi préparatif de la FAEM

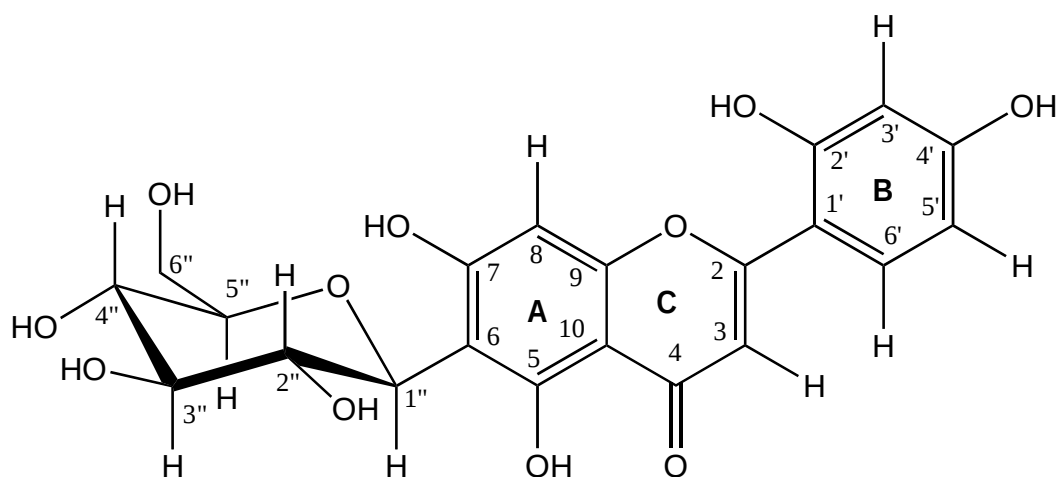
Après purification des pics, nous avons nommé AG1 (pic 14), AG2 (pic 17), AG3 (pic 20) et AG4 (pic 21).

Le résultat des études de résonance magnétique nucléaire (RMN 600 MHz) (sonde TCI Avance III, marque Brüker) du pic 14, a montré qu'il correspond à un mélange complexe inexploitable que nous n'avons pas pu caractériser. Cependant les autres pics ont été caractérisés. Nous présentons ici la procédure adoptée pour caractériser et identifier ces trois molécules AG2, AG3 et AG4.

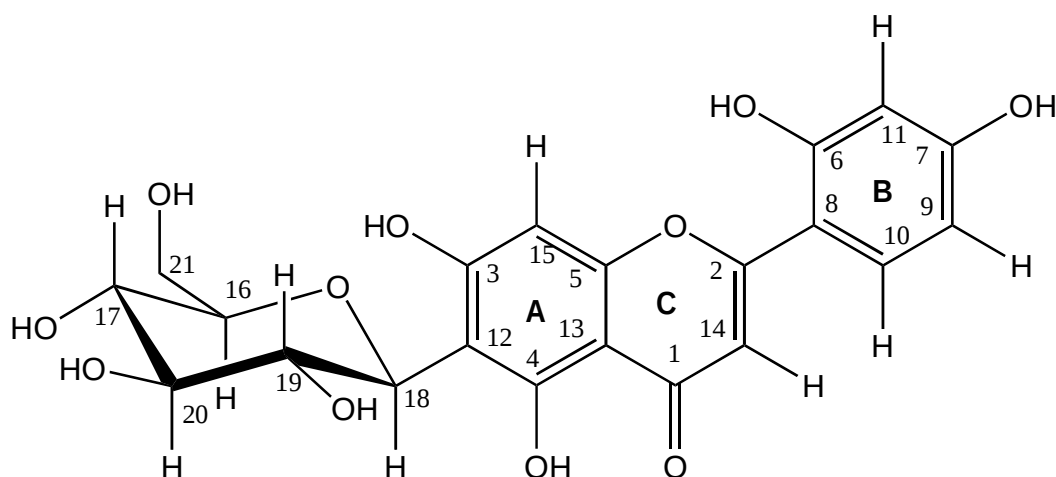
I.2.2.1. Attribution des résonances du produit AG2

Ce travail commence par la numérotation des résonances des δ du carbone 13 (figure 25), par ordre décroissant sur le spectre "J-modulé" (C_1 pour celui résonant à 182,33 ppm, C_{21} pour celui à 61,95 ppm). Sur le spectre du DEPT 135 (figure 27), les CH_2 apparaissent négatifs, les CH et CH_3 en positif. Le signal à 40,45 ppm correspond au solvant (DMSO- d_6). Cette numérotation sera reportée sur l'ensemble des projections 1D (pour 1H , DEPT 135, ^{13}C) et 2D des spectres HSQC (figures 28, 29) (couplages 1J) et HMBC (figures 33-37) (couplages nJ , $n>1$) et COSY (figures 30 -32).

La formule du schéma 1 montre la structure chimique de flavonoïde de la famille de Morin (Pongsak et Phumkhachorn, 2007) non hydraté C-glycosylé en position 6 (numéro réglementaire suivant UIPAC). Le Morin est un composé de la famille des flavanols. C'est une substance de couleur jaune qui a été isolée à partir du *Maclura pomifera*, *Maclura tinctoria* et de feuille de *psidium guajava*. Nous présentons deux numérotations, la première est l'officielle et la deuxième sera utilisée durant toute la procédure de caractérisation basée sur la numérotation du spectre ^{13}C .



1: Numérotation conventionnelle (IUPAC)



2: Numérotation non conventionnelle

Schéma 1 : 2',4',5, 7-tétrahydroxyflavone ; 6-C- β -D ou l-C-Glycopyranoside
(Pongsak et Phumkhachorn, 2007)

Il y a plusieurs stratégies pour arriver à l'attribution complète : les étapes détaillées ci-dessous en proposent une.

Le tableau VI a été réalisé en exploitant les spectres du proton ^1H (figure 25), carbone ^{13}C (figure 26), du DEPT 135 (figure 27), et la corrélation HSQC (figures 28 et 29).

**Tableau VI : Attribution de numéro des atomes de carbones et d'hydrogènes de
AG2. (DMSO-d₆)**

Carbone N°	δ ppm ¹³ C	Type	δ ppm ¹ H	Constantes de couplages ⁿ J	H portés par l'oxygène
1	182,33	C			OH, 13,57ppm
2	164,09	C			OH, 10,62ppm
3	163,70	C			OH, 9,95ppm
4	161,18	C			OH, 9,44ppm
5	156,64	C			
6	150,15	C			
7	146,20	C			
8	121,87	C			
9	119,43	CH	7.40	dd, J= 8,16 et 1,87Hz,	
10	116,50	CH	6.92	d, J=8,16Hz	
11	113,75	CH	7,39	d, J=1,86Hz	
12	109,32	C			
13	103,86	C			
14	103,25	CH	6,57	s	
15	93,93	CH	6,45	s	
16	82,06	CH	3,44	m	
17	79,40	CH	3,46-3,50	m	

Suite tableau VI

Carbone N°	δ ppm ^{13}C	Type	δ ppm ^1H	Constantes de couplages ^nJ	H portés par l'oxygène
18	73,48	CH	4,88	d, J=9,90Hz	
19	71,07	CH	4,22	m	
20	70,62	CH	3,46-3,50	m	
21	61,95	CH ₂	3,75; 3,77	m	

Les spectres du proton ^1H et du carbone ^{13}C de la molécule AG2 sont représentés respectivement dans les figures 25 et 26.

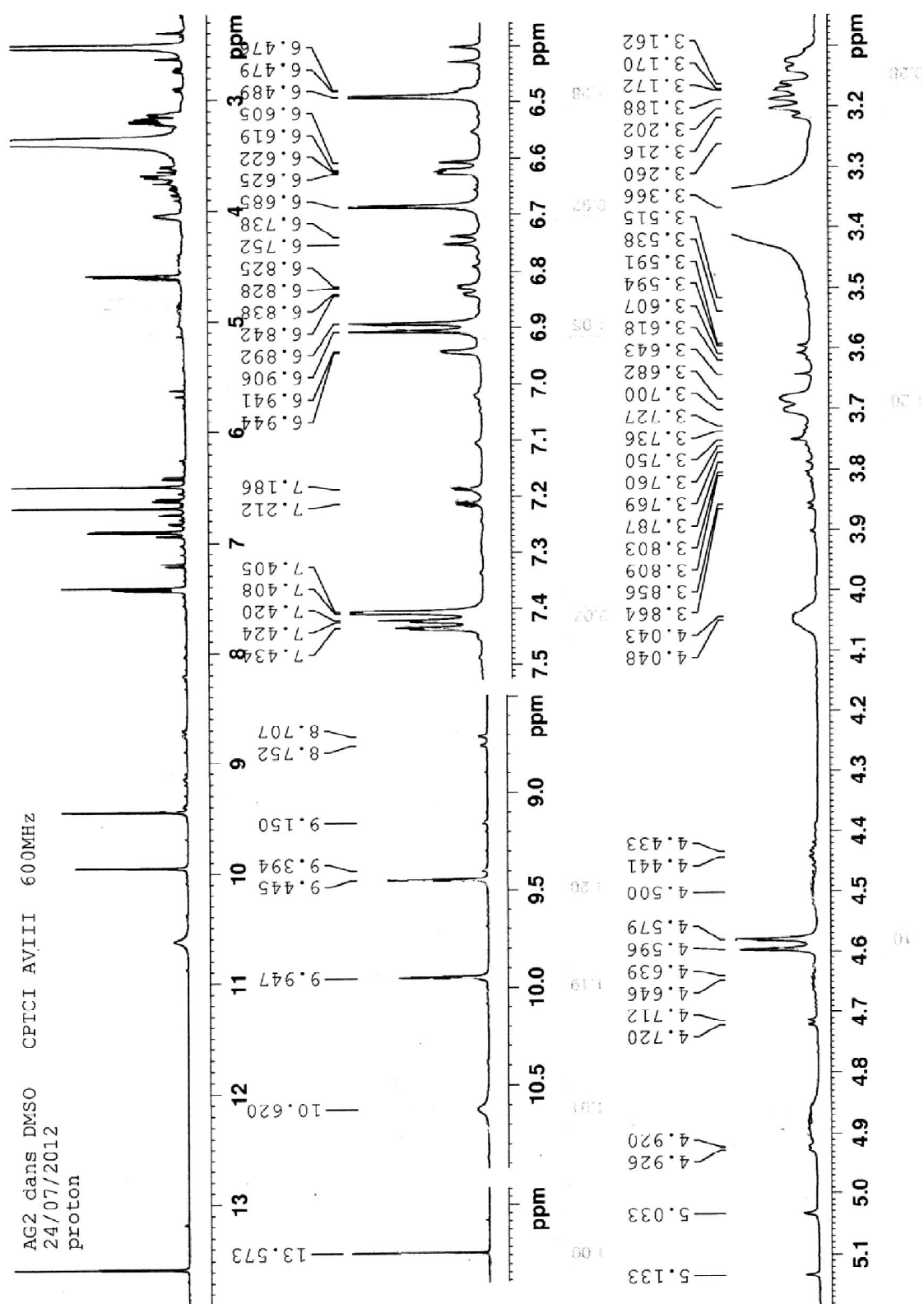


Figure 25 : Spectre ^1H de la molécule AG2

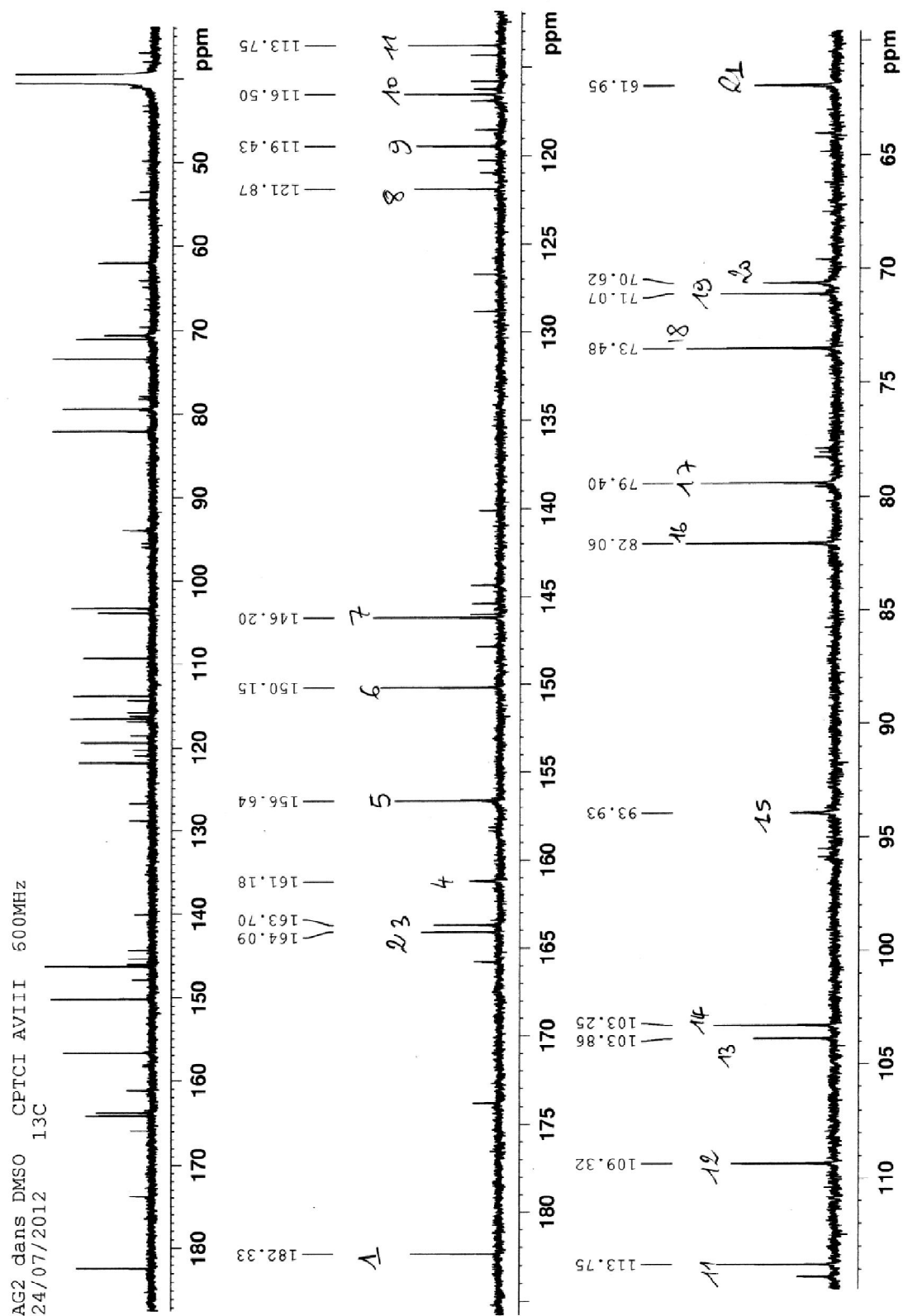


Figure 26 : Spectre ¹³C de la molécule AG2

Le spectre DEPT 135 de ^{13}C de la molécule AG2 est représenté sur la figure 27 et les spectres HSQC de AG2 sont représentés dans les figures 28 et 29.

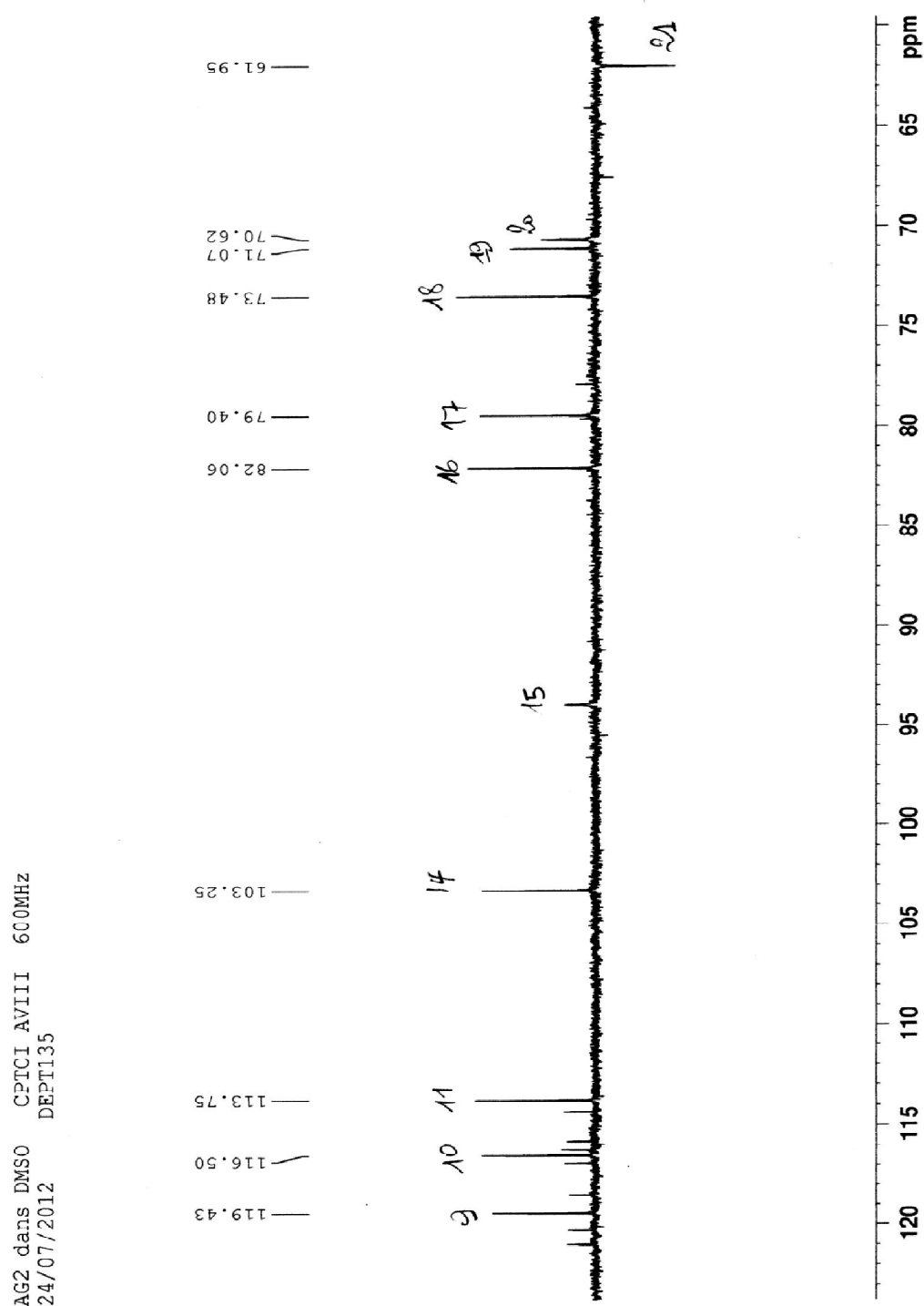


Figure 27 : Spectre de ^{13}C DEPT 135 de la molécule AG2.

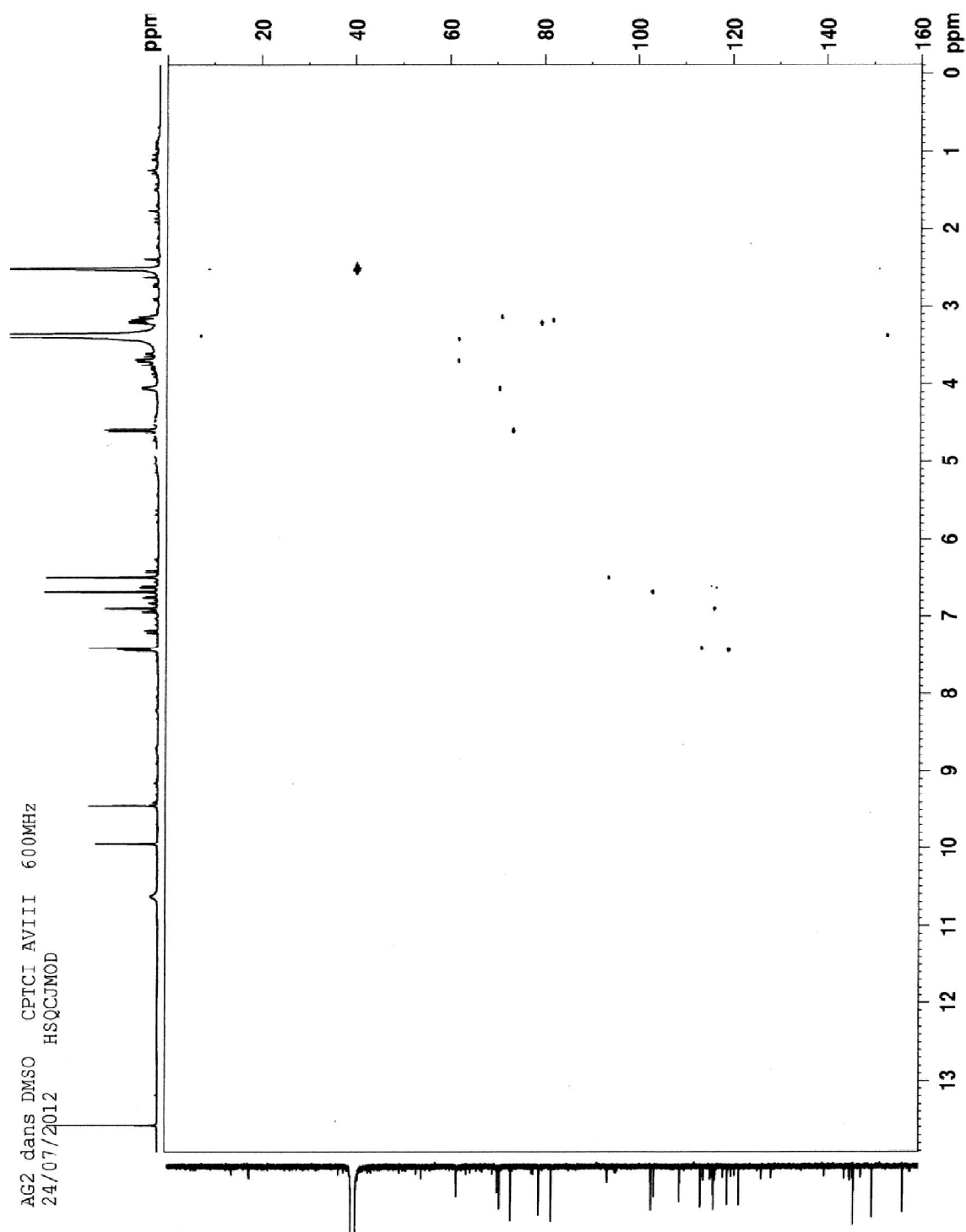


Figure 28 : Spectre HSQC de AG2.

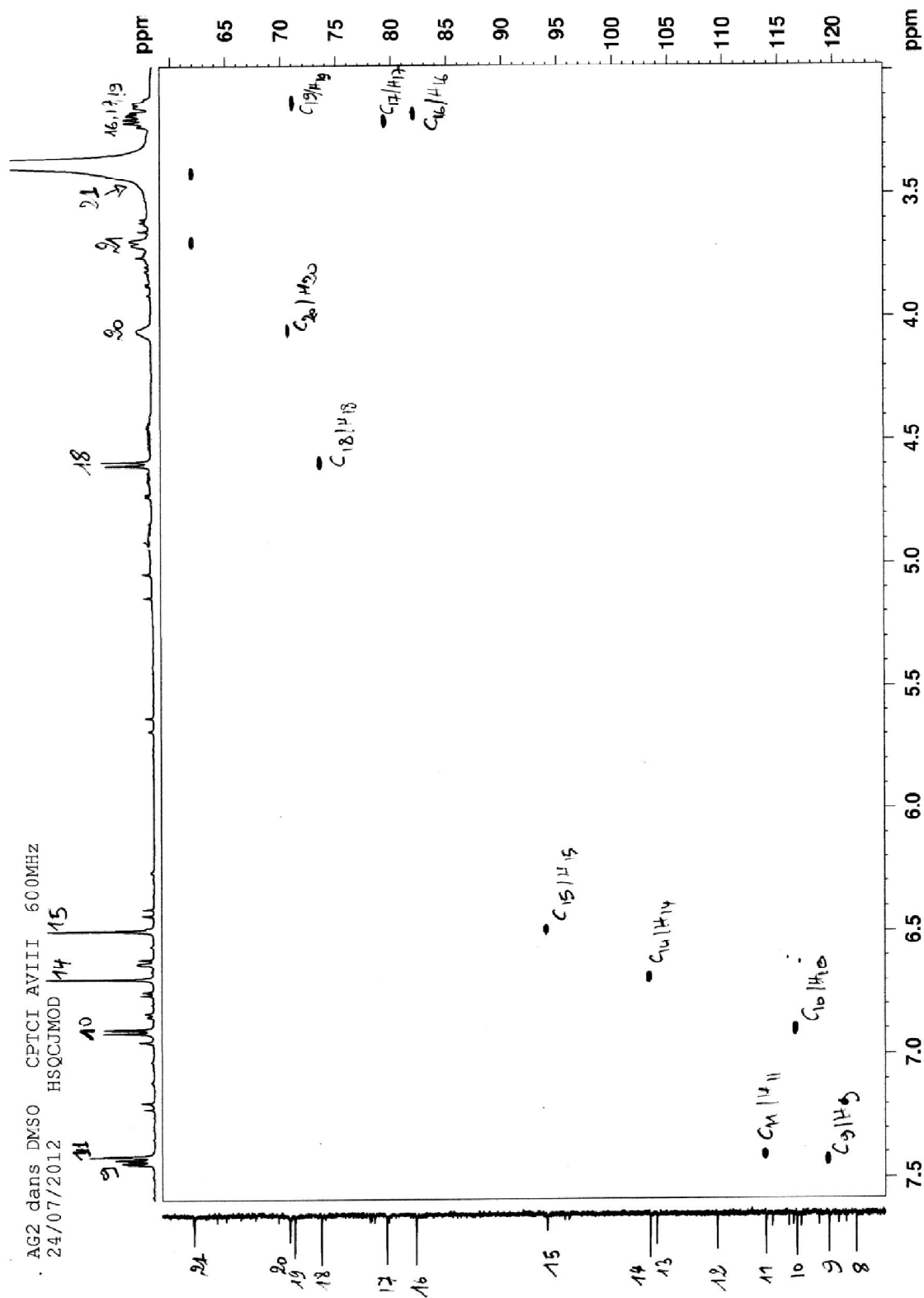


Figure 29 : Spectre HSQC de AG2 agrandissement.

Dans le spectre DEPT 135 du ^{13}C (figure 27), c'est uniquement les CH_2 qui apparaissent négatifs, les CH et CH_3 en positif. Grâce à cette opération, les carbones quaternaires sont identifiés dans le spectre ^{13}C par soustraction.

Le spectre HSQC de AG2 (figure 28) permet d'affecter les atomes de carbones primaires, secondaires, et tertiaires à leur hydrogène sur le spectre ^1H . Ce spectre étant difficile à exploiter, alors un agrandissement est nécessaire (Figure 29). En effet, l'agrandissement du spectre HSQC de AG2 nous a permis d'affecter chaque carbone à son hydrogène via un $^1J_{\text{H-C}}$.

L'analyse du spectre COSY ^1H - ^1H (figure 30, 31, et 32) de AG2 a permis de faire une corrélation entre les atomes d'hydrogène. Ces corrélations sont représentées dans le tableau VII.

Tableau VII : Corrélation entre les atomes d'hydrogène du spectre COSY ^1H - ^1H (Figures 30, 31, et 32) de AG2.

Le symbole X signifie que ses deux protons sont couplés entre eux via des couplages de type ^1J , ^2J , ^3J et ^4J .

H/H	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1																					
2																					
3																					
4																					
5																					
6																					
7																					
8																					
9										X	X										
10									X												
11									X												
12																					
13																					
14																					
15																					
16																	X				X
17																X				X	
18																			X		
19																		X		X	
20																	X		X		
21																X					X

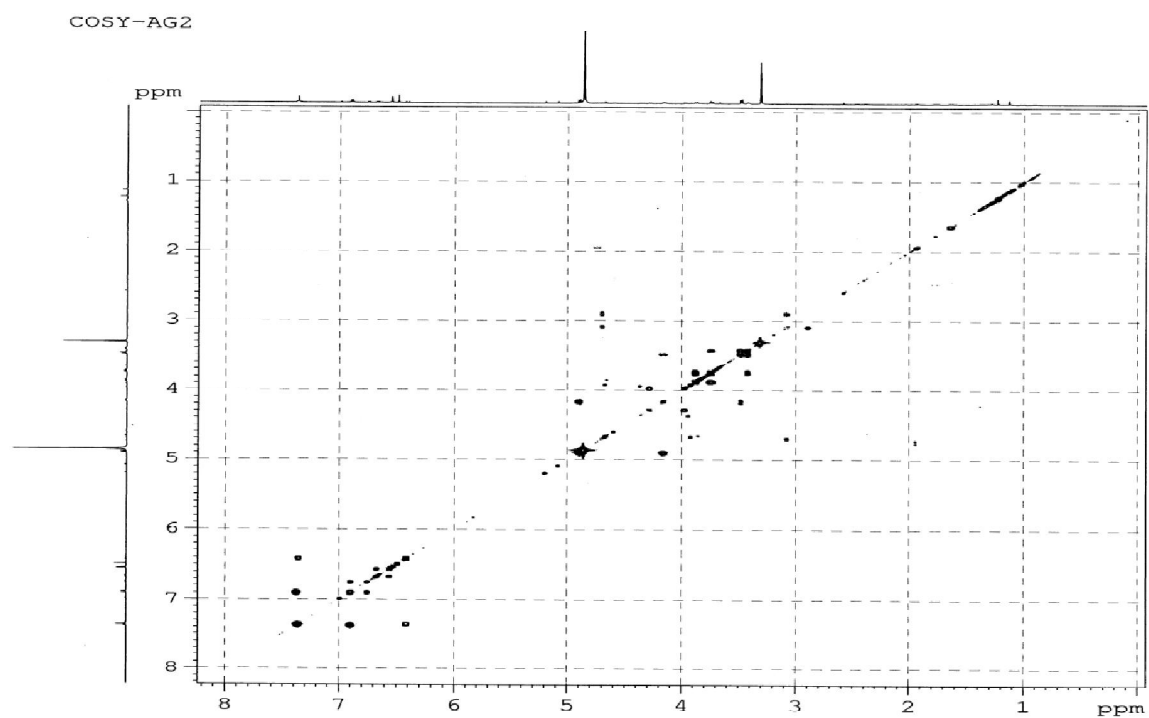


Figure 30 : Spectre COSY ^1H - ^1H de AG2

Le spectre de la figure 30 étant difficilement exploitable, nous avons réalisé deux agrandissements : la zone aromatique (figure 31) et la zone osidique (figure 32).

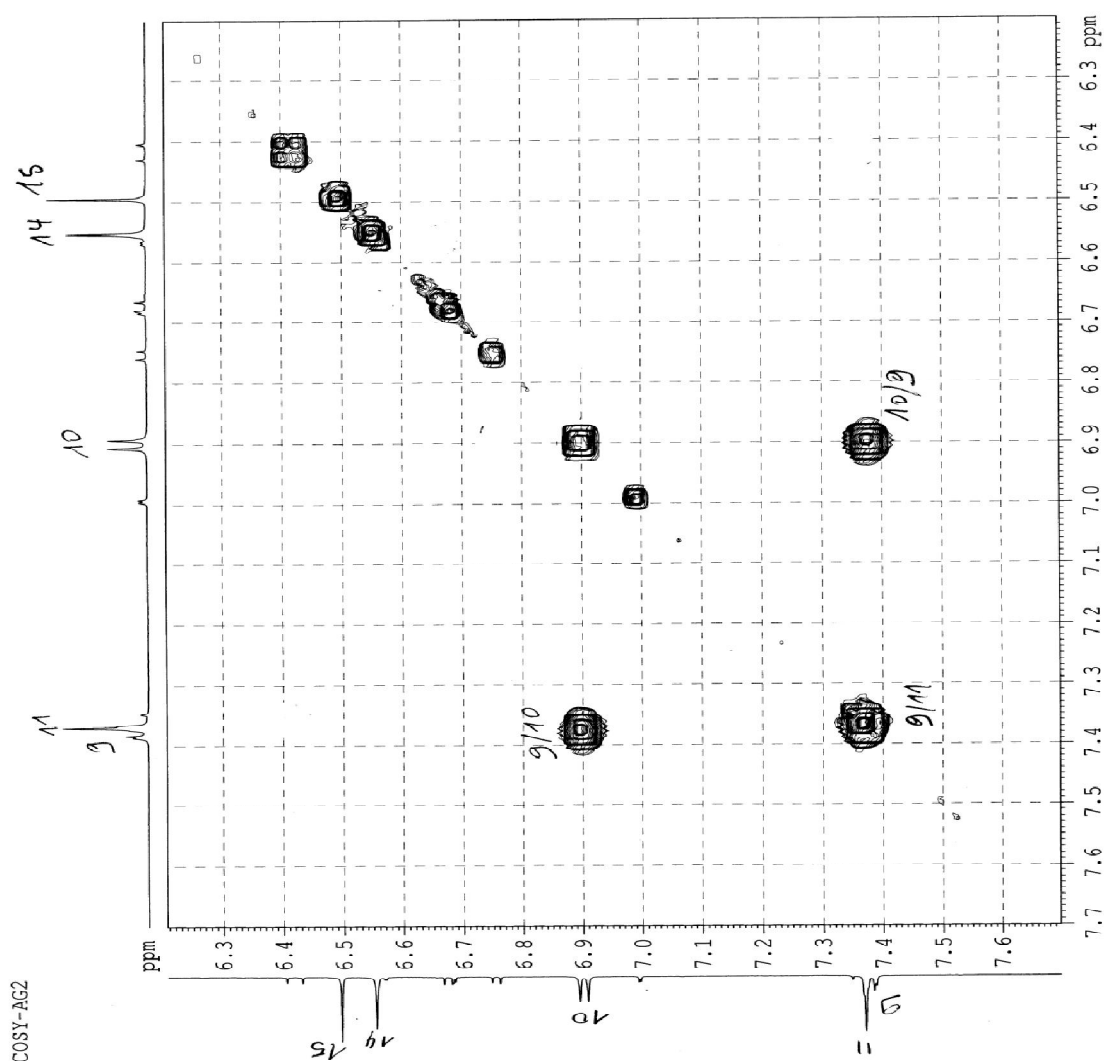


Figure 31 : Spectre du COSY ^1H - ^1H avec agrandissement de la zone aromatique de AG2

Le couplage entre deux atomes d'hydrogène (protons) est matérialisé par une tâche hors diagonale située à l'intersection des deux déplacements chimiques des deux protons. Cette tâche de corrélation est symétrique par rapport à la diagonale. On observe une corrélation entre les hydrogènes H-9/H-11 et H-9/H-10. Quand aux hydrogènes H-14 et H-15 il ne couple pas et apparaissent comme des singulets. Ainsi on peut dire que les hydrogènes H-9, H-10 et H-11 appartiennent soit au même noyau aromatique, soit à deux noyaux différents.

COSY-AG2

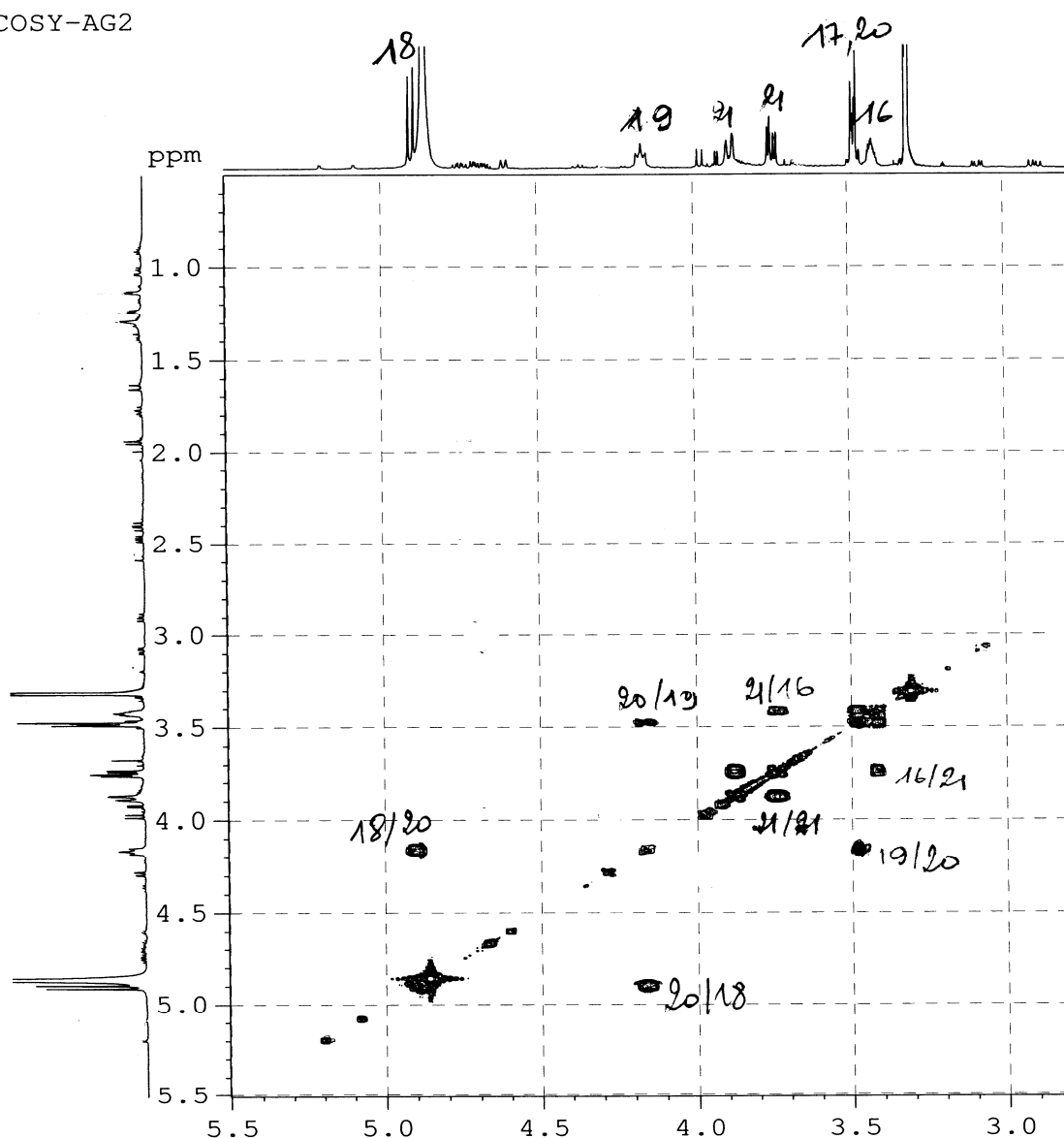


Figure 32 : Spectre COSY ^1H - ^1H de la partie osidique de AG2.

On observe les corrélations des protons H-18 /H-19, H-19/H-20, H-20/H-17, H-17/H-16 et H-16/H-21 (figure 32).

Dans le tableau VIII de corrélations HMBC (figures 33, 34, 35, 36 et 37), les coordonnées de chaque pic observé dans la trace de concours sont un proton et ^{13}C séparé de 2 ou 3 liaisons voir plus. Cela est extrêmement utile pour faire des affectations et de la cartographie à la structure covalente.

Tableau VIII: Tableau de corrélations HMBC entre des atomes de carbones et d'hydrogènes

Les chiffres correspondent au nombre de liaisons qui séparent le carbone et l'hydrogène.

C/H	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	OH	OH	OH	
1														2	4							4			
2									4	3	4			2											
3															2			3				4			
4														4				3				2			
5															2										
6									4	3	2												2		4
7									2	3	2												4		2
8														3											
9											3														
10																							4		
11									3															3	

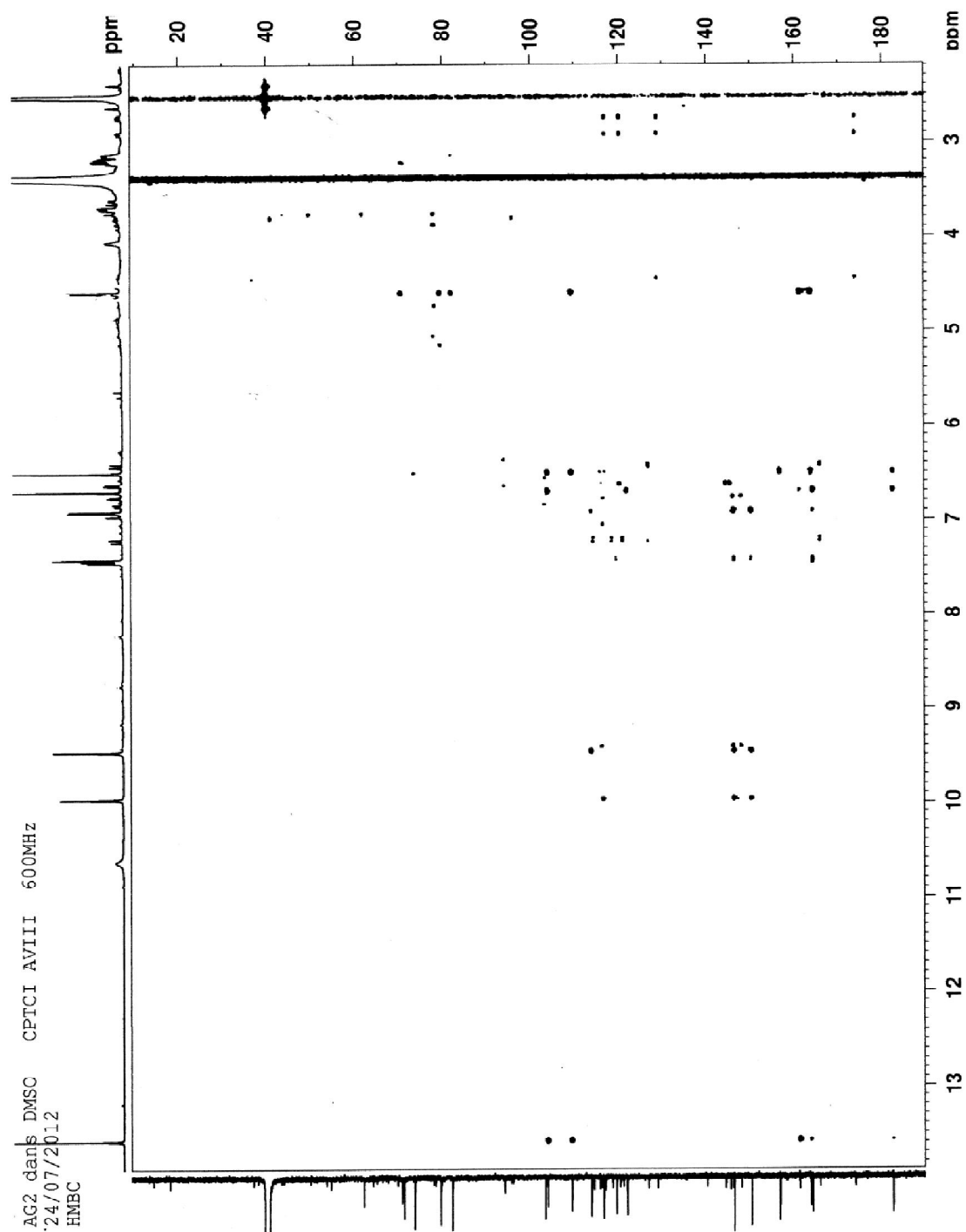


Figure 33 : Spectre HMBC de AG2

En raison du nombre important de pics observés avec le spectre HMBC de AG2 (figure 32), l'analyse nécessite plusieurs parties élargies. Dans ce cas, le spectre a été divisé en quatre sections, (voir figures 34,35, 36 et 37).

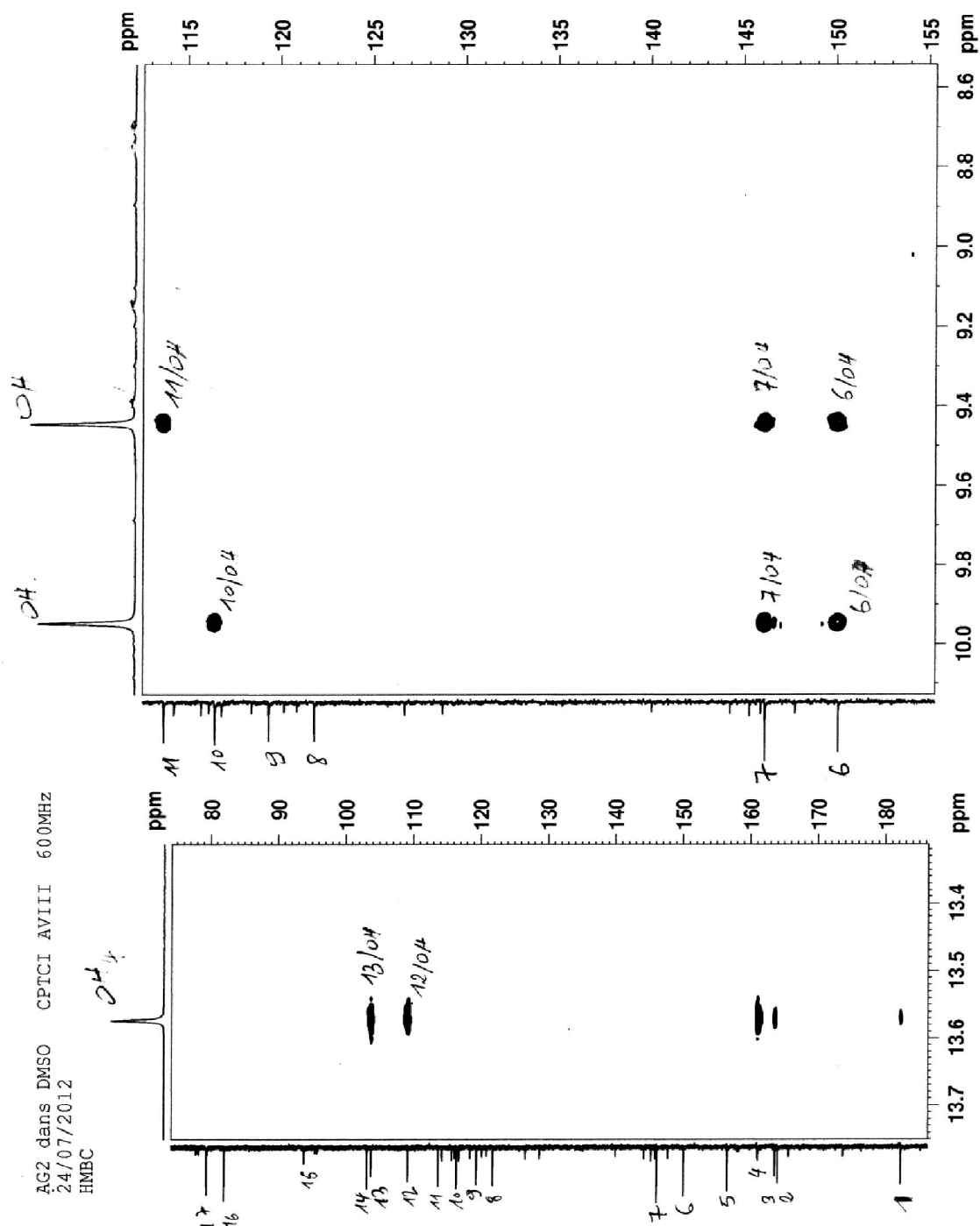


Figure 34 : Spectre HMBC de AG2 avec agrandissement de la zone des phénols.

Ce spectre montre des corrélations d'hydroxy aromatique OH (13,57 ppm) à des carbones aromatiques C-1, C-3, C-4, C-12, et C-13. De même les corrélations de OH (9,95 ppm) à C-6, C-7, C-10 et de OH (9,44ppm) à C-6, C-7, C-11 sont observées.

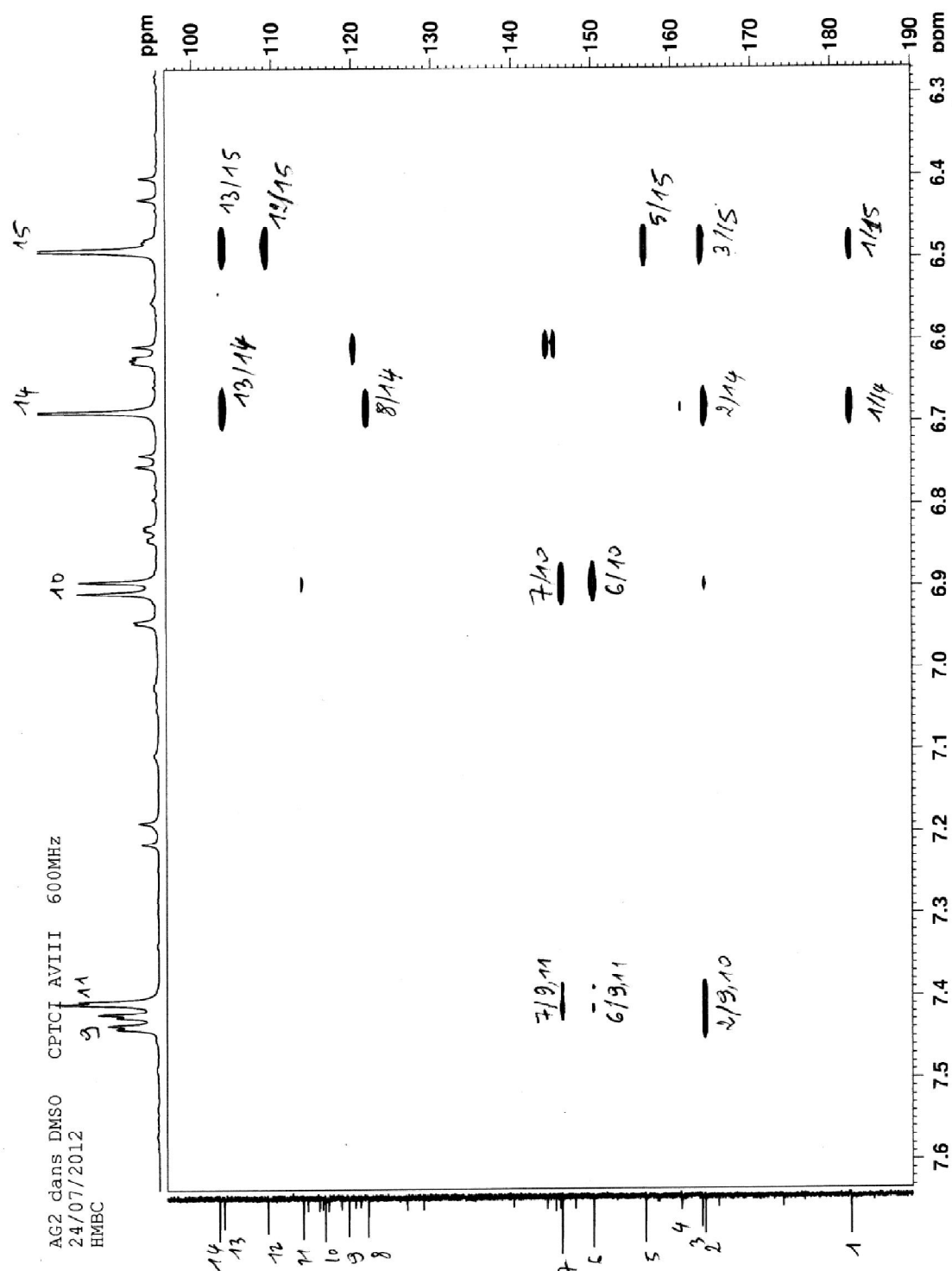


Figure 35 : Spectre HMBC de AG2 avec agrandissement de la zone des protons aromatiques

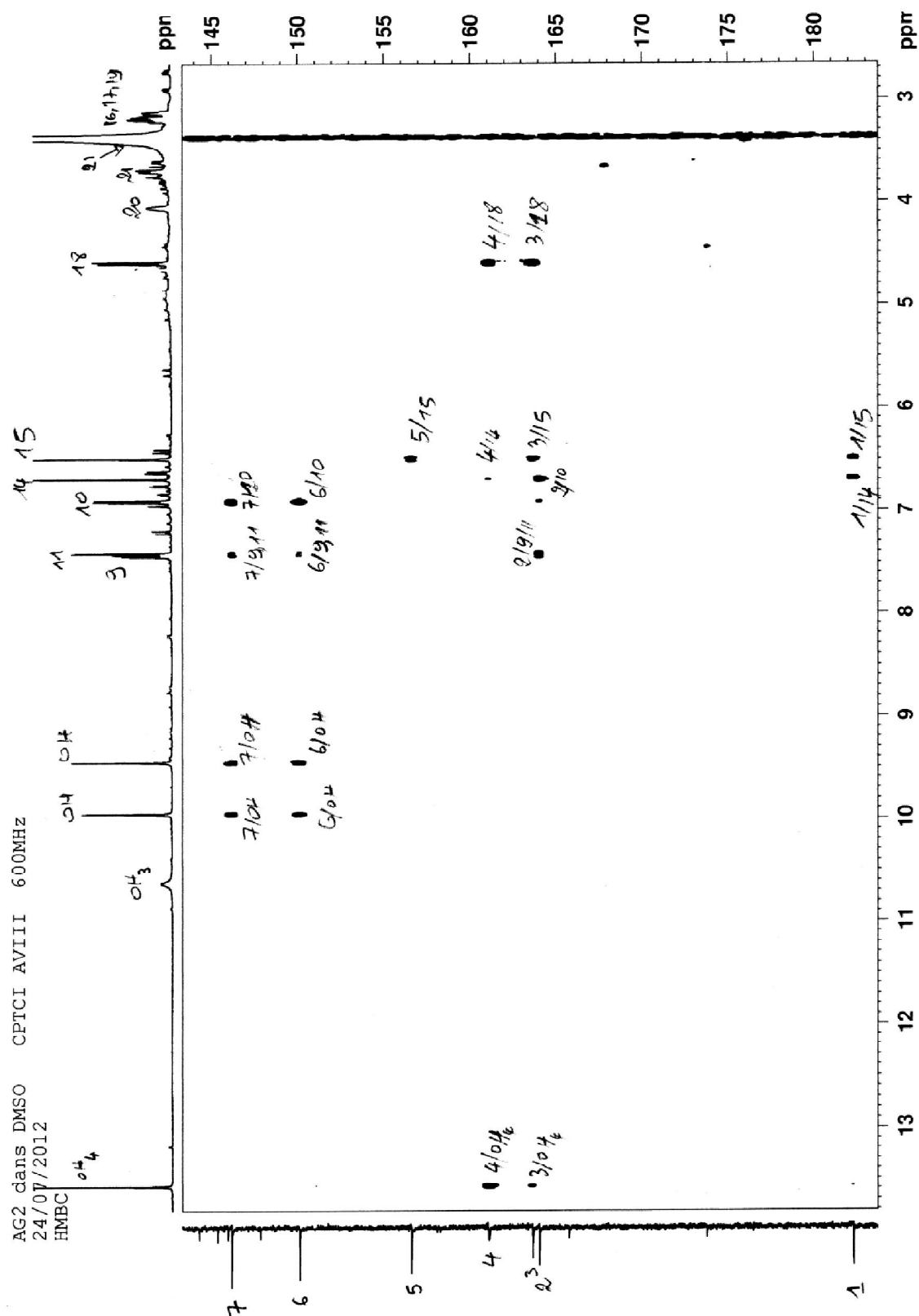


Figure 36 : Spectre HMBC de AG2 avec agrandissement de la zone des carbones quaternaires sp².

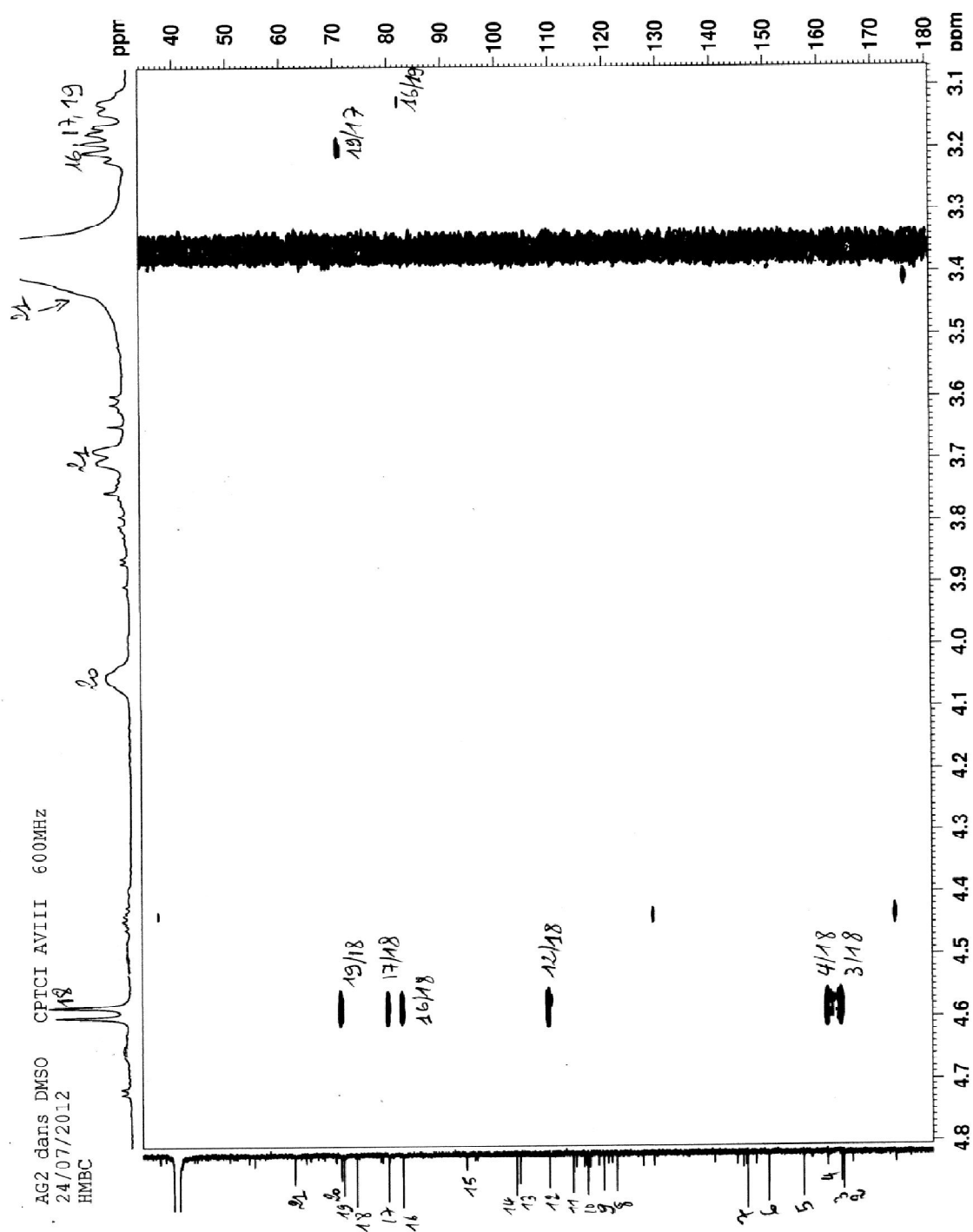


Figure 37 : Spectre HMBC de AG2 avec agrandissement de la zone osidique.

Nous avons réalisé un spectre de masse en électrospray (ESI) mode positif de la molécule AG2 de formule brute $C_{21}H_{20}O_{11}$ et de masse molaire moléculaire 448 daltons. Ainsi sur le spectre de masse on observe le pic à m/z 471 =

$[M+Na]^+$ correspondant à la masse molaire moléculaire cationisée par un Na (figure 38).

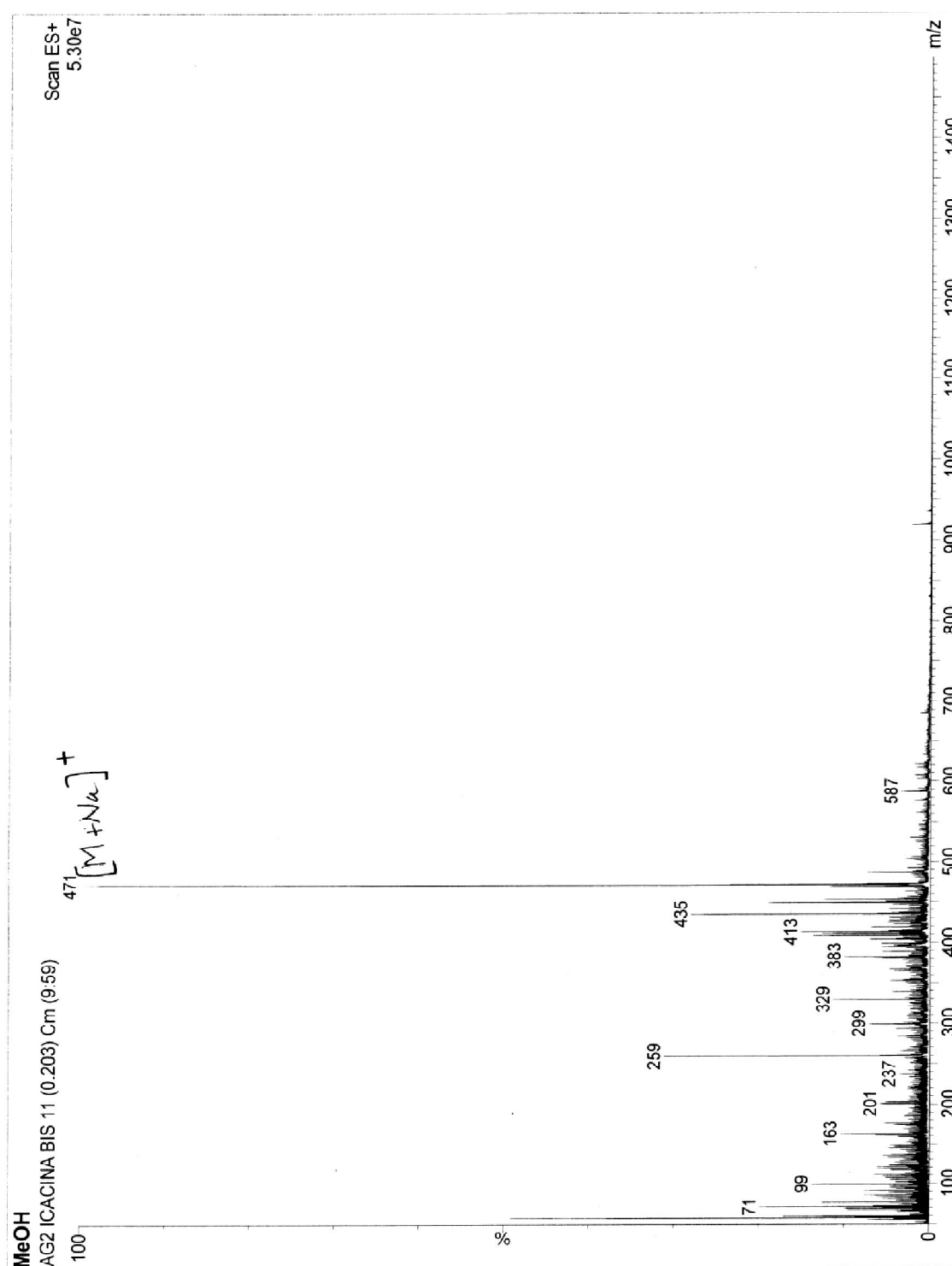


Figure 38 : Spectre de masse de la molécule 1 (AG2)

Le spectre Infra Rouge (IR) de cette molécule est représenté dans la figure 39.

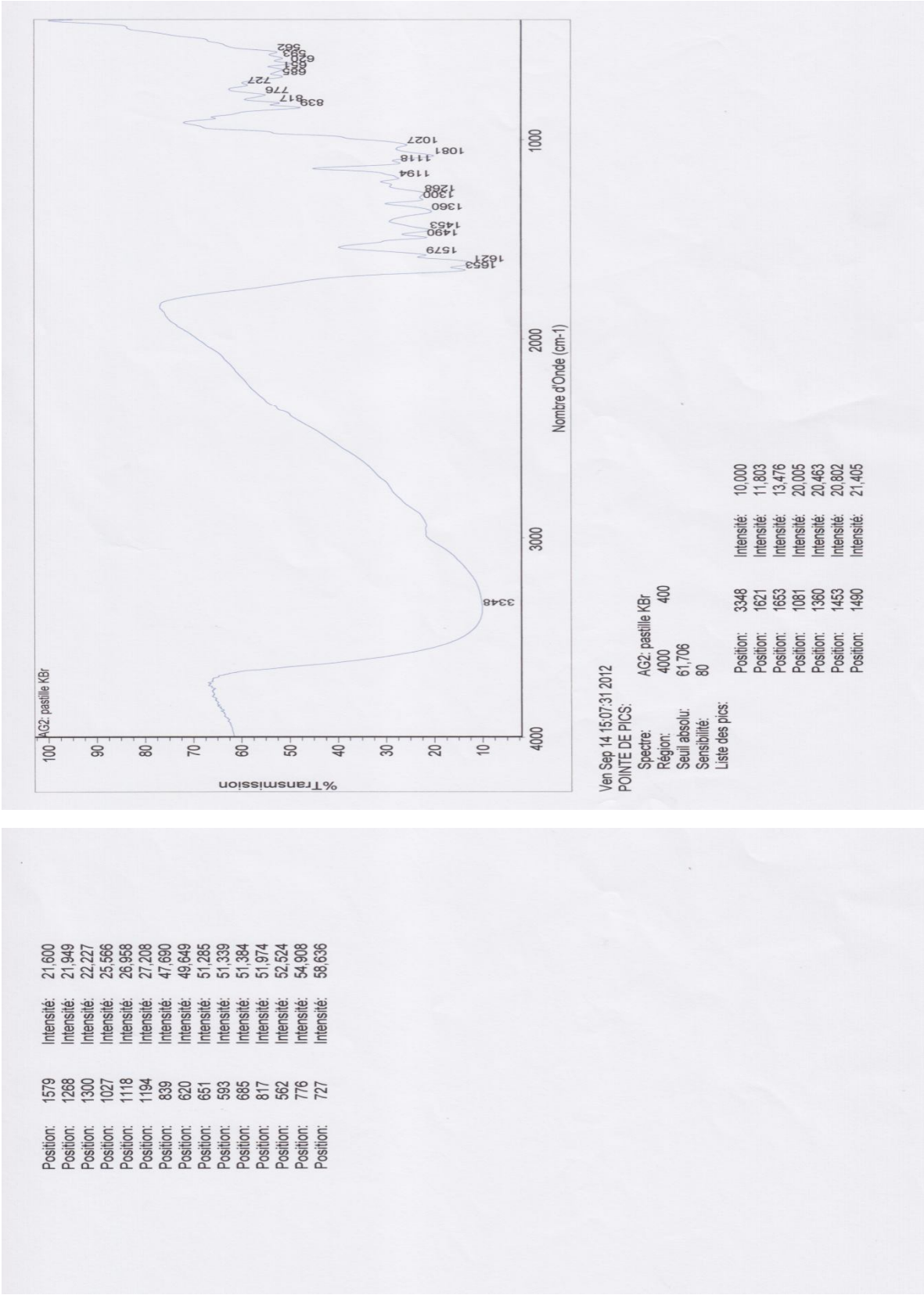


Figure 39 : Spectre Infra Rouge de AG2 dans KBr

I.2.2.2. Interprétation des spectres de AG2

➤ Attribution des noyaux aromatiques

- Sur le spectre de COSY ^1H - ^1H (figure 31), on repère les trois groupes de protons dont ceux du cycle **B** ortho-para-trisubstitué (3 protons), et les deux protons singulets appartiennent à deux cycles différents **A** (1 proton) et **C** (1proton). Ceci se confirme sur le spectre HMBC (figure 35), car on observe deux corrélations entre le carbone C-12/H-15 et C-13 /H-15 via 3 liaisons, ce qui signifie que ces deux carbones et l'hydrogène H-15 appartiennent au même cycle. Cependant la corrélation de C-13/H-14 observée et la corrélation C-12 / H-14 non observée permet de conclure que les protons H-14 et H-15 ne sont pas dans le même cycle.
- Sur le spectre de HSQC (figure 29), sont attribués les 5 carbones CH correspondants dans la région aromatique (100 – 160 ppm). Il faut noter une particularité du déplacement chimique des carbones CH de la position 14 et 15 des flavonoïdes qui varie entre 92 à 99 ppm.
- Sur le spectre HMBC (figures 34, 35 et 36) correspondant à la région aromatique, les carbones quaternaires sont attribués. On se base en particulier sur les corrélations suivantes (voir le tableau XIII pour plus de détail):
 - o C1 (en particulier le plus déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène dans un état d'hybridation sp^2): C-1/H-14 (2 liaisons), C-1/H-15 (4 liaisons).
 - o C2- (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène) : C-2/H-14 (2 liaisons), C-2/H-11 (4 liaisons), C-2/H-9 (4 liaisons) et C-2/H-10 (3 liaisons)
 - o C-3 (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène) : C3/H15 (2 liaisons), C-3 /OH (à 13.57ppm, 4 liaisons)
 - o C-4 (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène) : C-4 / OH (13.57ppm, 2 liaisons), C-4/H-14 (4 liaisons).

- o C-5 (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène) : C-5/H-15 (2 liaisons)
- o C-6 (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène) : C-6/H-9 (4 liaisons), C-6/H-10 (3 liaisons), C-6/H-11 (2 liaisons) et C6/OH (9,95 et 9,44ppm, 2 et 4 liaisons).
- o C-7 (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène) : C-7/H-9 (2 liaisons), C-7/H-10 (3 liaisons), C-7/H-11 (2 liaisons), et C-7/OH (2 et 4 liaisons) à 9,95 et 9,44 ppm.
- o C-8: C-8/H-14 (3 liaisons), C-8/H-10 (2 liaisons), C-8/H-11 (3 liaisons), C-8/H-9 (3liaisons) (Résultat observé dans HMBC réalisé dans le MeOD).
- o C-9 : C-9/H-11 (3 liaisons), C-9/H-10 non observée
- o C-10 : C-10/H-10 (1 liaison), C-10/H-9 et C-10/H-11 non observées
- o C-11 : C-11/H-9 (3 liaisons), C11/H11 (1 liaison), C-11/H-10 non observée
- o C-12 : C-12/H-15 (3 liaisons)
- o C-13: C-13/H-14 (3 liaisons) et C13/H15 (3 liaisons)

Il faut remarquer que nous avons réalisé la RMN dans le méthanol MeOD en premier cependant on n'observe pas de corrélation des carbones quaternaires avec les protons des phénols. Ce constat est normal car ses protons ont été échangés dans le méthanol de référence. Ainsi, nous avons refait l'expérience dans le DMSO_{d6}, qui n'échange pas les groupements hydroxyles. Cette corrélation HMBC entre les phénols et les carbones quaternaire a été la clé pour trancher sur la position du sucre sur le noyau B des flavonoïdes AG2 et AG3.

➤ Attribution de la jonction du cycle A avec le sucre

- o On utilise les trois corrélations C-3/H-18, C-4/H-18 et C-12-H-18 sur le spectre HMBC (figure 35). D'après les spectres ¹H et HSQC

figure (25 et 29), H-18 est le proton anomérique du glucose (doublet déblindé à 4,9 ppm).

➤ **Attribution de la Jonction bicycle A et C**

- o On utilise les deux corrélations C-1/H-15 (4 liaisons), et C-4/H-14 (4 liaisons).

➤ **Attribution de la Jonction noyau système chromone (cycle A-C) avec le noyau aromatique B**

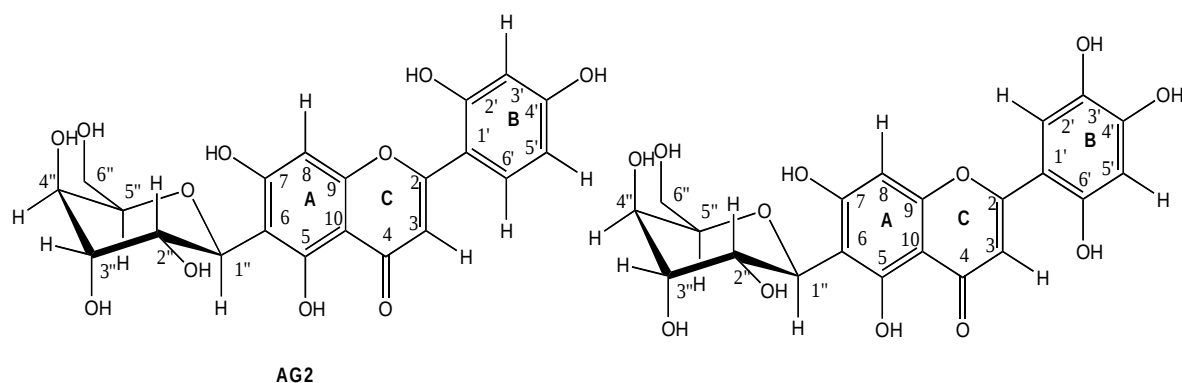
- o On utilise les quatre corrélations C-8-/H-14 et C-2/H-11 (4 liaisons), C-2/H-9 (4 liaisons) et C-2/H-10 (3 liaisons) sur le spectre HMBC (Figure 35). D'après le spectre HSQC (figure 29) et COSY (figure 31) les protons H-14 et H- 9, 10,11 appartiennent à deux noyaux aromatiques différents.

I.2.2.3. Nature du sucre

On utilisera préférentiellement la COSY (figure 32, agrandissement 3 à 5 ppm). Tous les protons H-16, 17, 18, 19, 20 et 21 ont été attribués par le spectre HSQC (figure 29). Sur le spectre COSY (figure 32), on observe les corrélations des protons H-18/H-19, H-19/H-20, H-20/H-17, H-17/H-16 et H-16/H-21. L'idée de la présence d'un sucre est confirmée par les groupements CH et CH₂ attribués par le spectre DEPT 135 (figure 27) ou les CH₂ apparaissent négatifs, les CH en positif.

Il faut remarquer que la valeur des déplacements chimiques des CH et CH₂ sur le spectre du carbone a permis de confirmer la présence du sucre en particulier le glucose. Cependant le déplacement chimique du carbone anomérique observé (à 75,29 ppm) qui est habituellement entre 95 à 98 ppm a permis de confirmer une *C-glycosylation* entre le sucre et le noyau aromatique A (voir HMBC figure 36 et 37). De même la constante de couplage J_{H-18} / J_{H-19} de l'ordre de 10Hz confirme une *C-Glycosylation*.

Reprenons la structure de AG2 avec le numéro conventionnelle, puis comparer les valeurs (déplacement chimique des carbones) avec celle d'écrite dans la littérature par l'équipe de Rikke et al, (2000).



Molécule Isolé en 2000 par l'équipe de Rikke Norbaek , J.
Agric. Food Chem. 2000, 48, 1703-1707

Schéma 2 : Numérotation conventionnelle de la molécule AG2

La différence entre ces deux molécules se trouve aux niveaux de la disposition et du nombre de groupements hydroxyles du cycle aromatique **B**, qui est très éloigné du sucre pour avoir une influence. La valeur de la constante de couplage $J_{1''-2''} = J_{2''-3''} = 9.9\text{Hz}$, montre que $H_{1''}$, $H_{2''}$, et $H_{3''}$ sont axiales, ainsi la jonction C_6 et $C_{1''}$ est un β glycosylation. L'expérience RMN a été réalisée dans les mêmes conditions, à savoir un RMN 600 MHZ, dans le DMSO-d_6 .

Tableau IX : Comparaison du fragment sucre de AG2 et AG3 avec celui de la littérature

Molécule AG2- $\delta^{13}\text{C}$	Molécule Litt.- $\delta^{13}\text{C}$	Molécule AG3- $\delta^{13}\text{C}$
$C_{1''}$:73.48	$C_{1''}$: 73.0	$C_{1''}$:73.38
$C_{2''}$:71.07	$C_{2''}$: 70.1	$C_{2''}$:70.71
$C_{3''}$: 79.40	$C_{3''}$: 78.8	$C_{3''}$: 78.75
$C_{4''}$:70.62	$C_{4''}$: 70.4	$C_{4''}$:70.68
$C_{5''}$:82.06	$C_{5''}$: 81.5	$C_{5''}$:82.00
$C_{6''}$:61.95	$C_{6''}$: 61.4	$C_{6''}$:61.62

La comparaison des données physico-chimiques de notre fragment sucre, et celle de la littérature permet de conclure sans ambiguïté que c'est un glucose C-glucoside (Tableau IX).

I.2.2.2. Attribution des résonances du produit AG-3

La formule de AG3 (Schéma 3) montre la structure chimique de flavonoïde de la famille de Morin non hydraté C-glucoside en position 8 (numéro réglementaire suivant UIPAC). La RMN a été réalisée dans le DMSO- d_6 . Le déplacement du proton phénolique à 13.3 ppm a été déterminant car ce type de déplacement est dû à la liaison hydrogène du proton OH avec l'oxygène du carbonyle du noyau chromone. Nous avons identifié le produit AG3 par le même raisonnement décrit pour AG2.

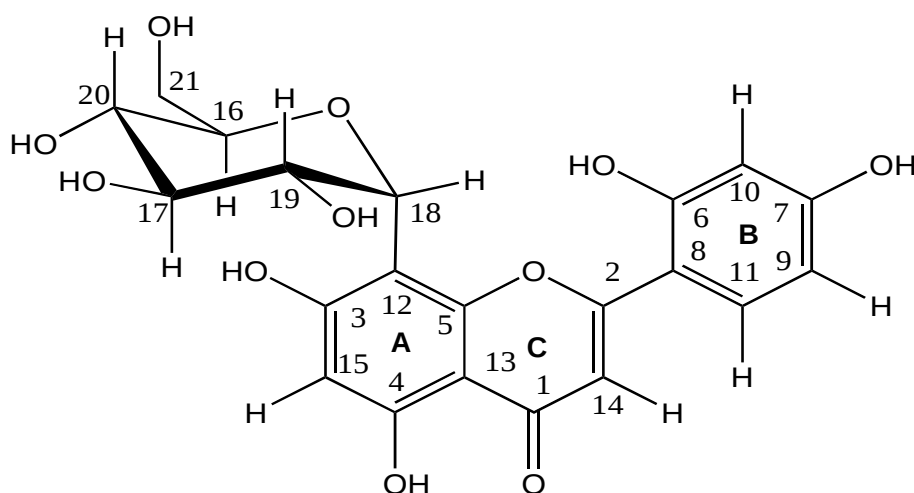


Schéma 3 : Structure de la molécule AG3 (numérotation basée sur les $\delta^{13}C$)

La corrélation HMBC (figures 52 et 53) de C4/OH (13,3ppm), C-12/OH (13,3ppm), et C-15/OH (13,3ppm), ont permis de placer les 3 phénols aromatique et les C-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 étant placés à côté d'un atome d'oxygène ont un déplacement chimique élevé. En observant les deux spectres de HSQC (figures 46 et 47) et COSY (figures 49 et 50), on identifie les carbones quaternaires, car étant absent dans le HSQC. Le reste de l'analyse est identique à celle effectuée sur la molécule de AG2. Le composé AG2 et AG3 sont des isomères de position : la question, est savoir comment on a pu les différencier

d'une part et d'autre part n'est elle pas la même molécule en équilibre obtenu par un réarrangement de Wessely-Moser (Wessely et al, 1930).

Pour répondre à la première question il faut analyser les deux spectres HMBC de AG2 et de AG3. Sur les deux spectres HMBC (figures 34 et 42) le carbone quaternaire C-4 corrèle avec le proton phénolique à 13,3ppm, ce qui confirme la numérotation de C4 et C5 sur les deux molécules. Sur le spectre HMBC de AG2 (figure 36) on observe deux types de corrélation : **C-4/H-18** anomérique (3 liaisons) et **C-5/H-15** (2 liaisons), alors que dans le spectre de AG3 (figure 53 et 54) c'est l'inverse à savoir **C-4/H-15** et **C-5/H-18** anomérique. Ainsi grâce aux corrélations **C-4/H-18** dans AG2 et **C-5/H-18** dans AG3 (non observé dans AG2) l'isomérisation entre les deux structures a été élucidée.

Pour la deuxième question nous allons faire un rappel du réarrangement de Wessely-Moser (Schéma 4) qui a été un outil important dans la découverte de la structure des flavonoïdes. Il permet la conversion de 5,7,8-triméthoxyflavones en 5,6,7-trihydroxyflavones par hydrolyse des groupes méthoxy en groupe hydroxy (phénols). Le réarrangement se produit à différentes étapes : **A** ouverture du cycle pour donner la dicétone, **B** rotation de la liaison avec formation d'un composé de type acétylacétone, et **C** hydrolyse des deux groupes méthoxy et fermeture du cycle.

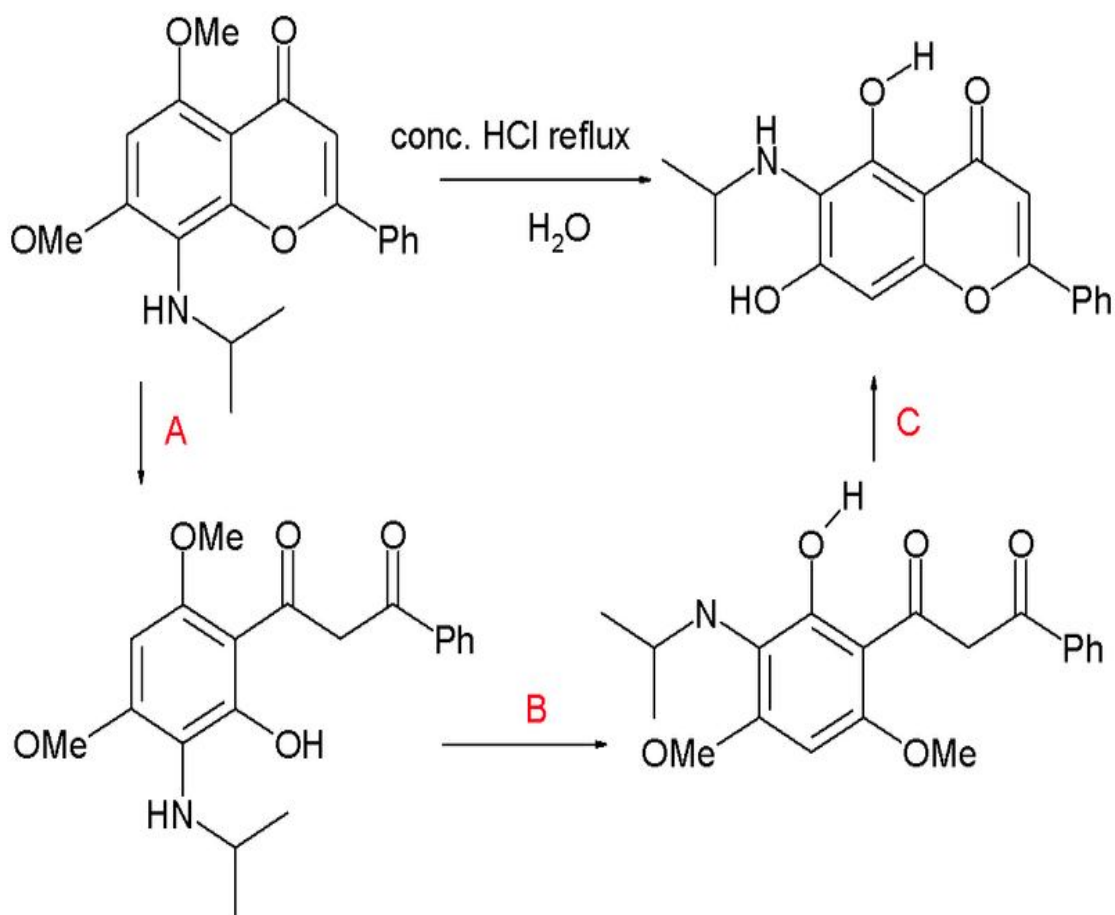


Schéma 4 : Réarrangement de Wessely-Moser

La purification de la fraction FAEM est faite avec deux solvants d'élutions différents : [EAU] (solution A) / CH₃CN (solution B) et [EAU + TFA 0.0025%] (solution A) / CH₃CN (solution B). Nous avons observé les deux isomères dans les deux cas. Les conditions de réarrangement de Wessely-Moser n'étant pas réunies dans le cas du solvant d'élution neutre, nous pouvons sans ambiguïté confirmée qu'il y a bien deux isomères AG2 et AG3.

Le tableau X a été réalisé en exploitant les spectres du proton ¹H (figures 40 et 41), carbone ¹³C (figures 42 et 43), du DEPT 135 (figure 44), et la corrélation HSQC (figure 45-46) de AG3.

Tableau X : Attribution du numéro des atomes de carbones et d'hydrogènes de AG3 (DMSO-d₆).

Carbone N°	δppm ¹³ C	Type	δppm ¹ H et constantes de couplages	Proton lié à l'atome d'oxygène	
1	182,03	C		H	13,18
2	164,08	C		H	10,85
3	162,53	C		H	10,07
4	160,38	C		H	9,09
5	155,99	C			
6	149,56	C			
7	145,78	C			
8	122,03	C			
9	119,37	CH	7,54;dd; J= 8,34; 2,1Hz		
10	115,63	CH	6,84; d; J= 1,86Hz		
11	114,06	CH	7,48; d; J= 8,24Hz		
12	104,52	C			
13	104,03	C			
14	102,41	CH	6,64; s		
15	98,09	CH	6,27; s		
16	82,00	CH	3,40-3,44, m		
17	78,75	CH	3,45-3,50,m		
18	73,8373.38	CH	4,90; d; J=10Hz		
19	70,76	CH	3,74-3,88; J=10Hz		
20	70,68	CH	3,45-3,50; J=10Hz		
21	61,63	CH ₂	3,74-3,88 et 3,56, dd, J= 4,26; 12,12Hz		

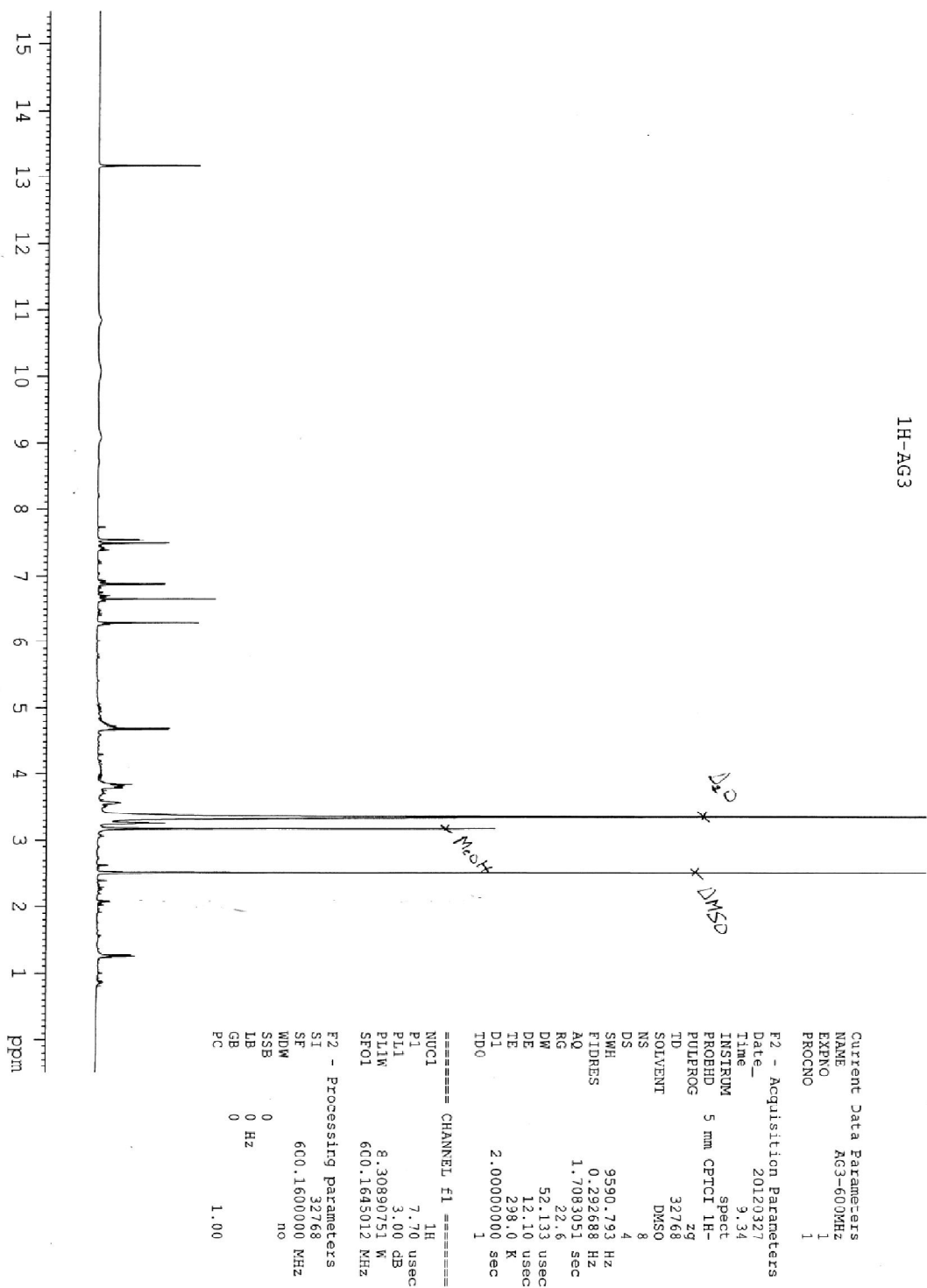


Figure 40: Spectre de ^1H de la molécule AG3 dans le DMSO-d_6 .

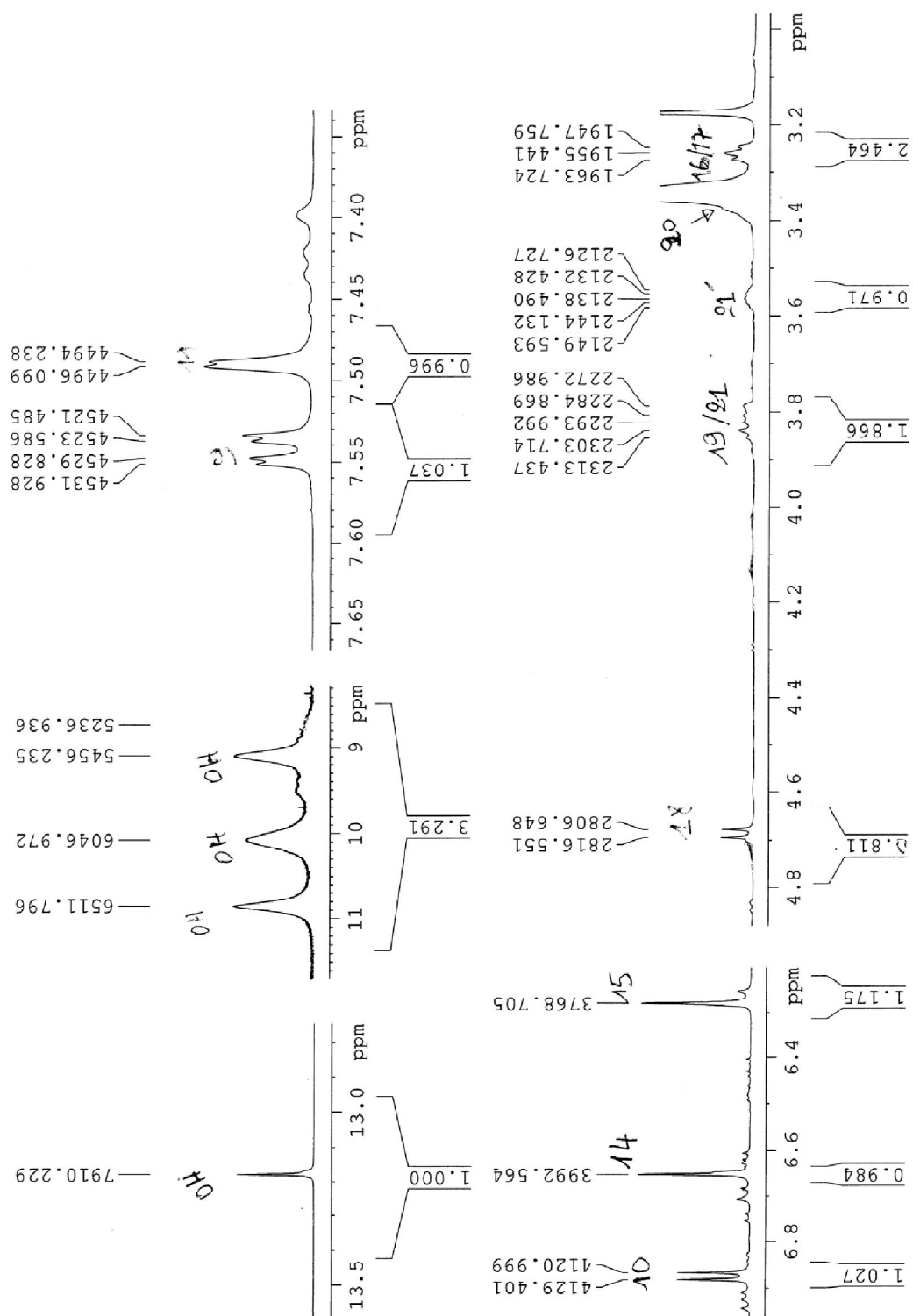


Figure 41: Spectre de ^1H de la molécule AG3 dans le DMSO-d_6 avec agrandissement

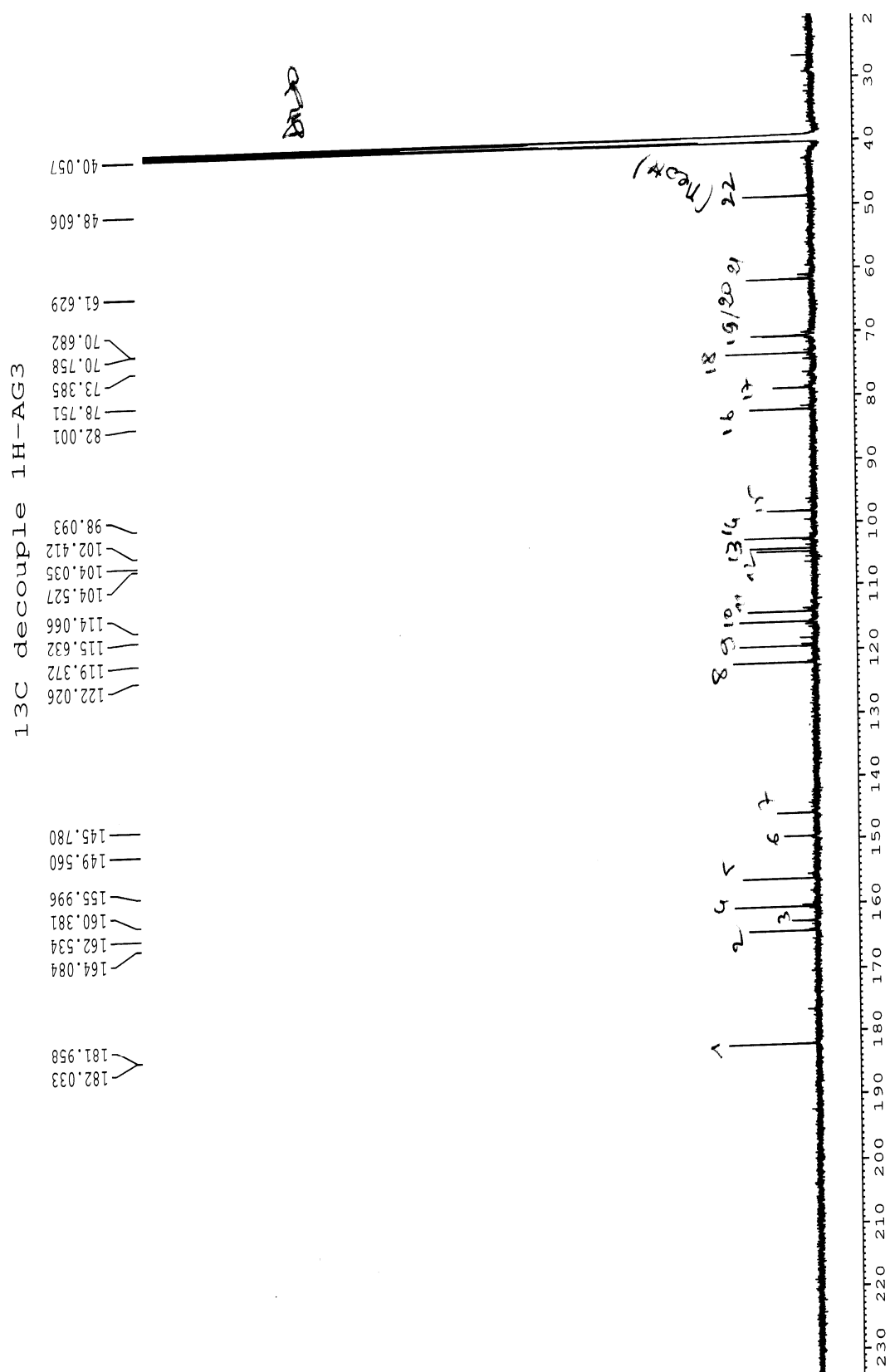


Figure 42: Spectre ^{13}C de AG3 dans DMSO-d_6

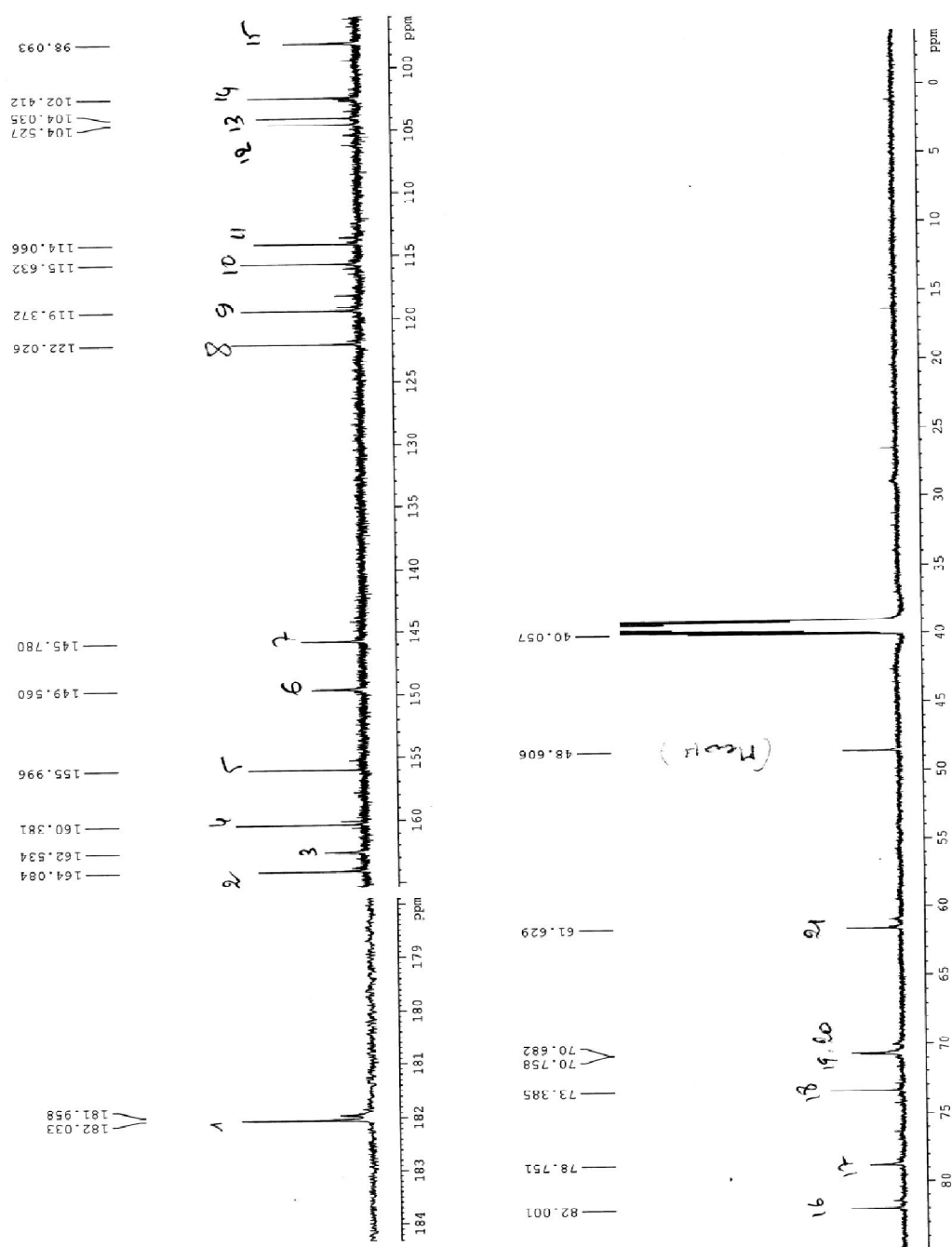


Figure 43 : Agrandissement du spectre carbone ^{13}C de AG3.

Ce travail commence par la numérotation des résonances des δ du carbone ^{13}C , par ordre décroissant sur le spectre.

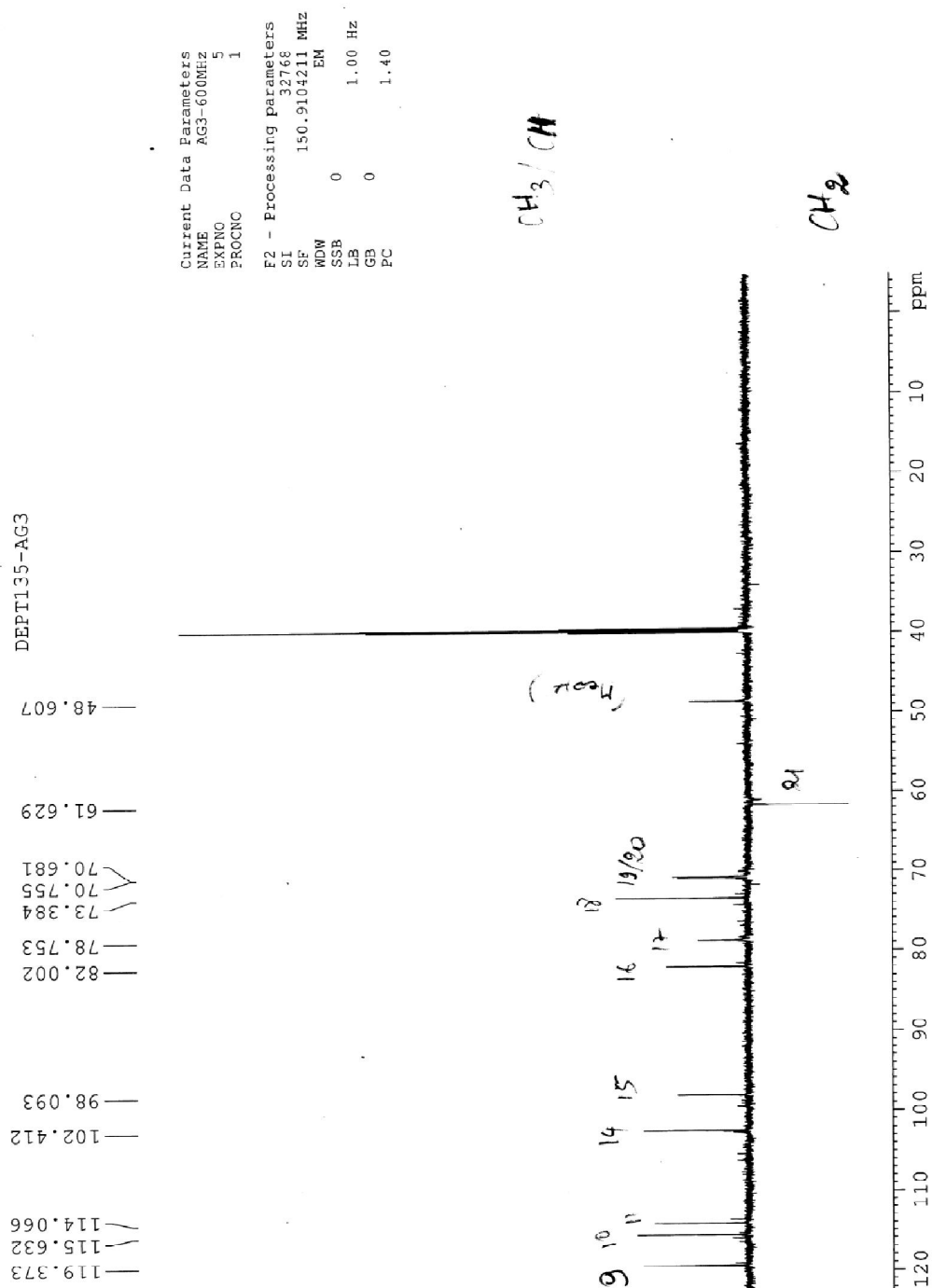


Figure 44 : Spectre ^{13}C DEPT 135 de AG3.

Ce spectre (figure 44) met en évidence les CH/CH_3 et CH_2 . Grâce au spectre HSQC (figure 45), nous avons identifié et numéroté les protons du spectre ^1H .

HSQC-AG3

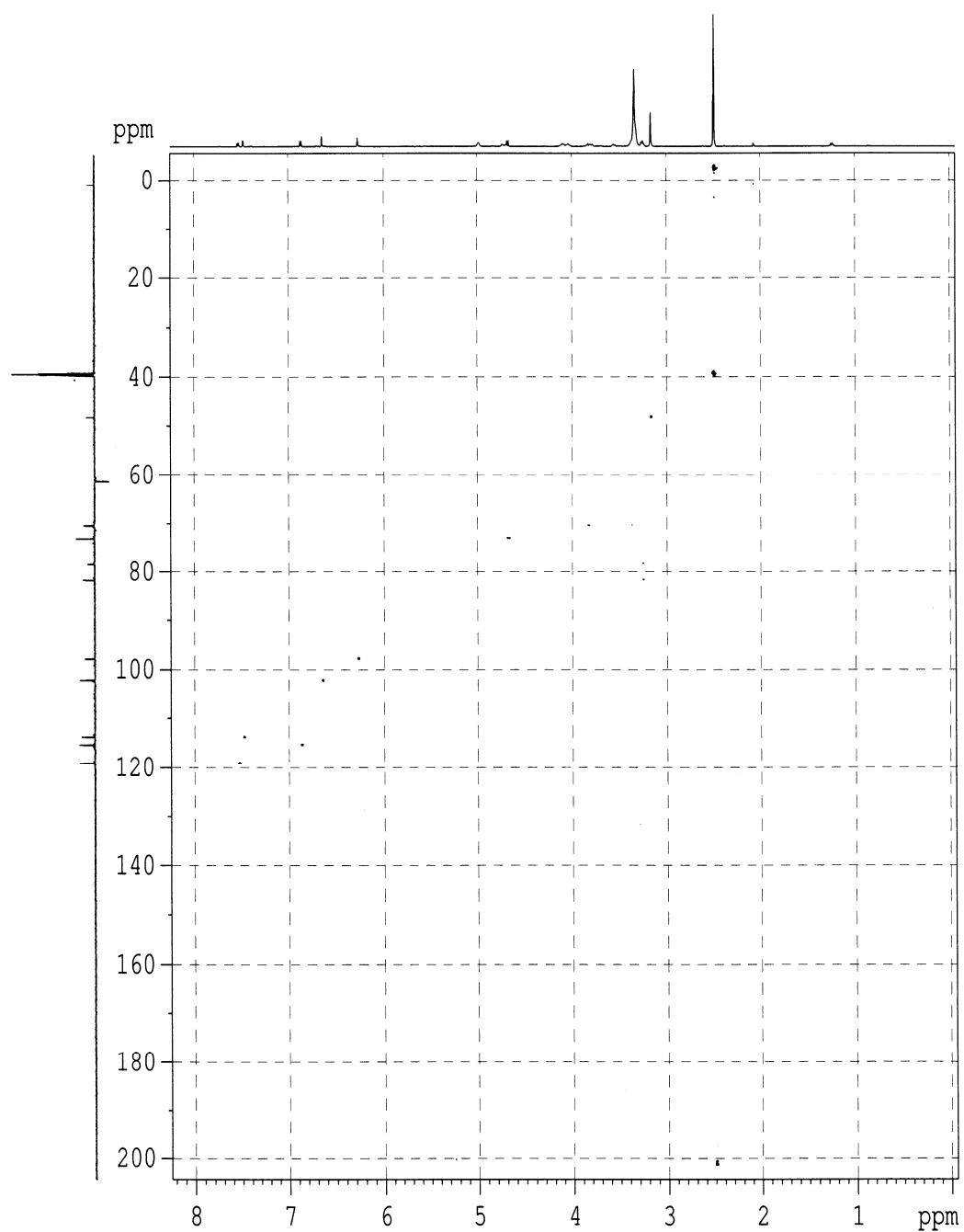


Figure 45 : Spectre HSQC de AG3 dans DMSO-d₆

Pour la lecture de ce spectre nous avons agrandi des zones pour mieux exploiter les données spectrales (Figures 46 et 47).

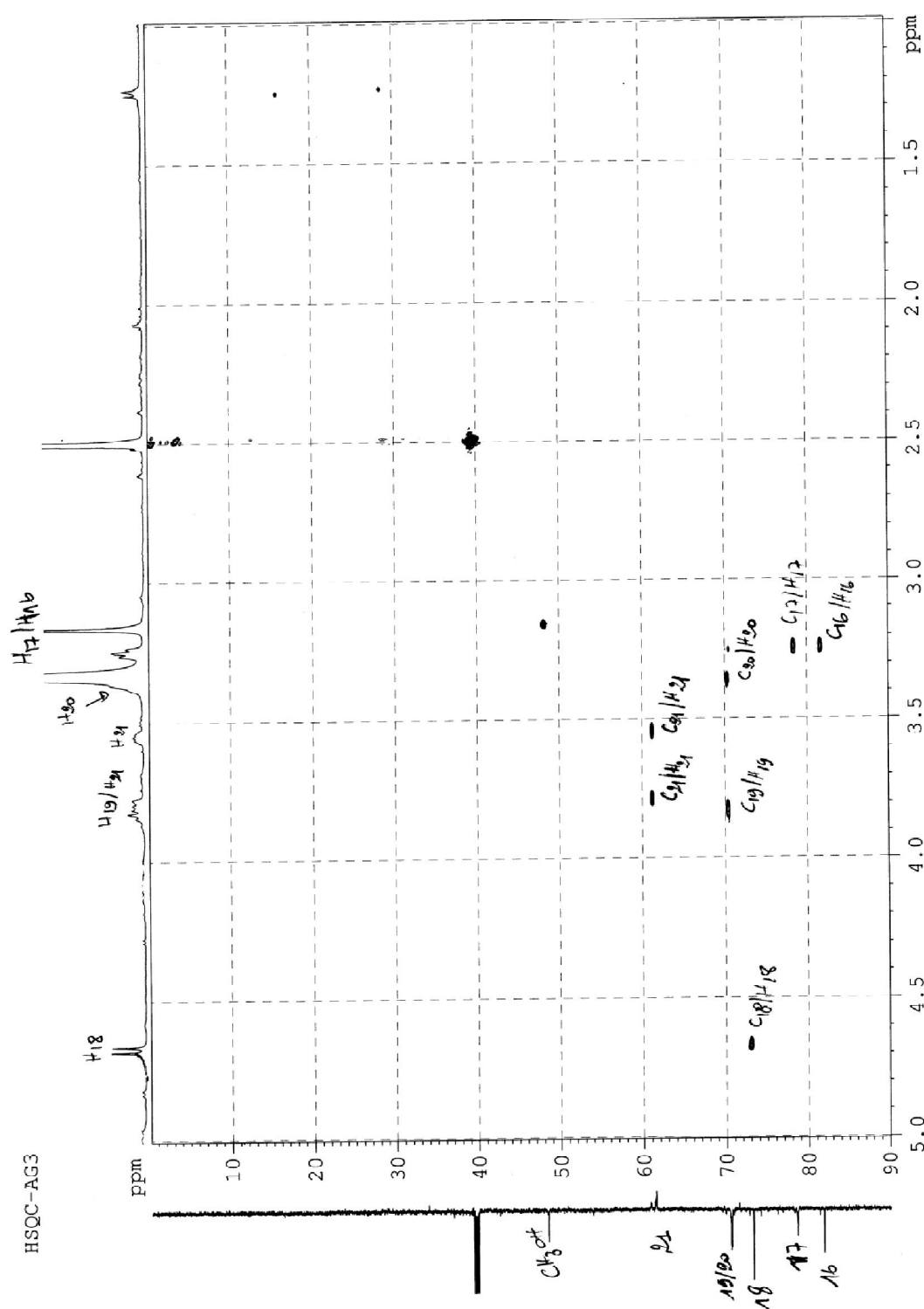


Figure 47: Spectre HSQC de AG3 avec agrandissement de la zone osidique

La corrélation COSY ^1H - ^1H permette de repérer les groupes de protons couplés que nous indiquons par X (Tableau XI).

Tableau XI : Corrélations du spectre COSY ^1H - ^1H obtenu sur le spectre COSY (figures 48,49 et 50) de AG3

H/H	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1																					
2																					
3																					
4																					
5																					
6																					
7																					
8																					
9										X	X										
10									X												
11									X												
12																					
13																					
14																					
15																					
16																	X				X
17																X				X	
18																			X		
19																		X		X	
20																	X		X		
21																X					

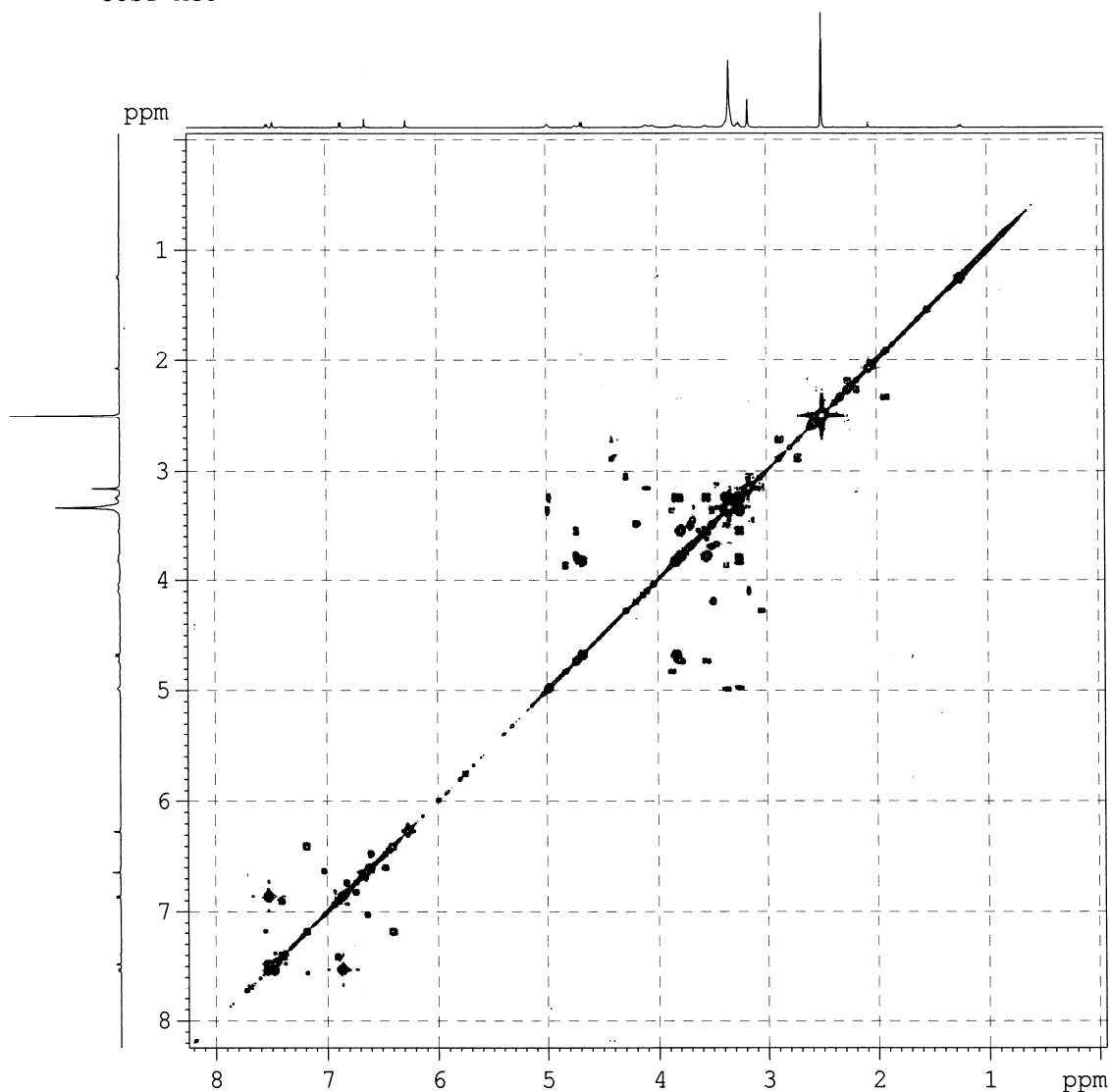


Figure 48 : Spectre du COSY ^1H - ^1H de AG3 dans DMSO- d_6

Les informations fournies par un spectre COSY se traduisent aussi en relations de la proximité entre carbones d'une part et d'autre part entre atome d'hydrogène. Pour l'exploitation des informations spectrale nous avons fait deux agrandissements : la zone aromatique (figure 49) et la zone osidique (figure 50).

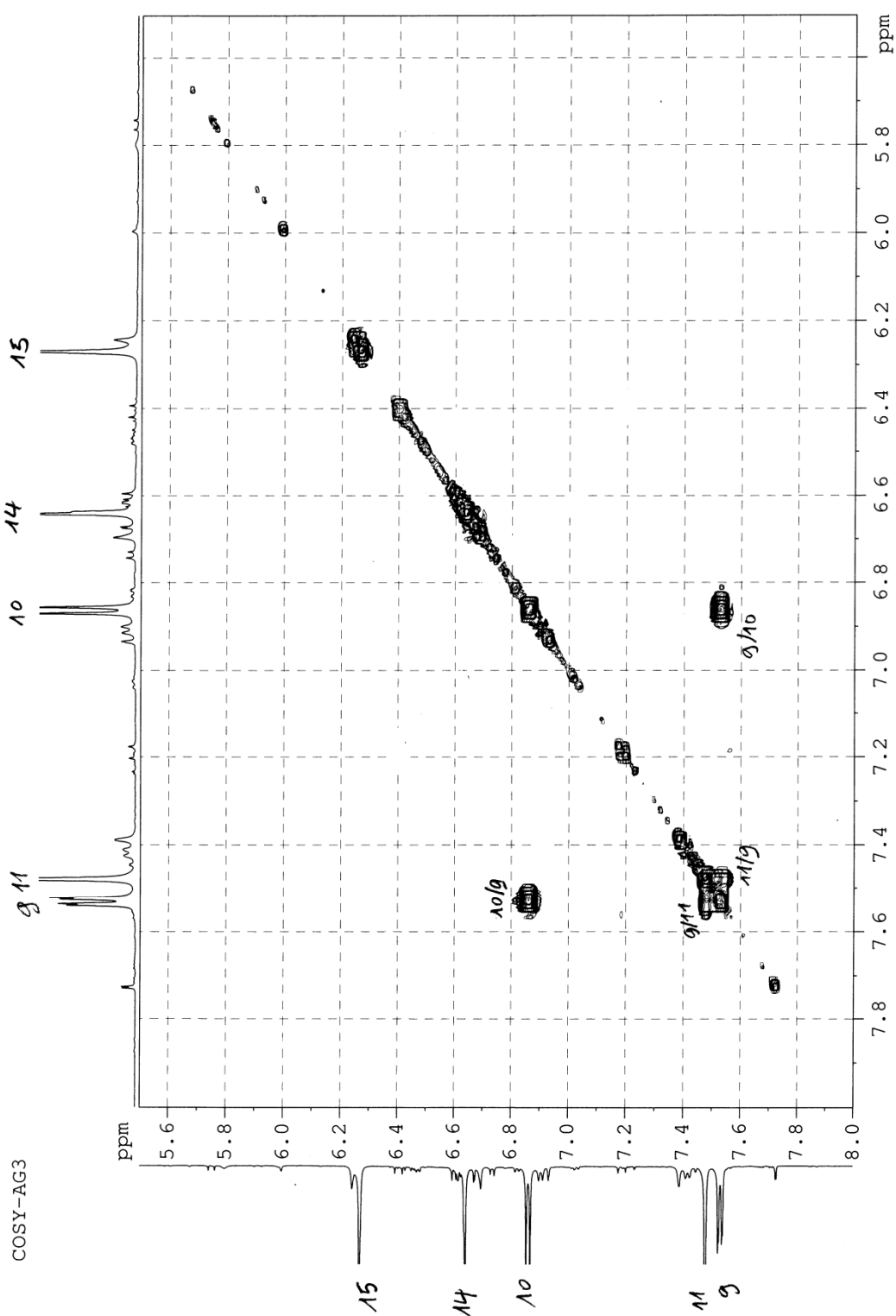


Figure 49 : Spectre COSY ^1H - ^1H avec agrandissement de la zone protons aromatiques de AG3

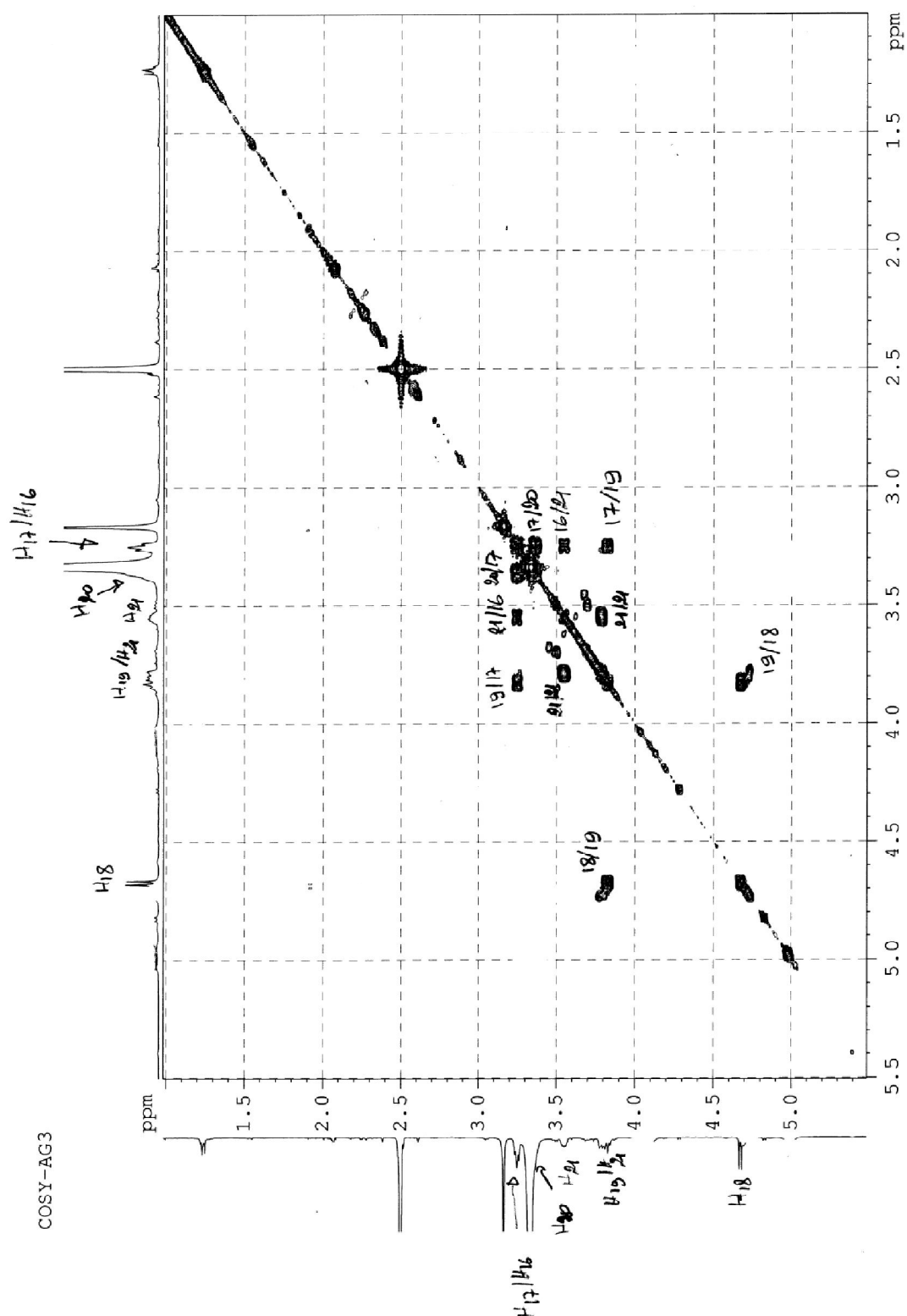


Figure 50 : Spectre COSY¹H-¹H de AG3 avec agrandissement de la zone osidique

Tableau XII : Corrélation HMBC obtenu grâce à une interprétation des spectres HMBC (figures 51-53) de AG3.

C/H	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	H
1														2								
2											3			2								
3															2			3				
4															2							2
5																		3				
6										2	3											
7										2	3											
8										3				3								
9											2											
10										1												
11									2													
12															3			2				
13														3	3							3
14														1								
15																						3
16																		3		2	2	
17																		3				
18																						
19																	2					
20																	2			3		
21																						

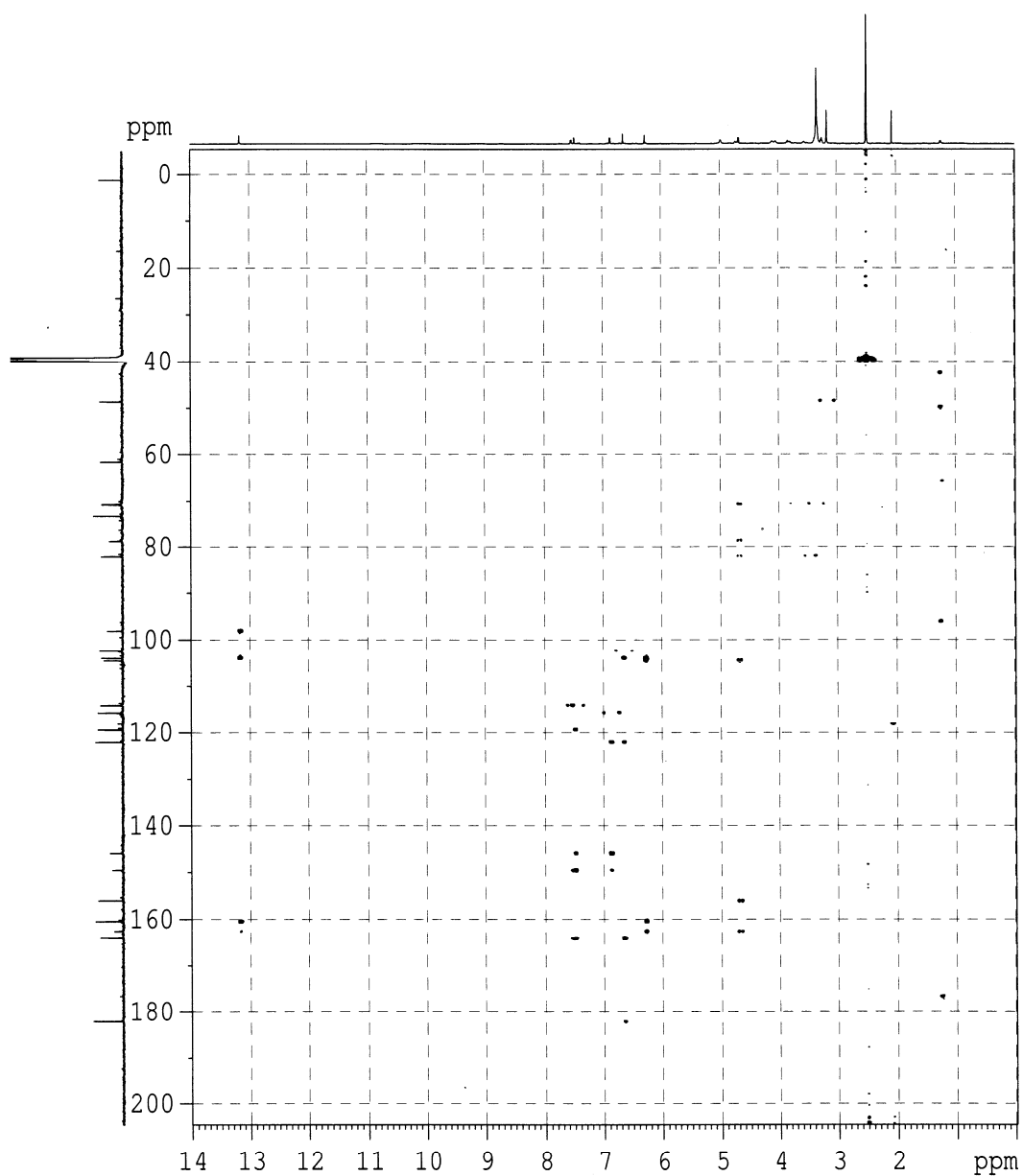


Figure 51 : Spectre HMBC de AG3 dans DMSO-d₆

En raison du nombre important de pics observés, l'analyse nécessite plusieurs parties élargies. Dans ce cas, le spectre a été divisé en trois sections.

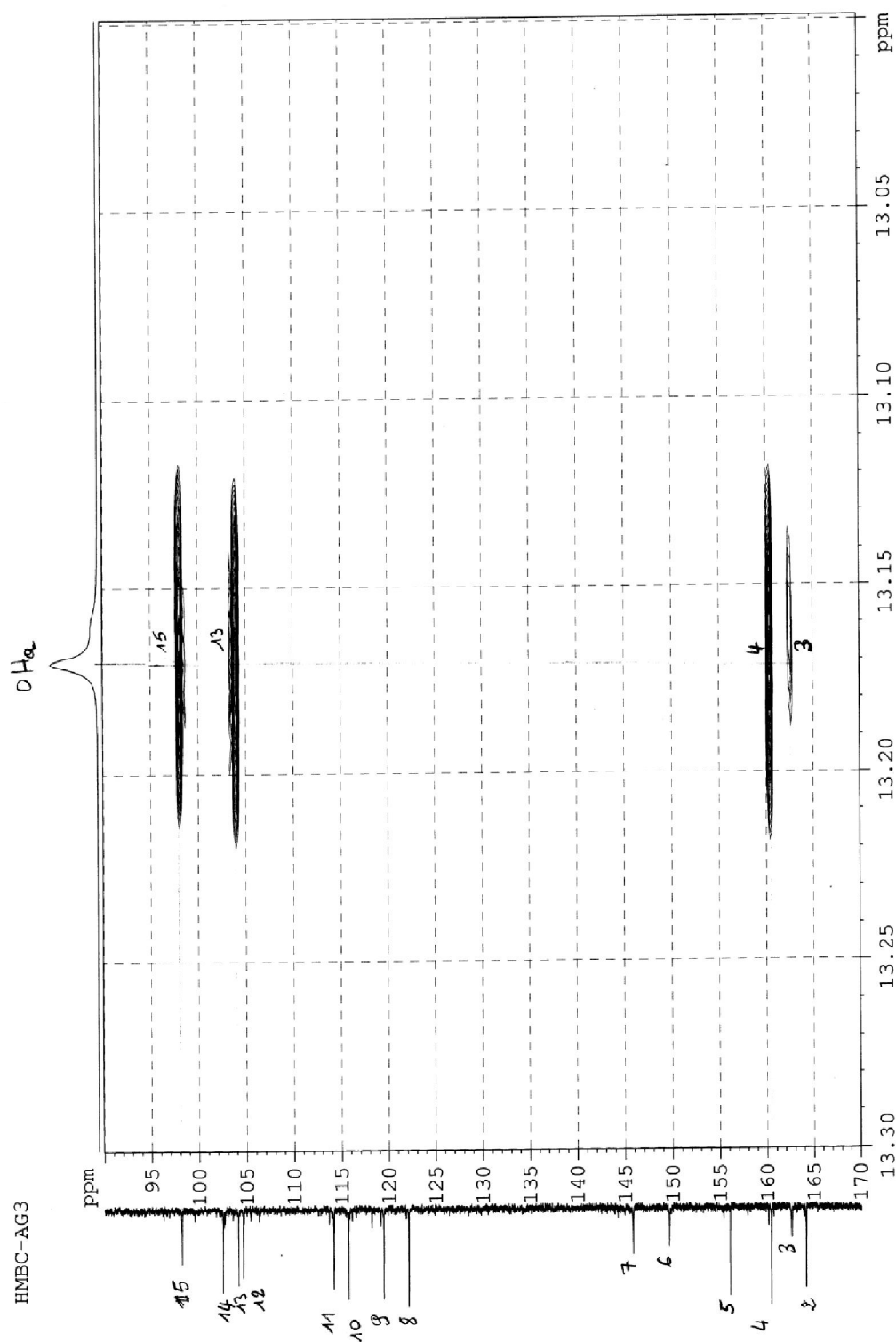


Figure 52 : Spectre HMBC avec agrandissement de la zone des carbones quaternaires aromatiques et le OH (13,3ppm) de AG3.

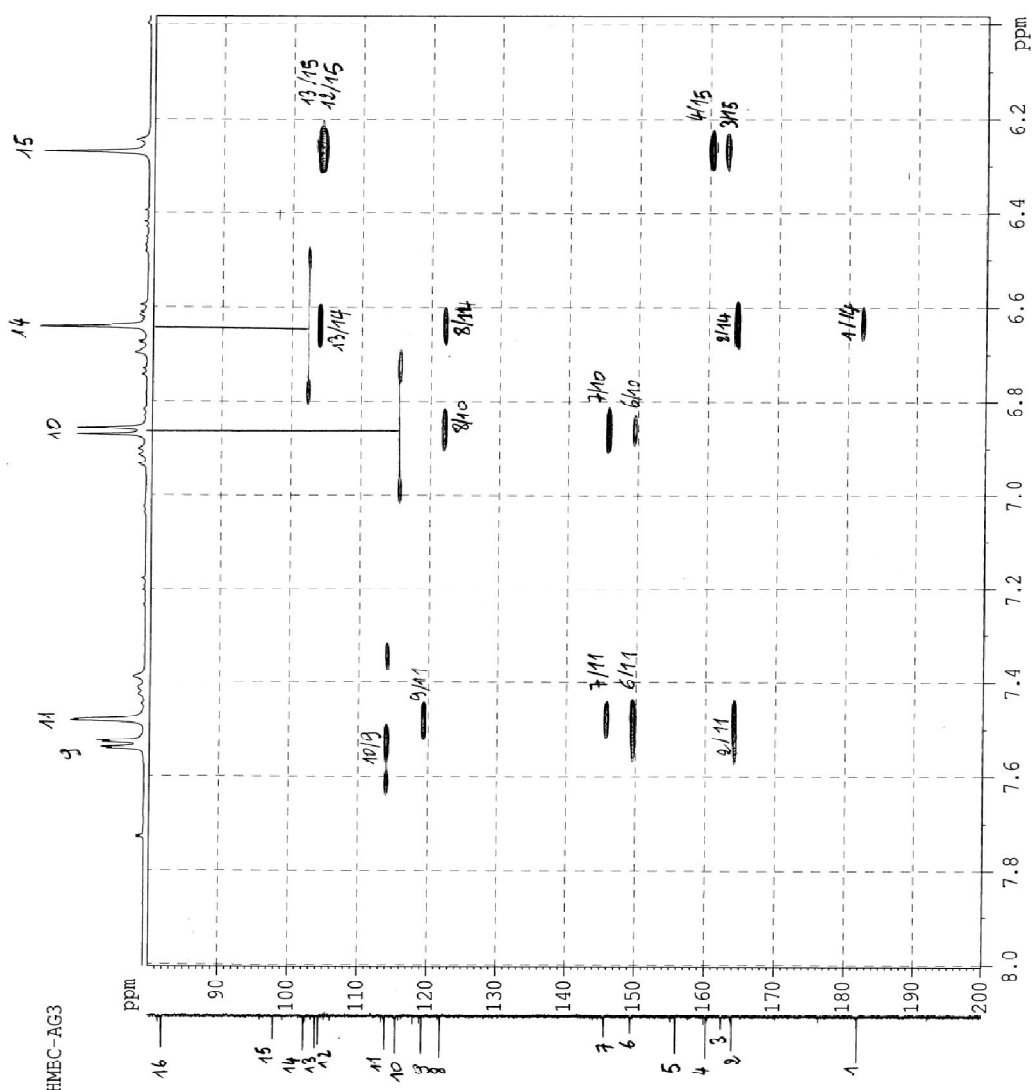


Figure 53: Spectre HMBC avec agrandissement de la zone protons aromatiques de AG3.

Il faut remarquer que les corrélations $^1J_{H-C}$, sont des corrélations résiduelles. Cette constante $^1J_{H-C}$ apparaît sous forme de 2 tâches espacées et symétriques par rapport au pic du proton. C'est le cas de C10/H10 et C14 / H14 (figure 53), CH_3 du solvant $DMSO-d_6$ et le méthanol (figure 54).

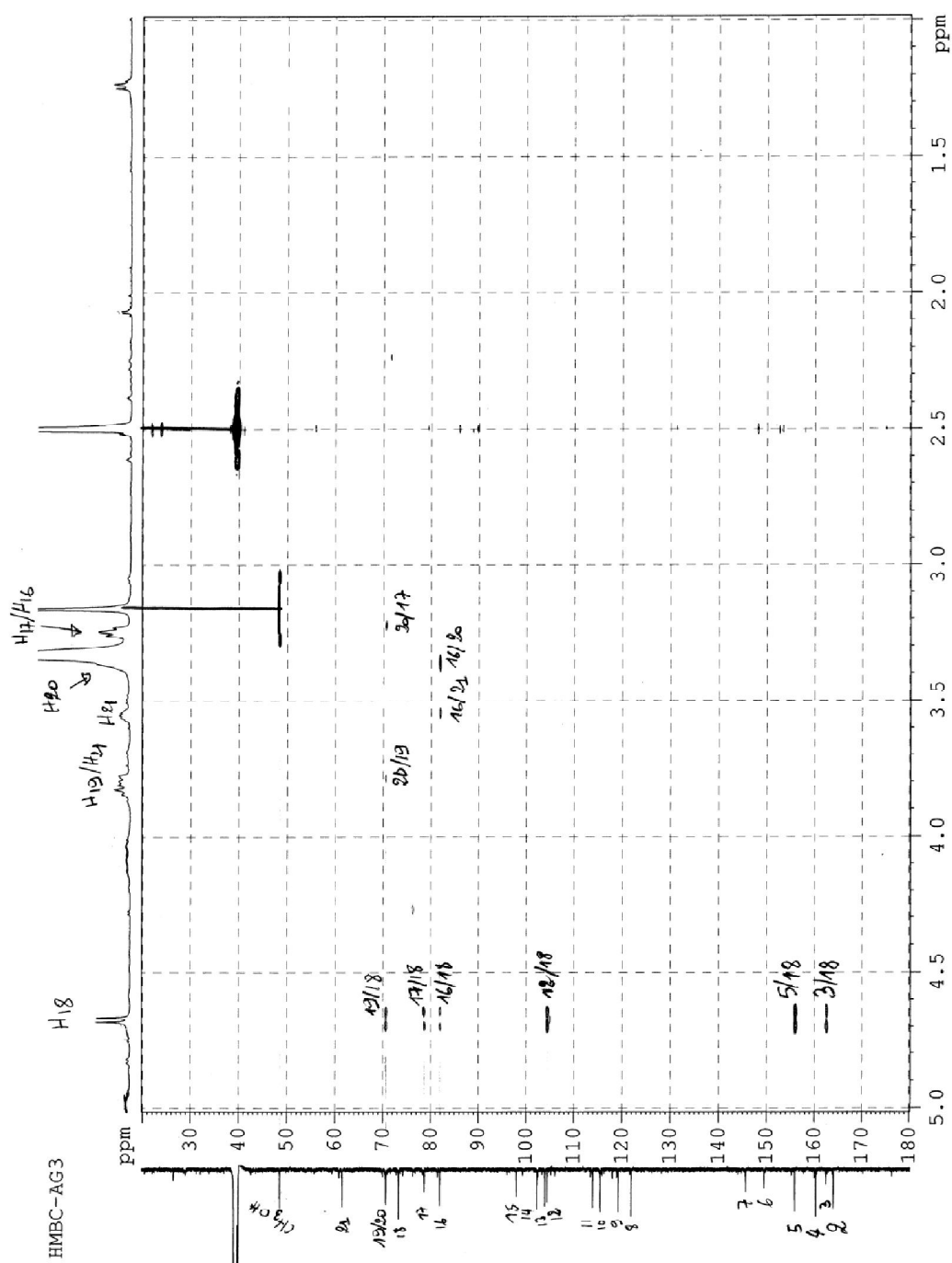


Figure 54 : Spectre HMBC avec agrandissement de la zone osidique de AG3

Nous avons réalisé un spectre de masse de la molécule AG3 de formule brute $C_{21}H_{20}O_{11}$ et de masse molaire moléculaire 448 daltons.

On observe sur ce spectre le pic moléculaire $[M+H]^+ = 449$ et $[M+Na]^+ = 471$ (figure 55). Le spectre infra rouge est représenté par la figure 56.

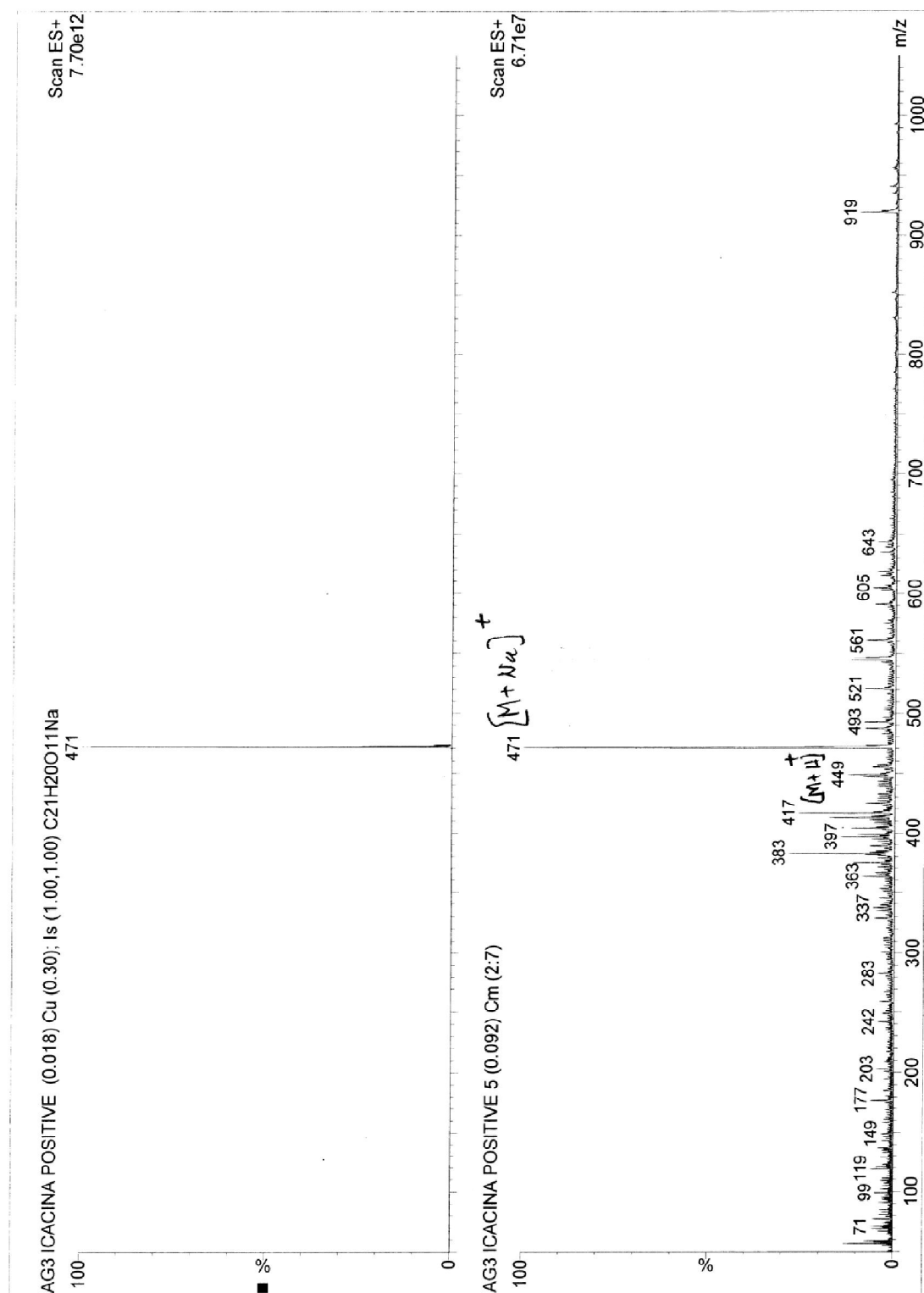


Figure 55 : Spectre de masse de AG3 de formule brute $C_{21}H_{20}O_{11}$ de $M = 448$.

Position:	1431	Intensité:	24,135
Position:	1191	Intensité:	26,526
Position:	1517	Intensité:	27,738
Position:	1082	Intensité:	28,308
Position:	1114	Intensité:	28,712
Position:	1043	Intensité:	32,556
Position:	1014	Intensité:	32,998
Position:	842	Intensité:	49,326
Position:	606	Intensité:	53,506
Position:	564	Intensité:	55,045
Position:	815	Intensité:	56,259
Position:	661	Intensité:	57,188
Position:	684	Intensité:	57,771
Position:	725	Intensité:	59,119
Position:	1762	Intensité:	60,759
Position:	765	Intensité:	63,179
Position:	887	Intensité:	65,763
Position:	928	Intensité:	70,478

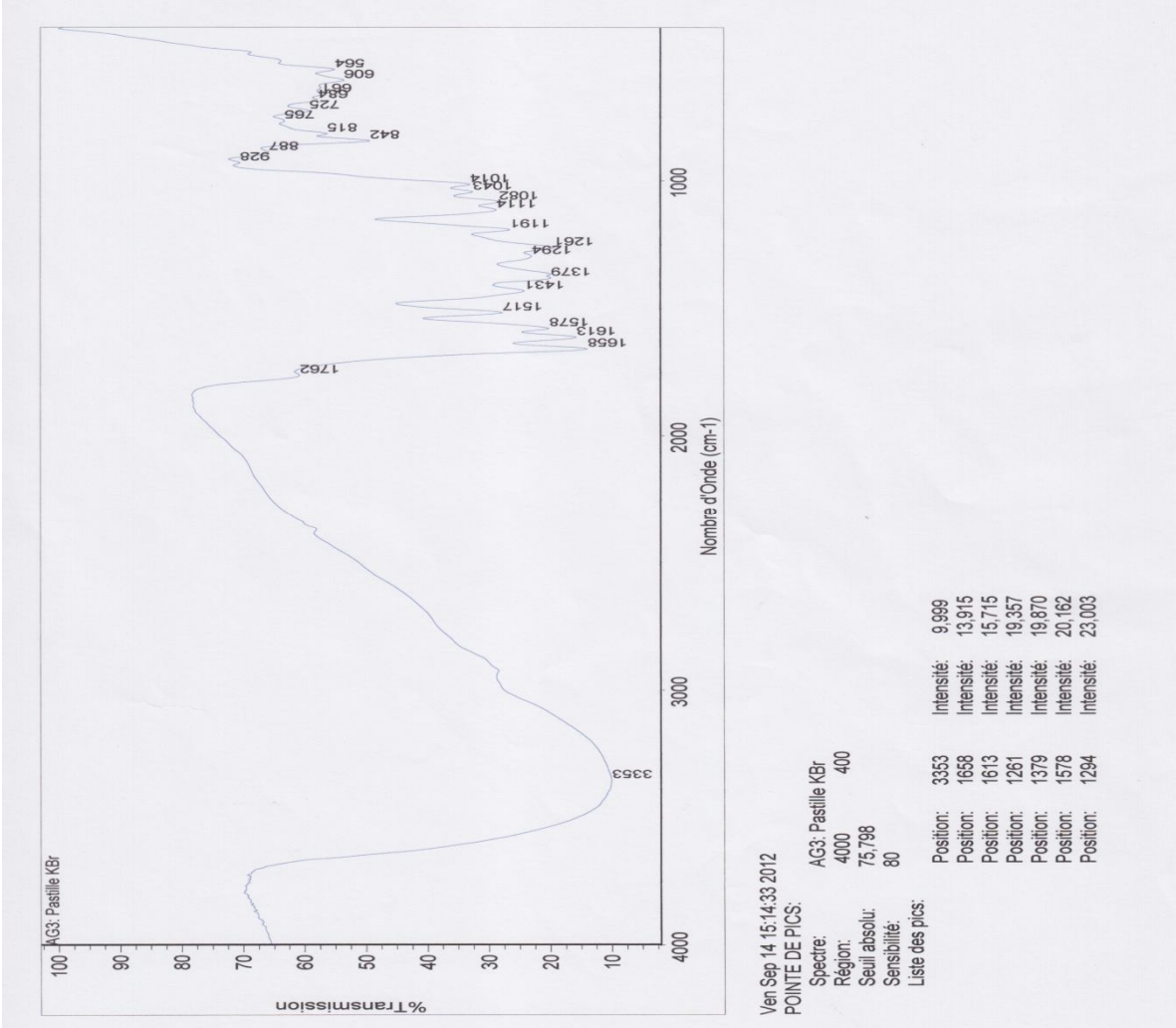


Figure 56 : Spectre infra rouge de AG3 dans KBr

I.2.2.3. Attribution des résonances du produit AG-4

Ce travail commence par la numérotation des résonances des δ du carbone ^{13}C (figure 58) par ordre décroissant sur le spectre "J-modulé" (C_1 pour celui résonant à 173.55 ppm, C_{18} pour celui à 36.59 ppm). Cela génère un identifiant unique pour chaque carbone, avant même de connaître toutes les affectations. Sur le spectre du DEPT 135 (figure 61), les CH_2 apparaissent négatifs, les CH en positif. Le signal à 49 ppm correspond au solvant [méthanol deutéré (MeOD)]. Cette numérotation sera reportée sur l'ensemble des projections 1D pour ^1H (figures 57- 58), DEPT 135 (figure 61), ^{13}C (figures 59, et 60) et 2D des spectres HSQC (figures 74-76) et HMBC (figures 81-86) et COSY (figures 76-80).

Le schéma 5 montre la structure chimique de AG4 (pic 21 de l'HPLC): le *trans* (*S,E*)-(-)-Clovamide (Rikke et al, 2000).

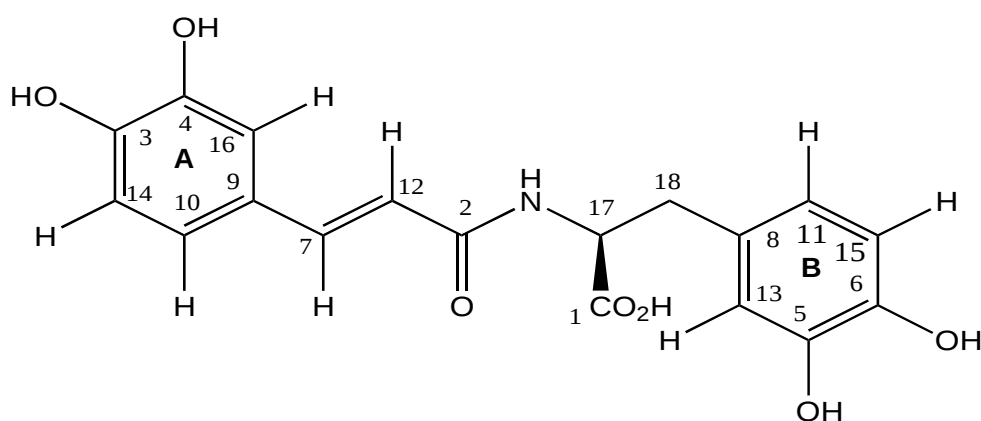


Schéma 5 : Structure du *trans* (*S,E*)-(-)-Clovamide.

Le tableau XIII a été réalisé en exploitant les spectres du proton ^1H (figures 57 et 58), carbone ^{13}C (figures 59, 60), du DEPT135 (figure 61), et la corrélation HSQC (figures 62-64). L'étape clé de cette caractérisation est l'expérience de masse, qui a permis d'identifier la présence d'un atome d'azote dans cette molécule avec une masse moléculaire de 359 u.m.a (Impaire) et le pic $m/z=163$ correspondant au fragment "acide cinnamique". Cette molécule est connue de la littérature, ainsi la stéréochimie du carbone asymétrique a été déterminée par comparaison aux données de la littérature.

Tableau XIII: Attribution du numéro des atomes de carbones et d'hydrogènes de AG4 dans CD₃OD.

Carbone N°	δ ppm ¹³ C	Type	δ ppm ¹ H	Constantes de couplages ⁿ J
1	173,55	C		
2	167,61	C		
3	147,50	C		
4	145,29	C		
5	144,80	C		
6	143,81	C		
7	141,39	CH	7,40	d, J=15,72Hz
8	128,39	C		
9	126,86	C		
10	120,82	CH	6,91	dd; J=1,98Hz; J=8,22Hz
11	120,25	CH	6,58	dd; J=2,1Hz; J=2,0Hz
12	116,53	CH	6,44	d; J=15,66Hz
13	115,91	CH	6,68	d, J=2,02Hz
14	115,02	CH	6,79	d, J=8,16Hz
15	114,87	CH	6,69	d, J=8,22Hz
16	113,72	CH	7,02	d, J=1,98 Hz
17	54,10	CH	4,72	dd; J=5,28Hz; J=5,34Hz
18	36,59	CH ₂	3,13	dd; J=5,64Hz; J=5,28Hz
18	36,59	CH ₂	2,91	dd; J=5,648Hz; J=5,34Hz

1H-AG4

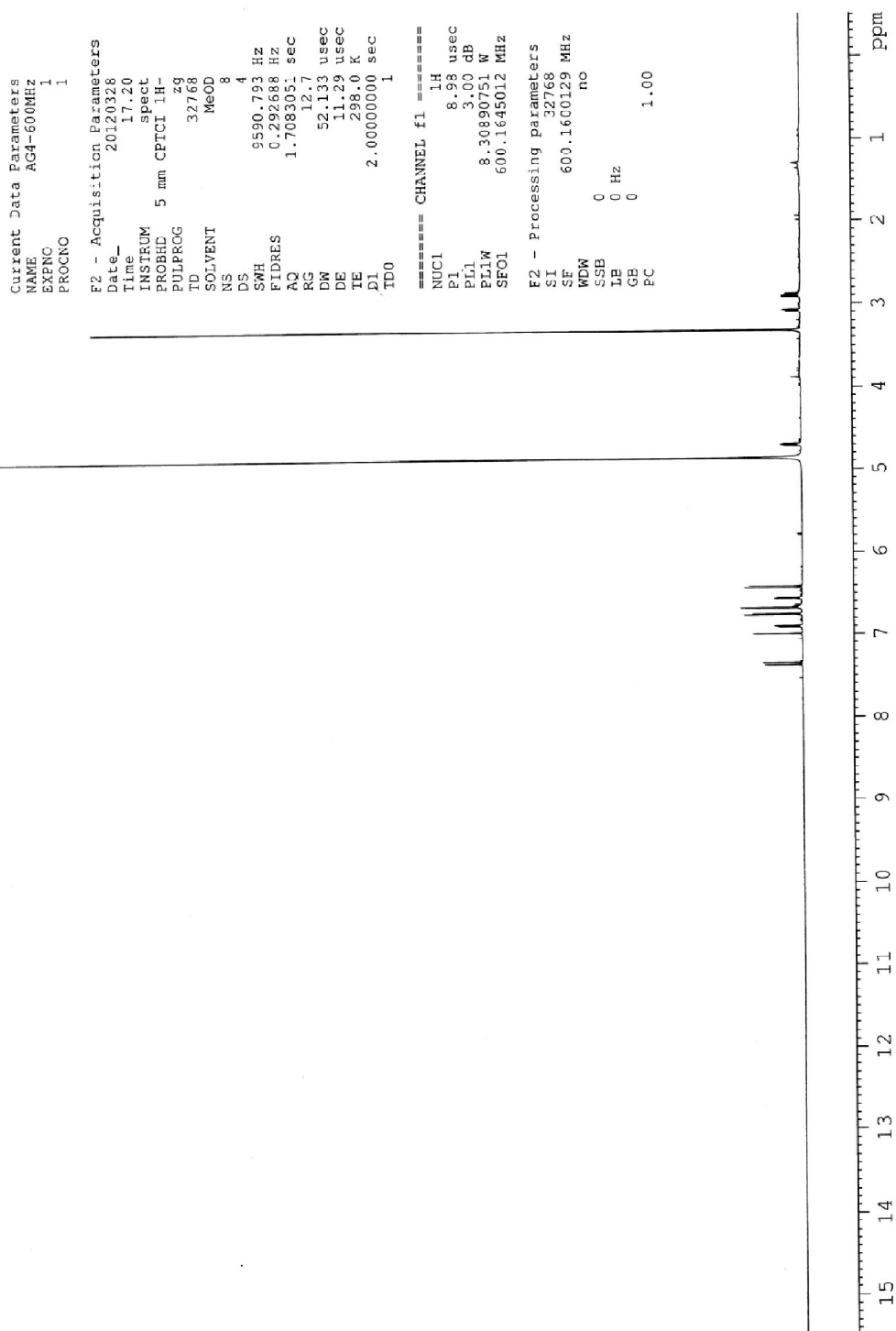


Figure 57: Spectre ^1H de AG4 dans CD_3OD .

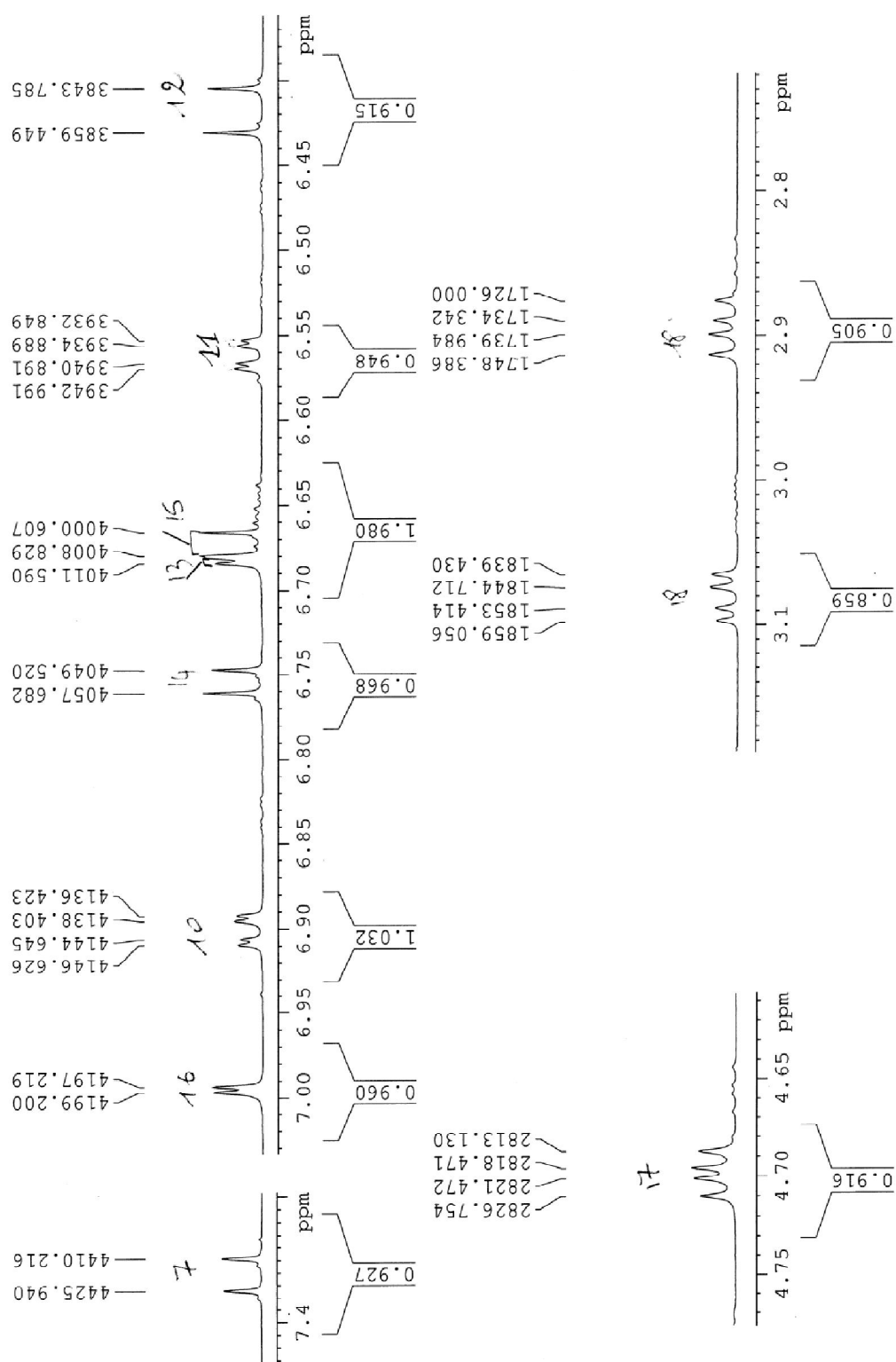


Figure 58 : Spectre ^1H de AG4 avec agrandissement

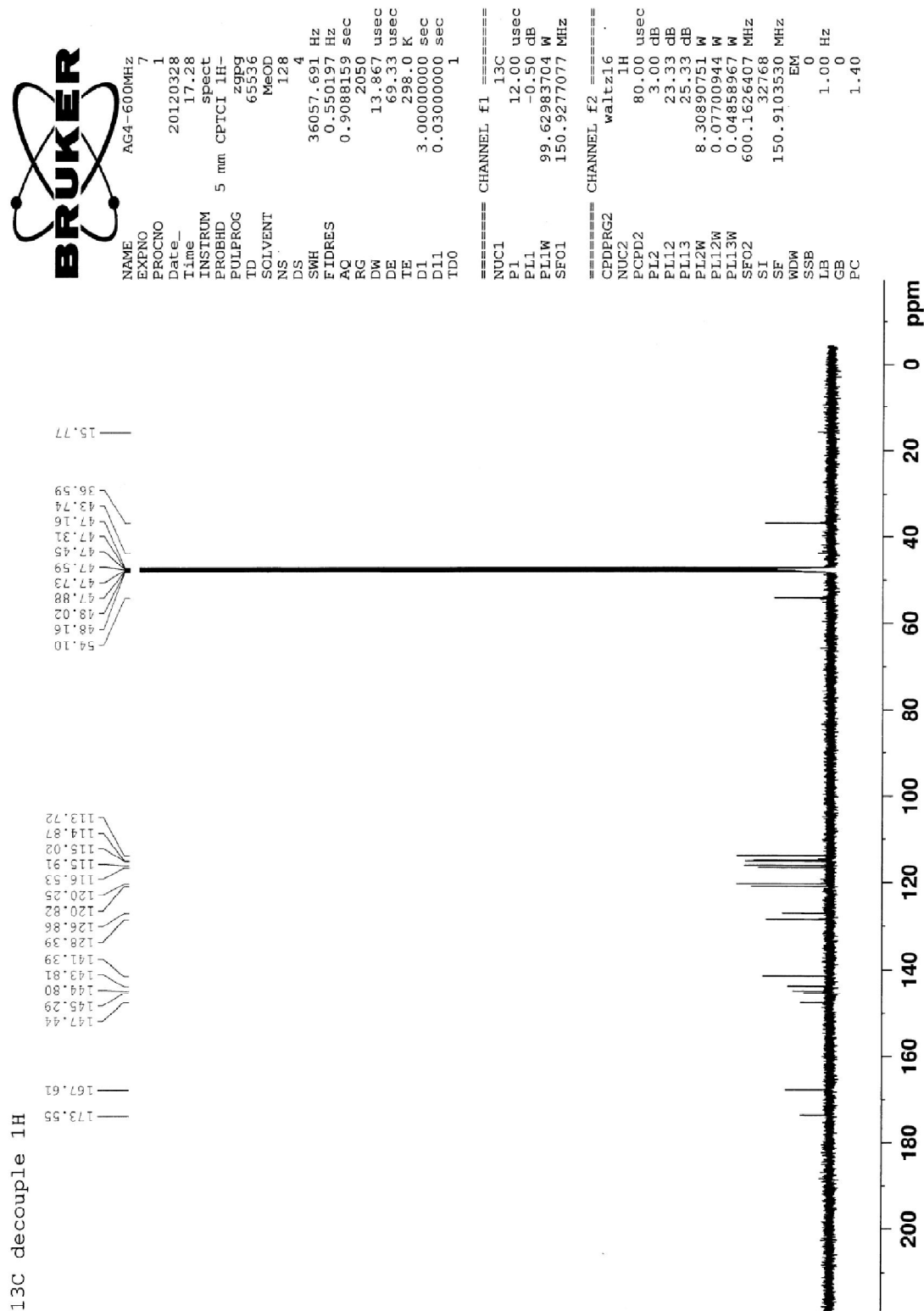


Figure 59 : Spectre ^{13}C de AG4 (CD_3OD).

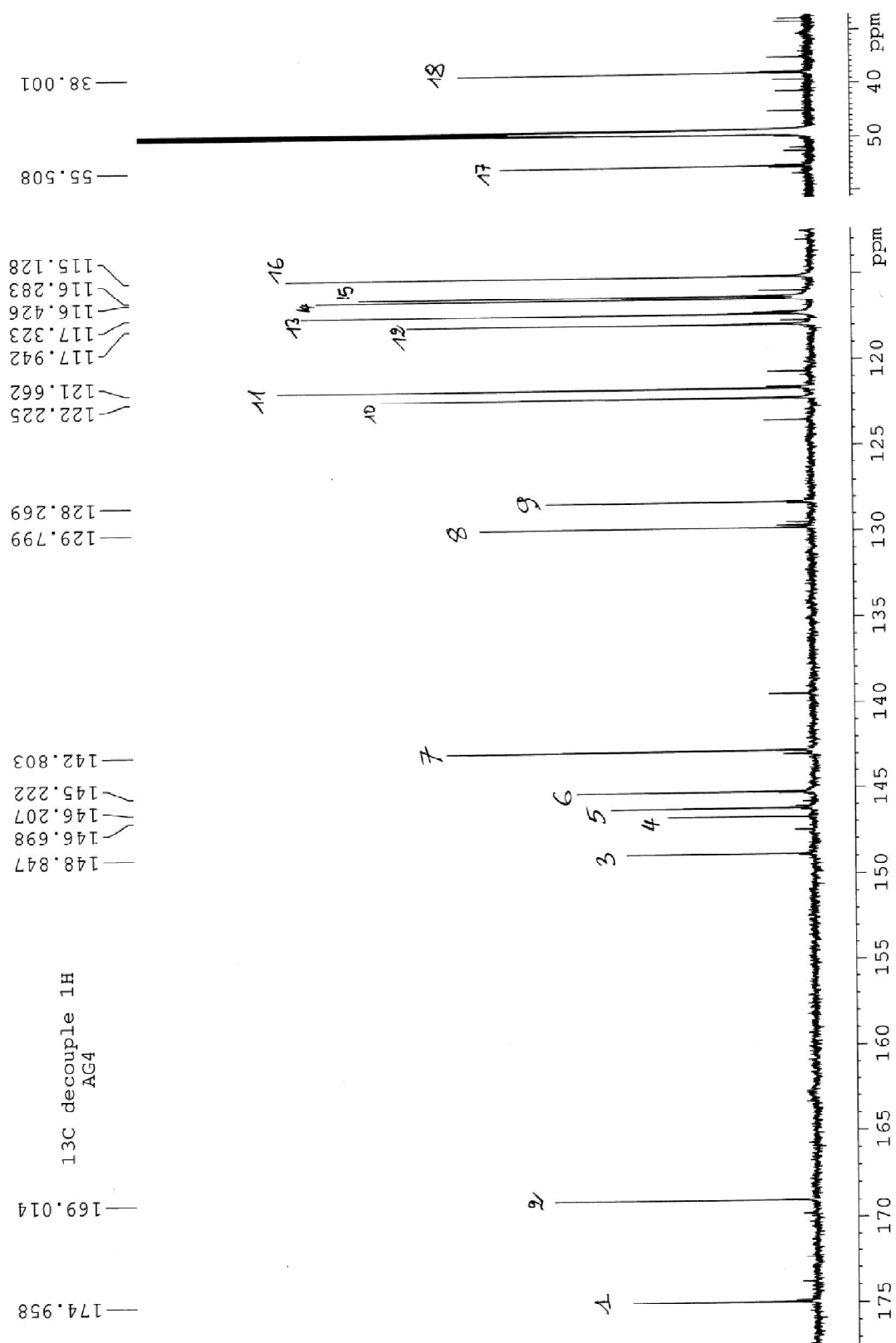
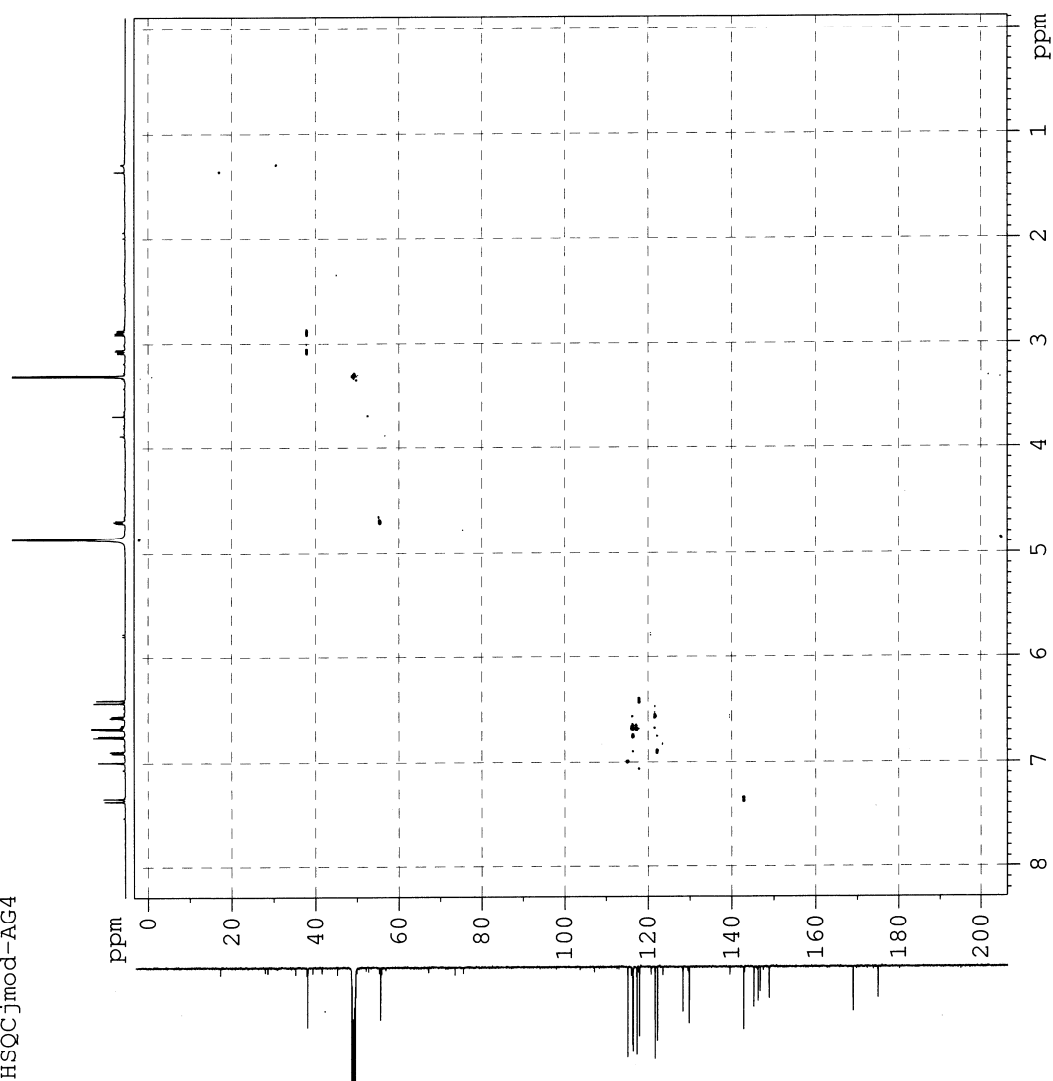


Figure 60 : Spectre ^{13}C de AG4 avec agrandissement

HSQCjmod-AG4



```

Current Data Parameters
NAME      AG4-600MHz
EXPNO     3
PROCNO    1

F1 - Acquisition parameters
TD         512
SFO1       150.9254 MHz
FIDRES     61.903015 Hz
SW         210.000 ppm
FnMODE     Echo-Antiecho

F2 - Processing parameters
SI         2048
SF         600.1600129 MHz
WDW        SINE
SSB        2
LB         0 Hz
GB         0
PC         1.00

F1 - Processing parameters
SI         1024
MC2        echo-antiecho
SF         150.9101405 MHz
WDW        SINE
SSB        2
LB         0 Hz
GB         0
  
```

Figure 62 : Spectre HSQC de AG4 dans CD₃OD

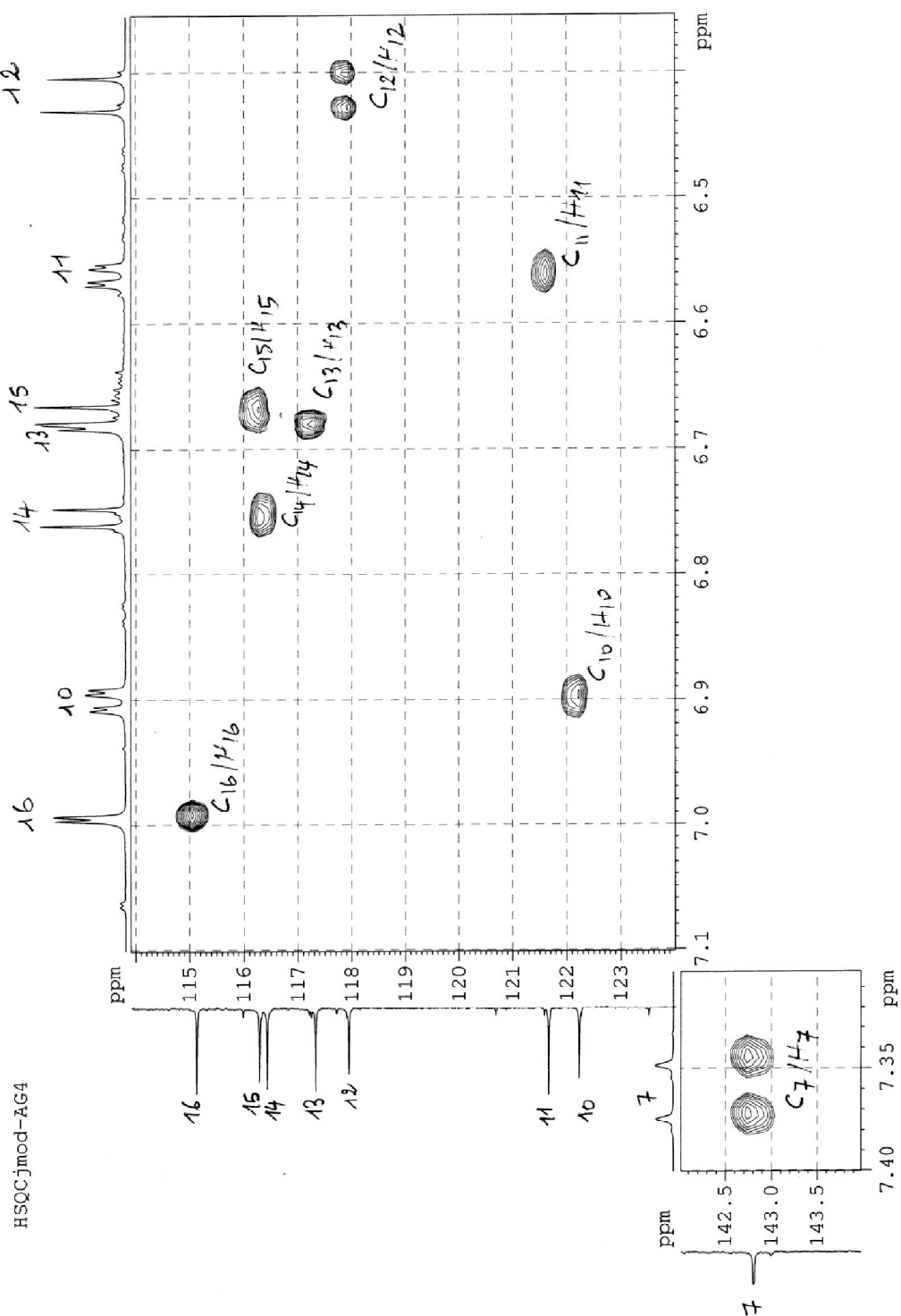


Figure 63: Spectre HSQC de AG4 avec zoom de la zone des protons aromatique (CD_3OD)

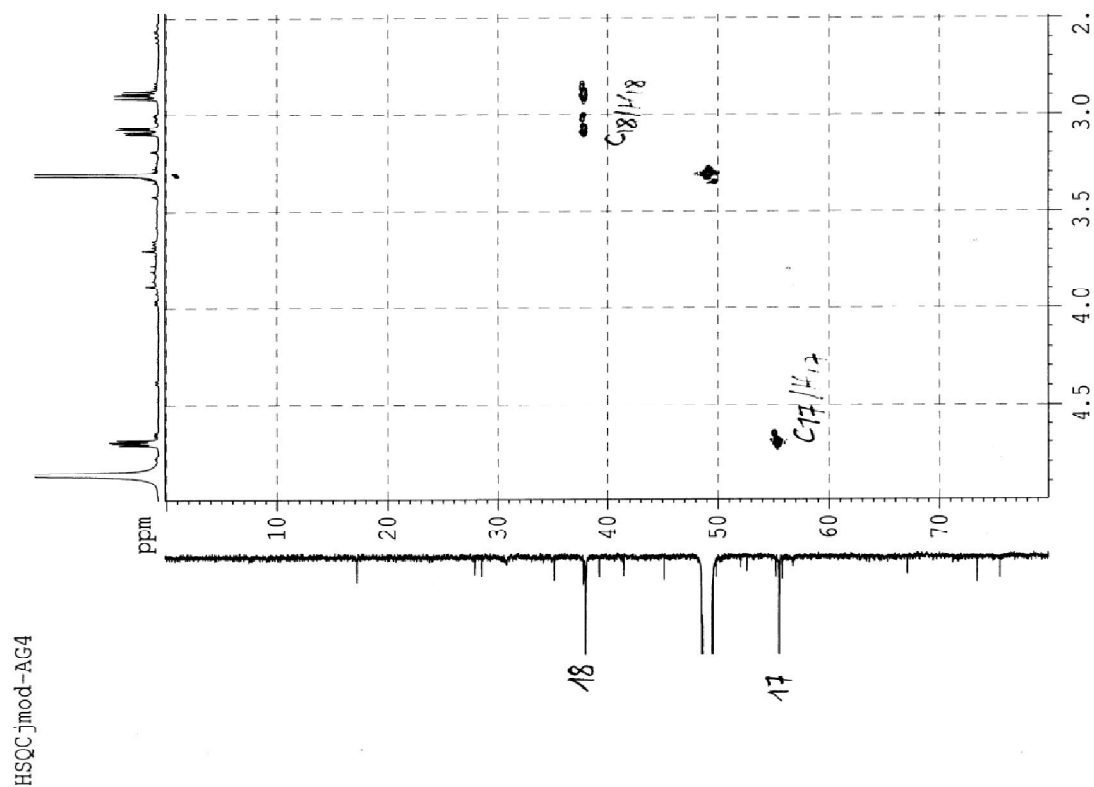


Figure 64 : Spectre HSQC de AG 4 avec zoom de la zone aliphatique

La corrélation COSY ^1H - ^1H (figures 65-68) permet de repérer les groupes de protons couplés que nous indiquons par X dans le tableau XIV.

Tableau XIV: Corrélation COSY¹H-¹H

H/H	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1																		
2																		
3																		
4																		
5																		
6																		
7												X						
8																		
9																		
10														X		X		
11													X		X			
12							X											
13											X							
14										X								
15											X							
16										X								
17																		X
18																	X	X

COSY-AG4

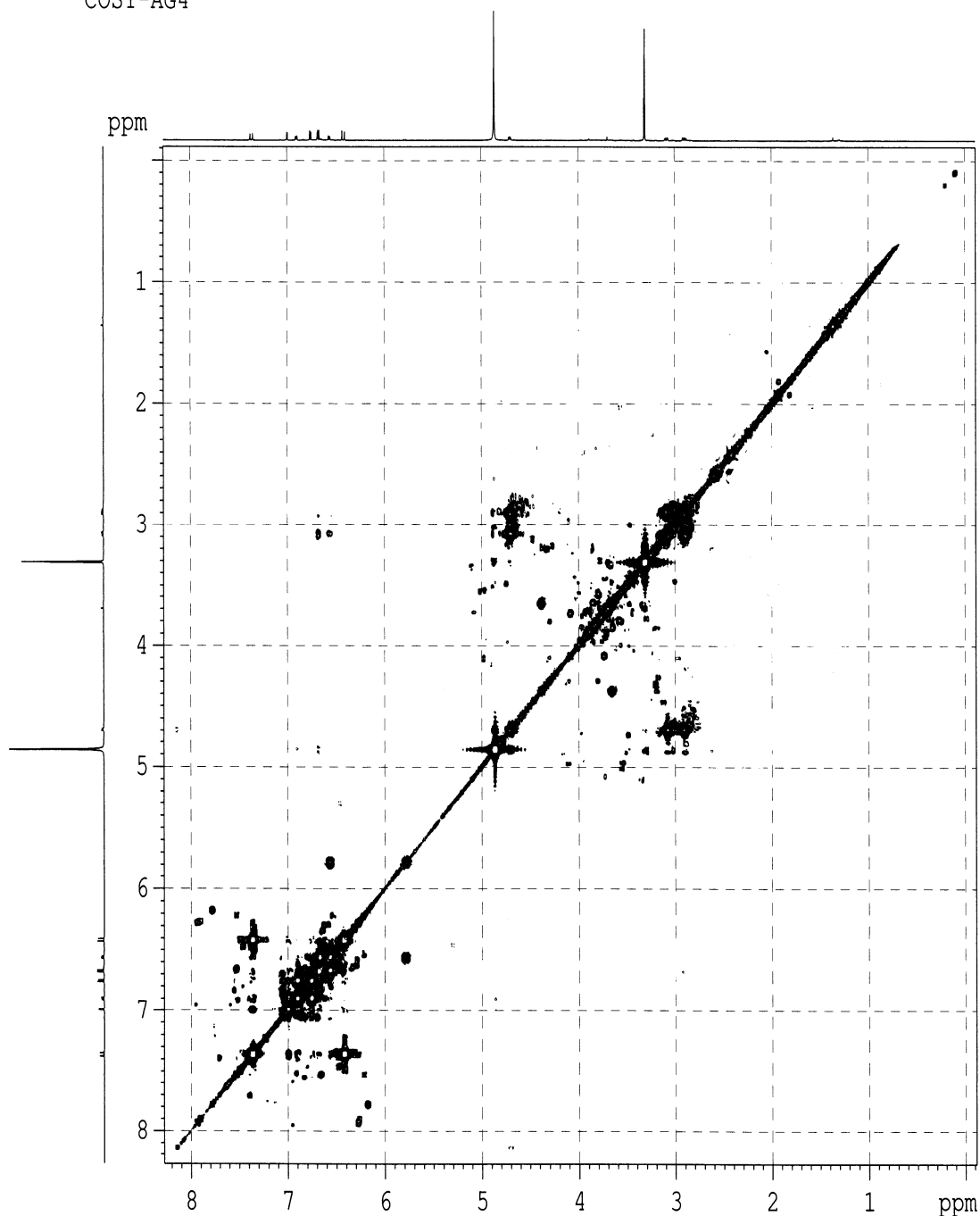


Figure 65 : Spectre de COSY¹H-¹H de AG4 (CD₃OD)

Ce spectre (figure 65) étant difficilement exploitable, nous avons réalisé trois agrandissements (figures 66, 67 et 68).

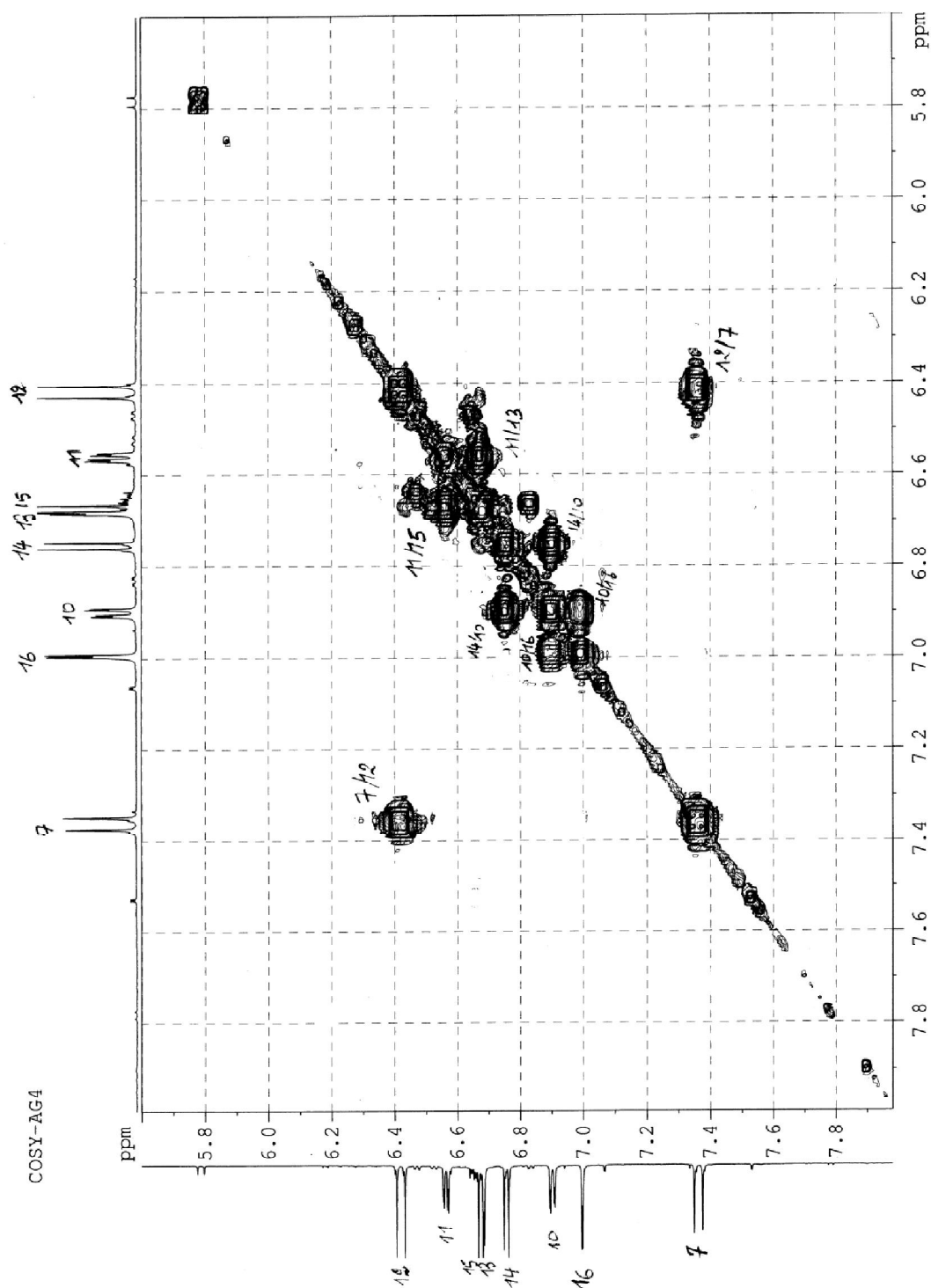


Figure 66 : Spectre COSY ^1H - ^1H de AG4 avec agrandissement de la zone des protons aromatiques.

On observe sur le spectre de AG4 (figure 66) trois groupes de protons couplés entre eux (H-7, H-12) ; (H-10, H-14, H-16) et (H-11, H-13, H-15).

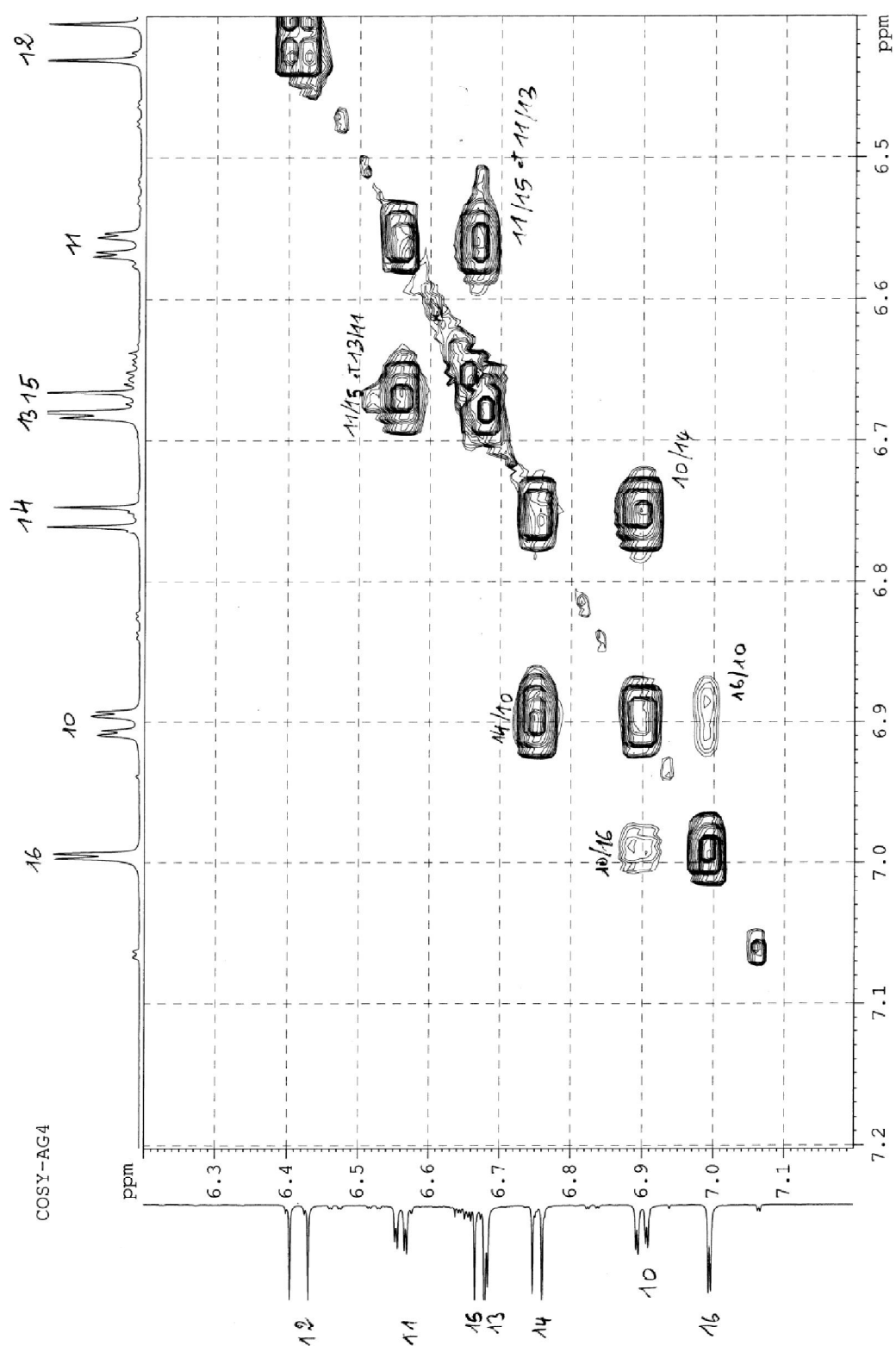


Figure 67 : Spectre COSY ^1H - ^1H de AG4 avec agrandissement de la zone 6,4 à 7, 2 ppm

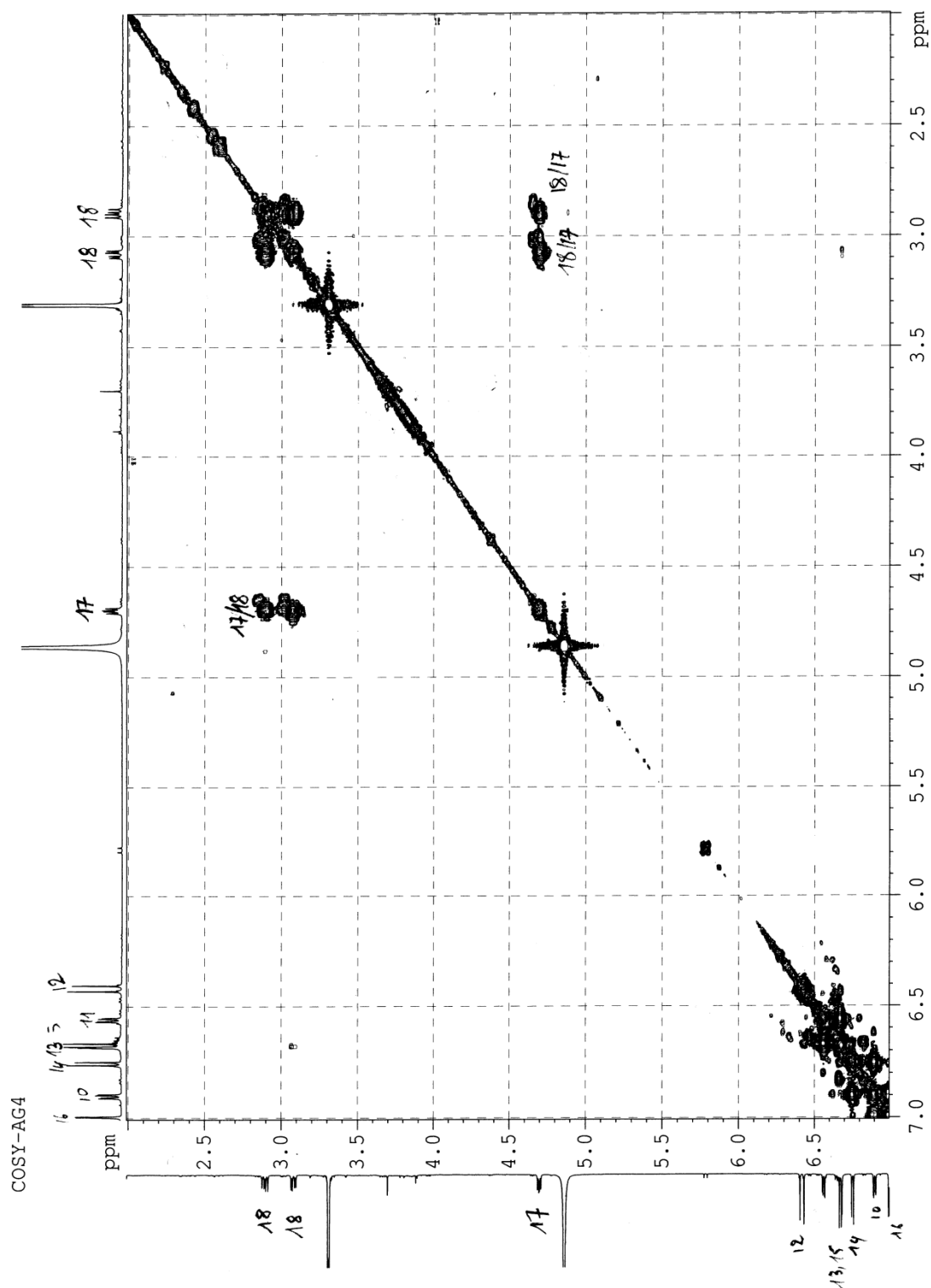


Figure 68 : Spectre COSY ^1H - ^1H de AG4 avec agrandissement de la zone aliphatique mettant en évidence le couplage entre H-17 et H-18.

Tableau XV : Corrélation HMBC (Figures (68 -73) de AG4.

C/H	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18				H
1																	2	3				
2							3					2										
3										3				2		3						
4														3		2						
5													2		3							
6													3		2							
7							1			3						3						
8																	3	2				
9							2					3		3								
10							3							2		3						
11													3		2			3				
12							2					1										
13											3							3				
14										2												
15																						
16							3			3												
17																		2				
18																	2	1				

En raison du nombre important de pics observés, l'analyse nécessite plusieurs agrandissements. Dans ce cas, le spectre a été divisé en trois sections.

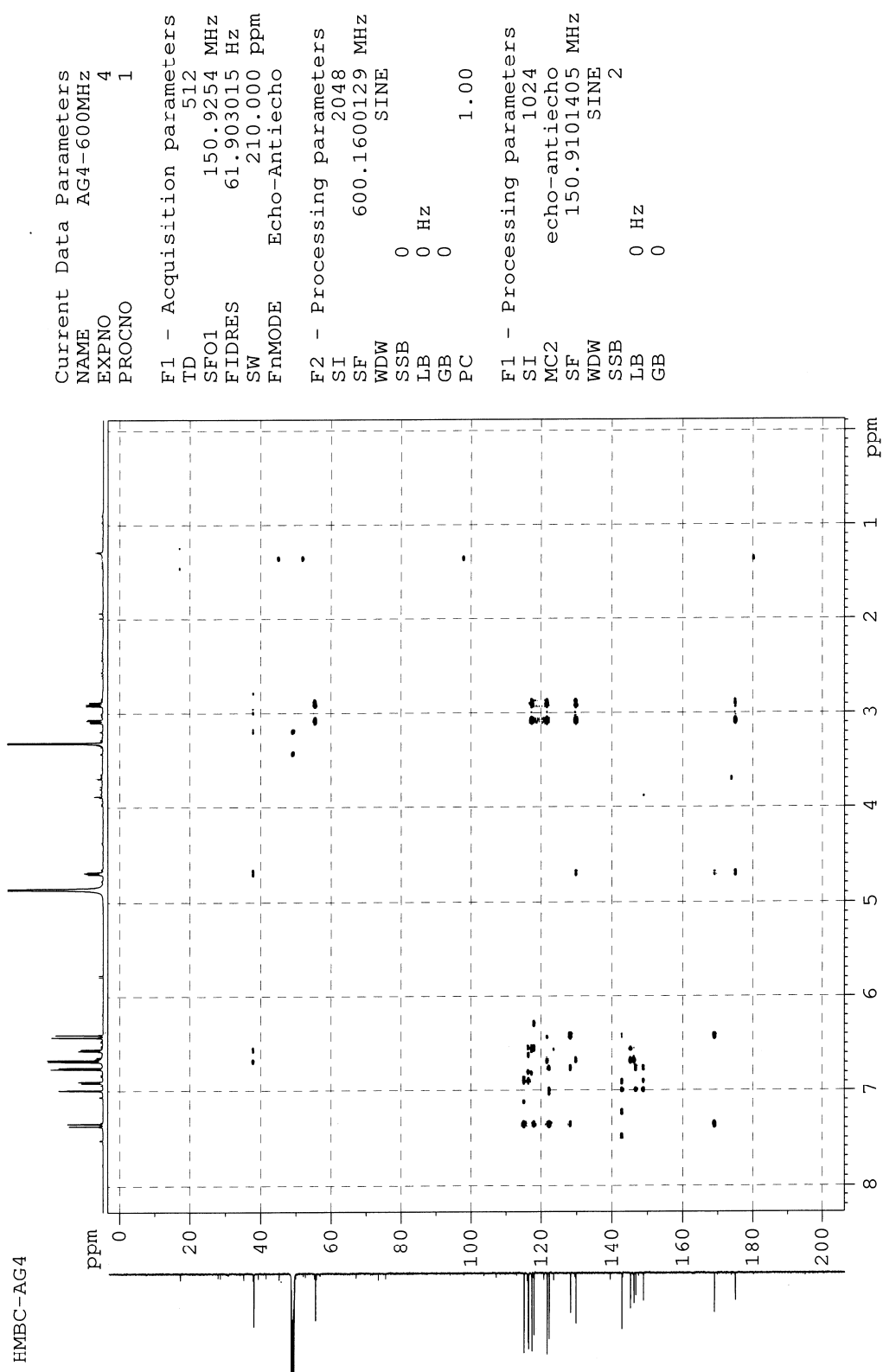


Figure 69 : Spectre HMBC de la molécule AG4

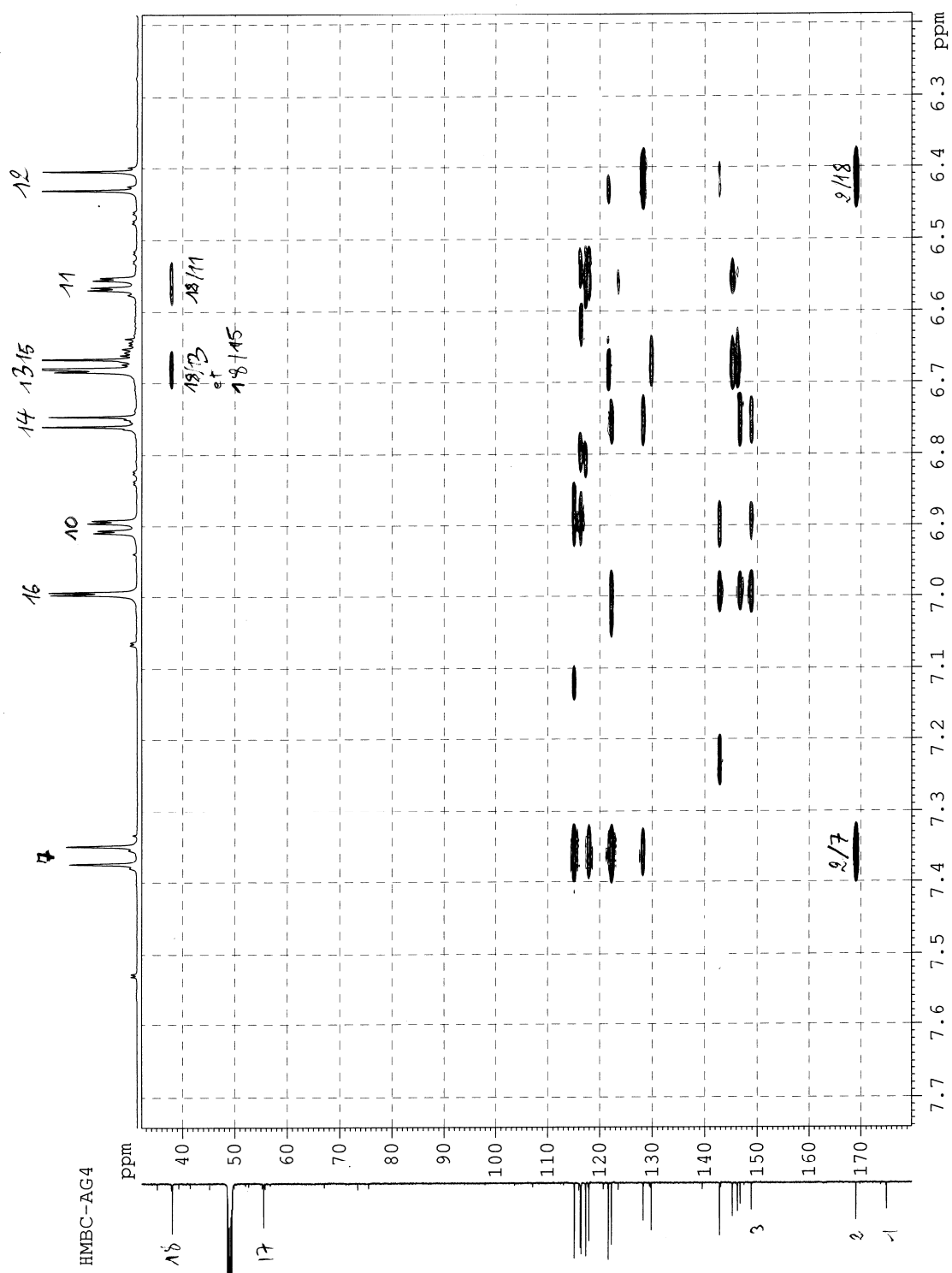


Figure 70 : Spectre HMBC de AG4 avec agrandissement de la zone aromatique

En raison de nombreux pics observés de 110 à 160 ppm, l'analyse nécessite un élargissement de cette zone.

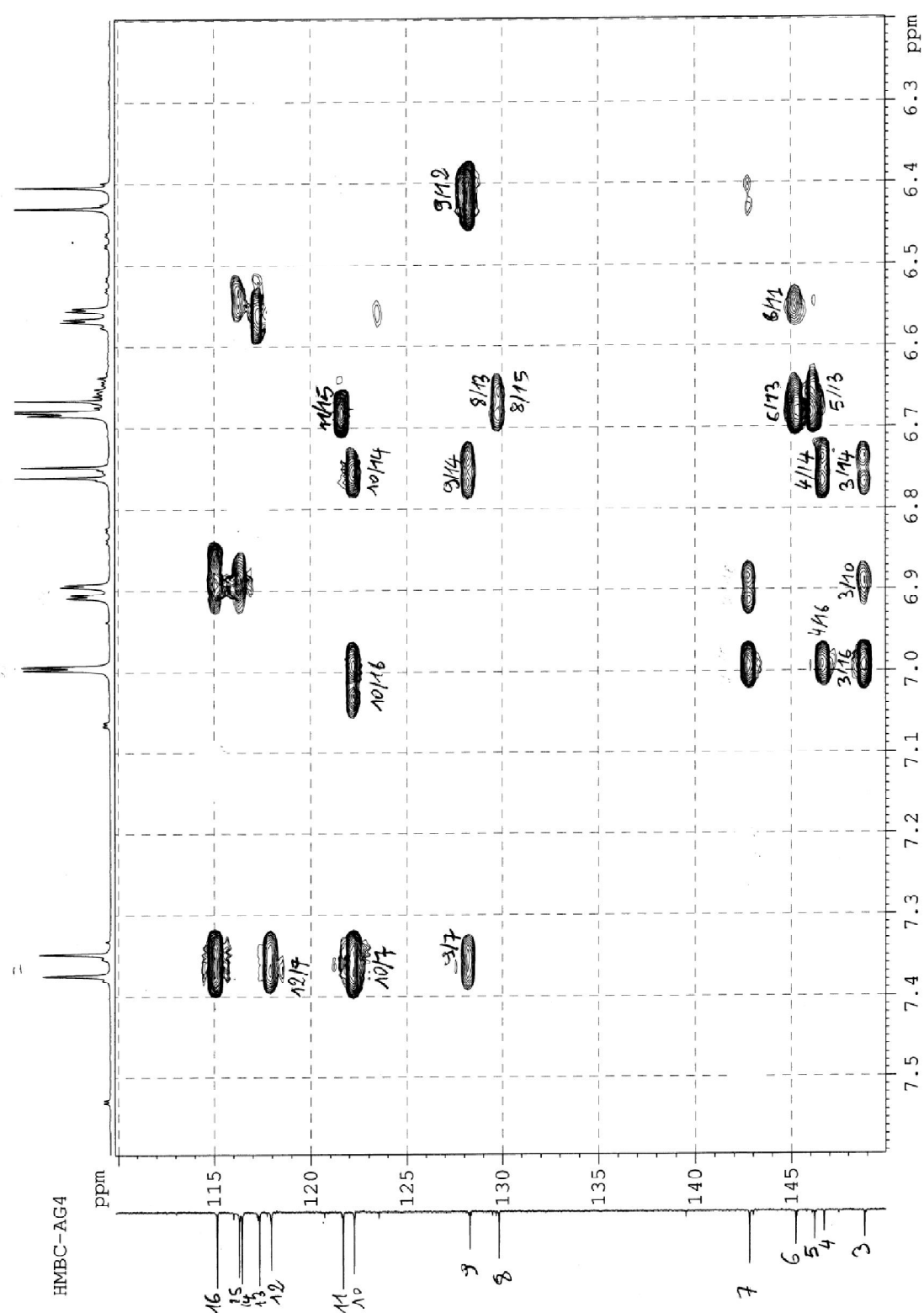


Figure 71 : Spectre HMBC de AG-4 avec agrandissement

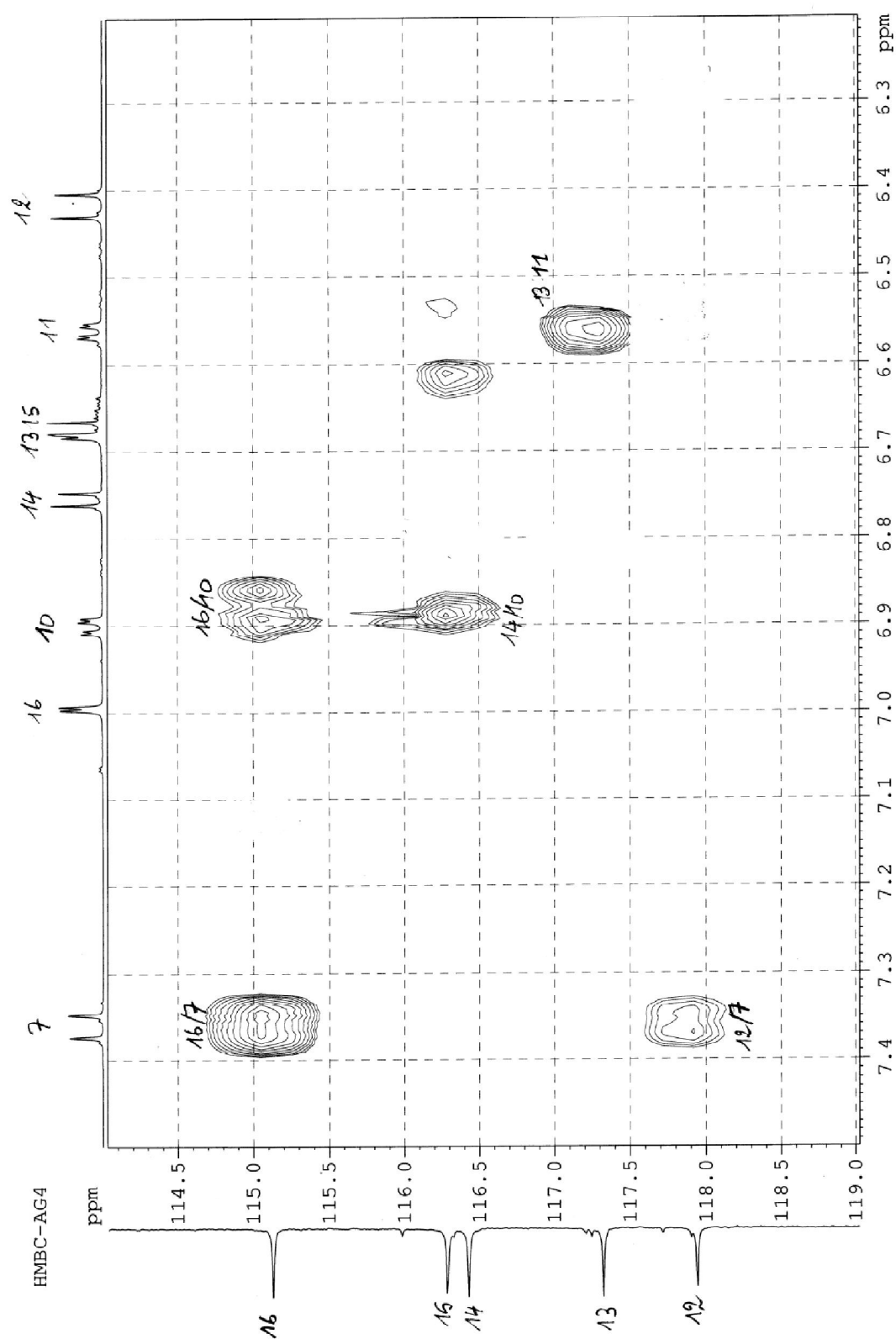


Figure 72 : Spectre HMBC de AG-4 avec élargissement de 114 à 119 ppm.

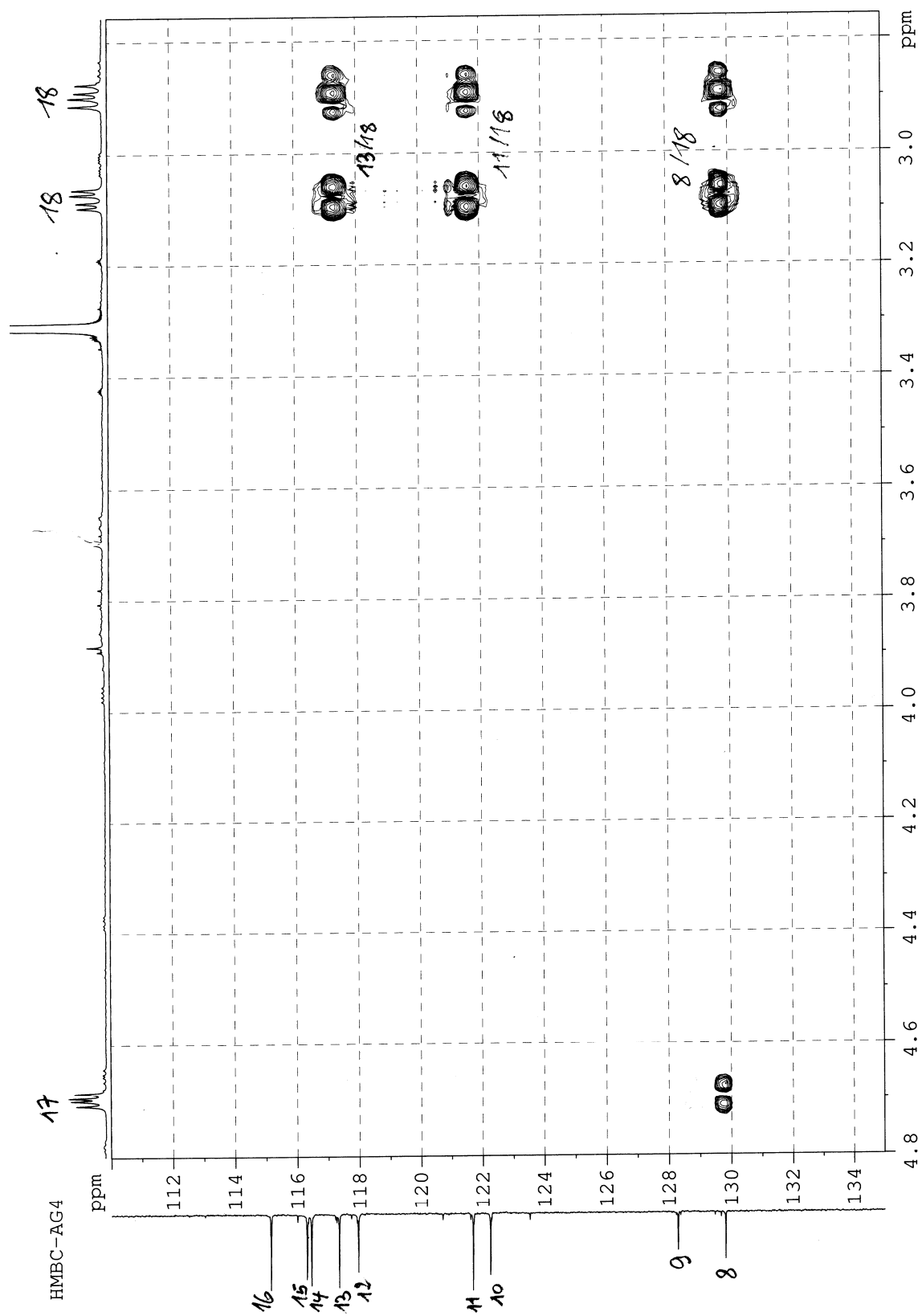


Figure 74 : Spectre HMBC de AG-4 avec élargissement de la section 114 à 134ppm

Le spectre de masse de la molécule est présenté dans la figure 75. La formule brute AG4 est : $C_{18}H_{17}O_7N$.

Le spectre infra rouge de AG4 est représenté par la figure 76.

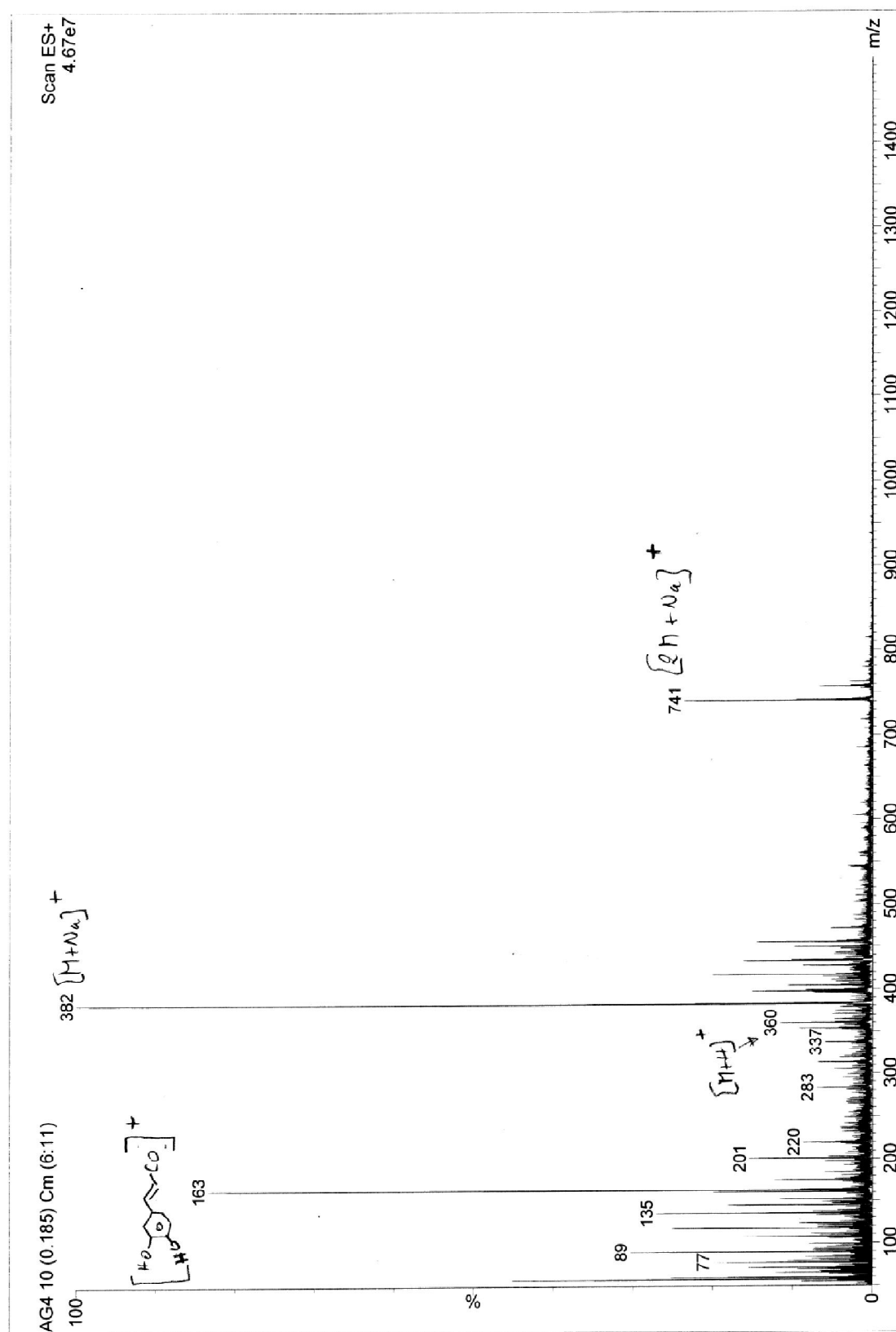


Figure 75 : Spectre de masse ESI+ de la molécule AG-4.

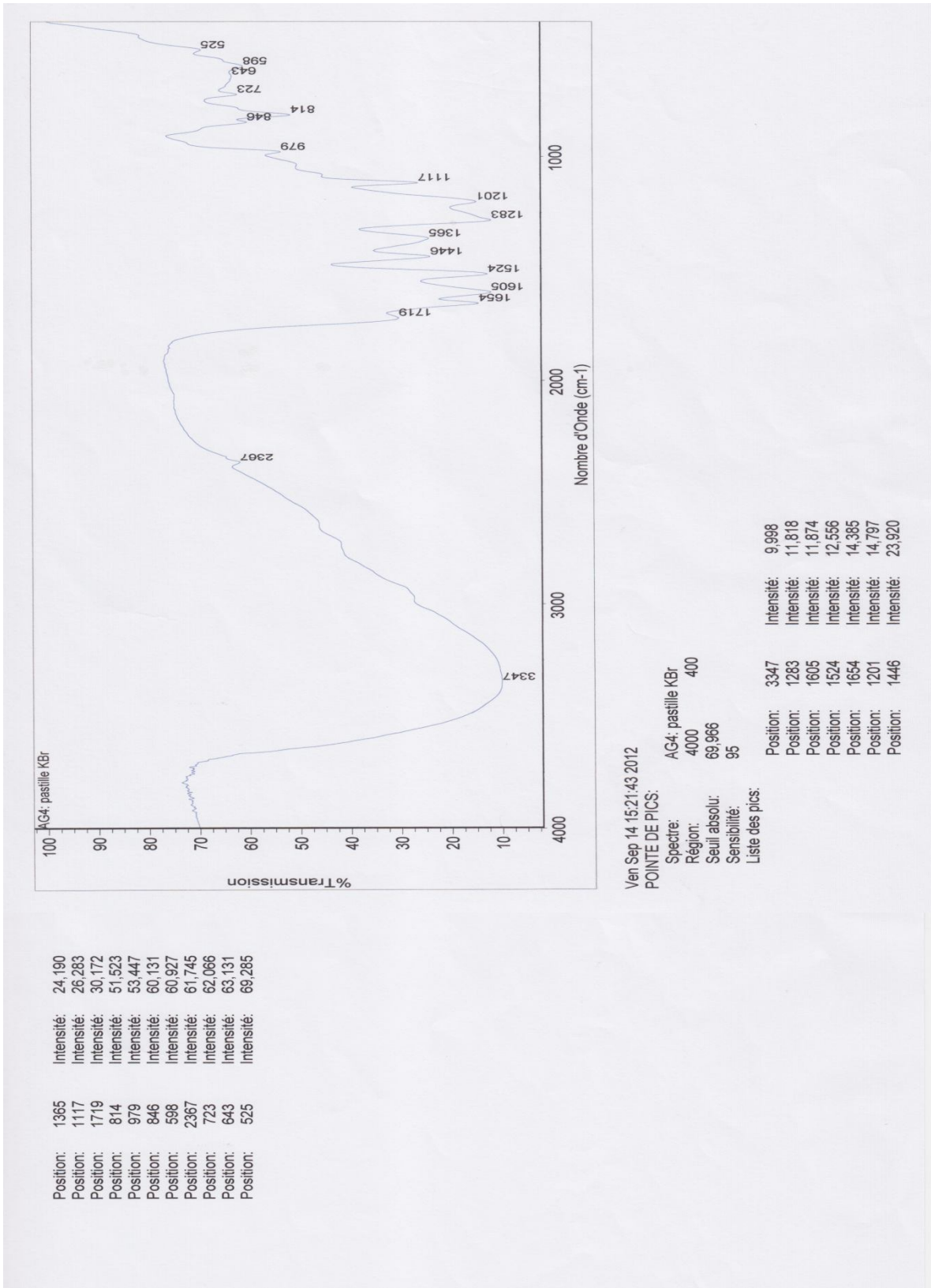


Figure 76: Spectre Infra-Rouge de AG-4

I.2.2.3. Analyse des spectres de AG-4

➤ Attribution des noyaux aromatiques

- Sur la COSY (figures 66 et 67), on repère trois groupes de protons dont ceux couplés correspondant au cycle ortho-para-trisubstitués A (3 protons, H-10, 14, 16 couplés entre eux) et B (H-11, 13, 15 couplés entre eux). Ceci est confirmé sur le spectre HMBC (Figures 70 et 71), car on observe les corrélations suivantes dans un même noyau:

Noyau A : C-10/H-16, C-10 /H-14, et C-14/H-10 ; Noyaux B : C-11/ H-13, C-11/H-15. On observe pas de corrélation des protons du noyau A avec ceux du noyau B, ainsi cela signifie que les deux protons ne sont pas dans le même cycle d'une part, et d'autre sont séparés.

- Sur le spectre de HSQC, sont attribués les 6 carbones correspondants dans la région aromatique (100 - 160). Il faut remarquer que les Hydrogènes H-7 et H-12 ne sont pas aromatiques car leur constante de couplage 3J très élevé, plus de 15 ppm est différente de celle des protons aromatiques.
- Sur le spectre de HMBC (agrandissement correspondant à la région aromatique), les carbones quaternaires sont attribués. On se base en particulier sur les corrélations suivantes (voir le tableau XIV pour plus de détail et figures 70-71):
 - o C3 (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène) : C-3/H-10(3 liaisons), C-3 /H-14 (2 liaisons), C-3/H-16 (3 liaisons).
 - o C4 (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène) : C-4/H-16 (2 liaisons), C-4/H-14(3 liaisons)
 - o C-5 (déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène) : C-5/H-13 (2 liaisons), C-5/H-15 (3 liaisons)
 - o C-6(déblindé à cause de sa substitution par l'oxygène) : C-6/H-13 (3 liaisons), C-6/H-15 (2 liaisons)
 - o C-8: C-8/H-13(2 liaisons), C-8/H-15 (3 liaisons)

- o C9: C-9/C-14 (3 liaisons)

Il faut remarque que nous n'observons pas de corrélation entre les carbones quaternaires oxygénés avec les protons phénols. Ce constat est normal car ses protons ont été échangés dans le solvant utilisé du méthanol de référence (CD₃OD).

➤ **Attribution de la chaîne aliphatique et de la double liaison**

- o On utilise les corrélations H-17/CH₂-18 (aliphatique) et H-7/H-12 (double liaison disubstituée) sur le spectre COSY (figures 66 et 68)

➤ **Chaîne aliphatique liée au cycle B et éthylénique liée au cycle A**

- o On utilise les trois corrélations C-9/H-7 (2 liaisons), C-7/H-10 (3 liaisons), et C7-H16 (3 liaisons), sur le spectre HMBC (figure 70).
- o On utilise les quatre corrélations C-8/H-17(3 liaisons), C-8/H-18 (2 liaisons), C-11/H-17 (4 liaisons), et C-13/H-18 (3 liaisons), sur le spectre HMBC (figure 73).

➤ **Attribution de la Jonction entre A-éthylénique et B- aliphatique**

A ce stade, il ne reste que l'attribution des carbones C-1 (hybridation sp², plus déblindé car carbonyle d'acide), C-2 (hybridation sp², carbonyle d'ester ou d'amide) et l'atome d'azote identifié par la masse. Pour ce faire on utilise les spectres HMBC (figures 70 et 71), ou on observe les corrélations suivantes : C-2/H-7 (3 liaisons), C-2/H-12(2 liaisons), C-2/H-17 (3 liaisons), C-1/H-17 (2 liaisons) et C-1/H-18 (3 liaisons).

Le COSY (figures 67 et 68) donne les liaisons C₁₇-C₁₈ et C₇-C₁₂; le HMBC (figures 70 et 71) relie les fragments noyau **A**-C₇-C₁₂-C₂ et **B**-C₁₈-C₁₇-C₁.

Revenons sur le spectre de masse, car grâce à elle, nous avons trouvé la formule brute de la molécule (C₁₈H₁₇O₇N) et le fragment m/z=163 correspondant à [C₆H₅O₂CH=CHCO]⁺. Le degré d'insaturation étant égale à 11, dont 8 pour les deux cycles aromatiques, 1 pour la double liaison C₇-C₁₂ et les deux restantes ne

peut être que les deux CO porté par les carbones C-1(à 174.95 ppm, CO acide ou ester) et C-2 (à 169,01ppm ; CO amide).

Sur la base de ses analyses énoncées ci-dessus, le placement de l'atome d'azote en alpha du carbone C-2 est élucidé.

➤ Stéréochimie de la double liaison et configuration du carbone C17

La stéréochimie *trans-E*- de la double liaison à été établie par le calcul de la constante de couplage $^3J = 15.72\text{Hz}$. Quant à la configuration S (-), elle est déduite par comparé avec celle décrite dans la littérature (Chiaki S. et al, 1998 ; Robolot G. et Wylde R., 1988 ; Fanier R. et al, 1980 ; Yoshihara T et al, 1977). Autrement dit par mesure du pouvoir rotatoire de la molécule isolée comparaison avec la valeur décrite dans la littérature, pour le *trans* (S, E) (-) clovamide. $[\alpha]_{\text{Dlitt}}^{18} = -30$ (C=0.5, H₂O), $[\alpha]_{\text{Dmesuré}}^{20} = -12$, (C=0,0043, H₂O).

II. Etudes pharmacologiques

II.1. Action de la FEB et de la FA sur la glycémie chez des rats normo-glycémiques

L'administration de l'eau physiologique, à la dose de 10 ml/kg per os, n'entraîne pas une modification de la glycémie de base chez les rats normo-glycémiques au bout de 4 heures d'observation. En effet, la glycémie varie entre $0,87 \pm 0,08$ vs $0,77 \pm 0,04$ g/l (ns, n = 5). A l'inverse, l'administration de la FEB à la dose de 150 mg/kg per os, entraîne une hypoglycémie au bout d'1 heure avec une glycémie qui varie entre $0,57 \pm 0,03$ vs $0,68 \pm 0,03$ g/l (p < 0,05, n = 5), suivie d'un retour progressif de la glycémie vers les valeurs de base au bout de 4 h ($0,74 \pm 0,06$ vs $0,68 \pm 0,03$ g/l). A une dose plus élevée, la FEB (300 mg/kg, per os) est hyperglycémiant ($1,30 \pm 0,17$ vs $0,88 \pm 0,03$ g/l). Des résultats similaires ont été observés avec la fraction aqueuse (FA) à la dose de 300 mg/kg per os. (Figure 77)

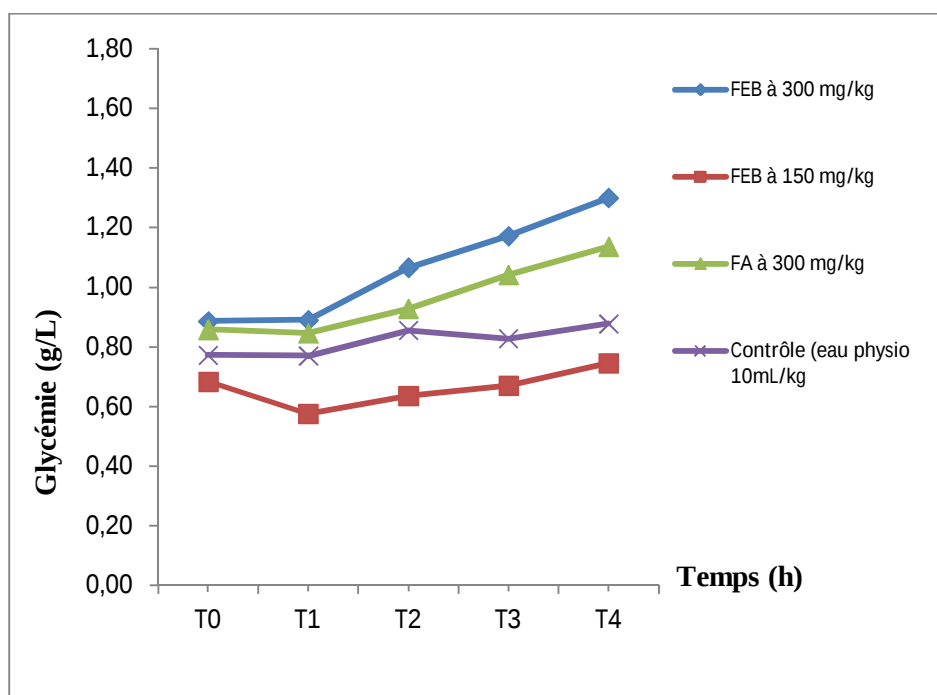


Figure 77 : Variations de la glycémie chez des rats normo-glycémiques après administration de la FEB et de la FA de feuilles de *Ipacina oliviformis*.

II.2. Action de la FEB et de la FAEM chez des rats soumis à un test de tolérance au glucose

Un prétraitement par la FEB, à la dose de 150 mg/kg per os prévient de façon significative le pic hyper-glycémique observé lors du test de tolérance au glucose. En effet, dans le groupe contrôle, la variation du pic d'hyperglycémie est de $2,88 \pm 0,26$ vs $0,81 \pm 0,06$ g/l. Cette variation n'est que de $2,01 \pm 0,22$ vs $0,74 \pm 0,04$ g/l après prétraitement par la FEB. La FAEM, à dose de 150 mg/kg per os, est anti-hyperglycémiant. La variation de la glycémie est de $1,90 \pm 0,09$ vs $0,93 \pm 0,05$ g/l (Figure 78).

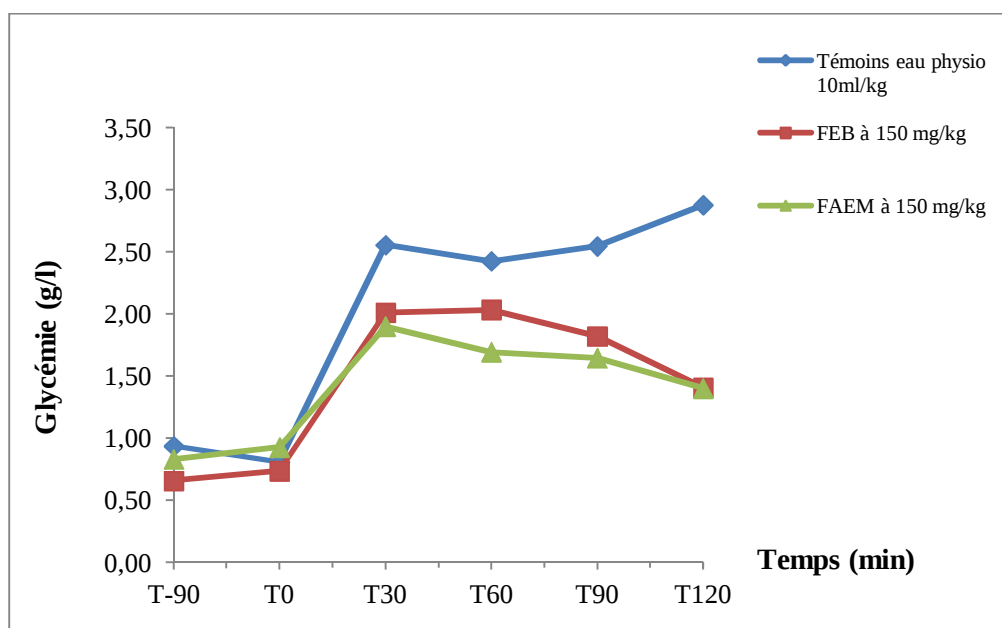


Figure 78 : Variations de la glycémie chez des rats soumis à un test de tolérance au glucose après administration de la FEB et de la FAEM de feuilles de *Icacina oliviformis*.

II.3. Action de la FEB et de la FAEM chez des rats diabétiques de type2

Dans le groupe contrôle, l'administration quotidienne de l'eau physiologique ne modifie pas l'hyperglycémie permanente des rats diabétiques de type 2 avec une glycémie qui varie au bout de 8 jours entre $3,27 \pm 0,06$ vs $2,82 \pm 0,09$ g/l ($p < 0,05$, $n = 5$). Par contre, le glibenclamide (0,3 mg/kg/j per os) entraîne une baisse significative de la glycémie ; il est anti-hyperglycémiant chez des rats diabétiques de type 2. La variation de la glycémie est de $0,99 \pm 0,04$ vs $2,94 \pm 0,06$ g/l ($p < 0,05$, $n = 5$).

L'administration quotidienne de la FAEM est anti-hyperglycémiante de façon dépendante à la dose. En effet, à la dose de 150 mg/kg/j per os, la glycémie varie de $2,81 \pm 0,08$ à $1,34 \pm 0,02$ g/L au bout de 8 jours. A une dose plus élevée (300 mg/kg/j per os), la glycémie varie de $2,79 \pm 0,05$ à $1,06 \pm 0,11$ g/L (Figure 79)

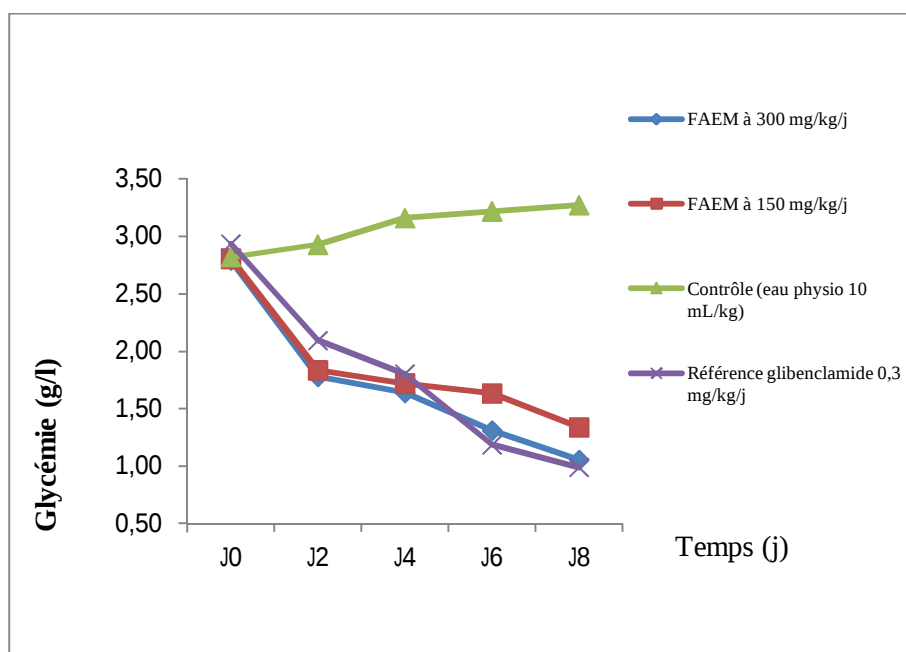


Figure 79 : Variations de la glycémie chez des rats diabétiques de type 2 après administration quotidienne du glibenclamide et de la FAEM.

II.4. Discussion

Des travaux antérieurs réalisés sur l'effet sur le glucose sanguin d'extraits de *Isacina oliviformis* ont montré un effet hypoglycémiant de l'extrait éthanolique de feuilles de cette plante. Toutefois, l'hypoglycémie de l'extrait éthanolique observée dans cette étude est transitoire avec un retour progressif de la glycémie vers des valeurs de base (Ndiaye et al, 2008).

Le but de la présente étude était de fractionner les composés de feuilles de *Isacina oliviformis* et de tester les fractions obtenues sur divers modèles d'étude de la glycémie. Chez les rats normo-glycémiques, la fraction éthanolique brute (FEB) de feuilles de *Isacina oliviformis* est hypoglycémiante une heure après administration avec toutefois un retour de la glycémie vers la ligne de base au bout de 4 heures d'observation. Ces résultats montrent un effet sur le glucose identique entre l'extrait total éthanolique des travaux antérieurs de Ndiaye et la FEB de la présente étude.

L'effet hypoglycémiant de molécules insulino-sécrétrices comme le glibenclamide met en jeu la sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques

(Davis et Granner, 1996). L'hypoglycémie observée avec des extraits de feuilles de *Ikacina oliviformis* en administration aiguë à dose unique pourrait être liée à la libération d'insuline chez les rats normo-glycémiques.

Dans une autre série d'expériences, la FEB et la fraction acétate d'éthyle méthanol (FAEM) ont été testés sur un modèle d'hyperglycémie temporaire. En effet, sur un test de tolérance au glucose, la FEB et la FAEM sont anti-hyperglycémiantes avec une meilleure efficacité pour la FAEM. En effet, au temps T60 min après administration du glucose, l'effet anti-hyperglycémiant de la FAEM est significativement plus important que celui de la FEB.

Pour confirmer le profil anti-hyperglycémiant des composés de feuilles de *Ikacina oliviformis*, la FAEM a été testée en administration chronique chez des rats diabétiques de type 2, sensibles à l'action du glibenclamide. Comme pour le glibenclamide, la FAEM entraîne un effet anti-hyperglycémiant chez des rats diabétiques de type 2 dont l'hyperglycémie est permanente. L'amplitude de l'effet anti-hyperglycémiant de la FAEM est identique à celle du glibenclamide. L'effet sur le glucose sanguin du glibenclamide met en jeu la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques (Davis et Granner D, 1996).

Au plan phytochimique, une caractérisation préliminaire a montré la présence de flavonoïdes dans la FEB et la FAEM, avec une plus forte teneur dans la FAEM (cf. partie étude chimique).

Plusieurs études ont décrit l'effet sur le glucose sanguin d'extraits de plantes riches en flavonoïdes. En effet, la fraction d'acétate d'éthyle de *E. alatus* riche en flavonoïdes aurait des propriétés stimulantes sur la libération d'insuline (Fang et Coll, 2008). En outre, l'administration de l'extrait butanolique contenant des flavonoïdes de *Ranunculus repens L*, aurait provoqué un effet hypoglycémiant significatif chez des animaux diabétiques. Ces flavonoïdes auraient stimulé les cellules β et entraîné la sécrétion de l'insuline (Kebieche, 2009). Il en n'est de même de l'effet anti-hyperglycémiant d'un flavonol dérivé

de fleurs de *Hibiscus vitifolius* Linn, sur un test de tolérance au glucose (Ragunathan et Sulochana, 1994).

L'effet anti-hyperglycémiant de la FAEM sur un test de tolérance au glucose et chez des rats diabétiques de type 2, pourrait être lié à la présence de flavonoïdes dans cette fraction.

Conclusion partielle

L'étude chimique de la fraction acétate d'éthyle /méthanol (FAEM) de feuilles de *Isacina oliviformis* a permis d'isoler trois molécules et de déterminer les structures correspondantes par les méthodes spectroscopiques (RMN et masse). Il s'agit de deux nouveaux flavonoïdes C-glycosylé AG2 (flavone 6- β -C-glycoside) et AG3 (flavone 8- β -C-glycoside) non connue des bases de données [cf.SciFinder, Reaxys, Dictionary of natural product (DNP)] et le trans (S, E)-(-)-Clovamide AG4 connue de la littérature.

Sur le plan pharmacologique l'étude a montré que la fraction éthanolique brute de feuilles de *Isacina oliviformis* (FEB) est hypoglycémiant chez des rats normo-glycémiques. Le fractionnement de la FEB a donné une fraction acétate d'éthyle méthanol (FAEM) intéressante. Ainsi, l'effet anti-hyperglycémiant obtenue chez des rats soumis à un test de tolérance au glucose a montré une meilleure efficacité pour la FAEM par rapport à la FEB. Comme pour le glibenclamide, la FAEM a entraîné un effet anti-hyperglycémiant chez des rats diabétiques de type 2 dont l'hyperglycémie est permanente. Au plan phytochimique, la caractérisation a montré la présence de flavonoïdes et de tanins dans la FEB et la FAEM. Or, de nombreuses études ont déjà montré l'activité des flavonoïdes sur le glucose sanguin. Ce qui nous permet de penser que se sont les flavonoïdes de notre fraction qui pourront être responsables de cet effet anti-hyperglycémiant. C'est à partir de cette fraction FAEM qui a montré une activité intéressante que les molécules AG2, AG3 et AG4 ont été isolées et Identifiées.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Toujours considérée comme envahissante, *Icacina oliviformis* est menacée dans son milieu naturel par des coupes fréquentes et les feux occasionnés par les agriculteurs. Mais c'est une espèce à la fois utile à l'environnement et la médecine.

Le travail que nous avons entrepris, dans le cadre d'une étude chimique et pharmacologique, avait pour but la valorisation scientifique des recettes de *Icacina oliviformis* par l'isolation de substances actives pouvant servir de modèles de synthèses complètes afin de contribuer à la conservation de l'espèce et à la protection de l'environnement.

Ainsi, au plan phytochimique, une caractérisation effectuée sur les fractions éthanolique brute (FEB) et acétate d'éthyle /méthanol (FAEM) a montré une présence de flavonoïdes avec une plus forte teneur dans la FAEM. De même la présence de tanins est notée dans ces deux fractions.

La purification de la FAEM a permis d'isoler deux nouveaux flavonoïdes C-glycosylés AG2 et AG3 non connue de la littérature (SciFinder, Reaxys, Dictionary of naturalproduct (DNP) (Norbaek et al, 2003 ; Shaheen et al, 2000) et le trans (S,E)-(-)-Clovamide déjà connue.

La deuxième partie du travail a consisté de vérifier les propriétés de la plante sur son activité anti-hyperglycémiant.

Dans une autre série d'expériences, la FEB et la fraction acétate d'éthyle méthanol (FAEM) ont été testés sur un modèle d'hyperglycémie temporaire. En effet, sur un test de tolérance au glucose, la FEB et la FAEM sont anti-hyperglycémiantes avec une meilleure efficacité pour la FAEM.

Pour confirmer le profil anti-hyperglycémiant des composés de feuilles d'*Icacina oliviformis*, la FAEM a été testée en administration chronique chez des rats diabétiques de type 2, sensibles à l'action du glibenclamide.

En effet, la FAEM est anti-hyperglycémiant sur un test de tolérance au glucose et chez des rats diabétiques de type 2. Ces résultats pourraient justifier

l'utilisation des feuilles de *Ipomoea oliviformis* en milieu traditionnel pour traiter le diabète de type 2.

Ces dernières années, l'intérêt du monde scientifique et grand public au sujet des flavones s'est accru du fait de leur supposés effets bénéfiques contre l'artériosclérose, l'ostéoporose, le diabète et certains cancers (Cermak, 2008). Les études actuelles sur la prise de flavones et d'autres extraits de plantes en compléments alimentaires se multiplient. Les flavones ont un effet sur l'activité des CYP (Cermak et al 2006), enzymes métabolisant la plupart des médicaments dans le corps. Plusieurs études ont décrit l'effet sur le glucose sanguin d'extraits de plantes riches en flavonoïdes. Ces flavonoïdes auraient des propriétés stimulantes sur la libération d'insuline donc anti-hyperglycémiant (Fang et Coll, 2008; Ragunathan et Gulochana, 1994).

Dans la même logique, nous pouvons penser que l'effet anti-hyperglycémiant de la FAEM sur un test de tolérance au glucose et chez des rats diabétiques de type 2, pourrait être lié à la présence de flavonoïdes dans cette fraction.

Les résultats ainsi obtenus sont intéressants et ouvrent comme perspectives la formulation de phytomédicaments antidiabétique à partir des feuilles de *Ipomoea oliviformis*. Mais ceci nécessite encore plus d'investigations sur le plan chimique et pharmacologique. En effet, des tests d'activités antidiabétiques seront réalisés sur ses nouveaux flavones C-Glycosides pour mettre en évidence leur responsabilité éventuelle dans l'activité anti-diabétique. Ainsi, une synthèse de nouvelles molécules antidiabétiques, à l'image de ces dernières, sera envisagée pour protéger cette plante contre toute agression.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Adams J.G., 1957:** Eléments pour l'étude de la végétation des hauts plateaux du Fouta Djallon. Gouvernement Gén. de l'Afrique Occidentale Française, Dakar.
2. **Ahmad Mushtaq., AKHTAR Shoaib M., MALIK Tahira., GILANI Anwar H., 2000:** Hypoglycemic action of the flavonoid fraction of *Cuminum nigrum* seeds, phytotherapy research, vol 14, pp 103-106.
3. **Akoegnion A., Van der Berg W.J., Van Der Maesen L.J.G., Adjakidje V., Essou J.P., Sinsin B., Yédomonhan H., 2006 :** Flore analytique du Bénin. 592-593 pp.
4. **Al-Achi A., 2005.** Herbs that affect blood glucose levels. Women's Health in primary care. 8 (7): 325-330.
5. **Ammon H.P., Hagele R., Youssif N., 1983.** A possible role of intercellular and membrane thiols of rat pancreatic islets in calcium uptake and insulin release. Endocrinology, 112: 720-726.
6. **Andrews F.W., 1952:** The flowering plants of Anglo-Egyptian. Sudan. Vol 2. (Sterculiaceae- Dipsacaceae), 485 pp.
7. **Ansah T et Aboagye C., 2011 :** False yam (*Ipomoea pes-caprae*) leaf meal as an ingredient in the diet of weaner rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) to improve blood profile. Online Journal of Animal and feed Research 1, 135-138.
8. **Asuzu I.U., Abubakar I.I, 1995:** The effects of *Ipomoea trichantha* tuber extract on the nervous system. Phytotherapy Research 9, 21-25.

9. **Asuzu I.U., Ugwueze E.E., 1990:** Screening of *Icacina trichantha* extracts of pharmacological activity. *Journal of Ethnopharmacology* 28, 151-156.

10. **Augusti K.T., 1975:** Gas chromatography analysis of onion principles and study of their hypoglycaemic action. *Indian J. Exp. Biol.* 14 (2) pp 110-112.

11. **Augusti K.T., and Benaim M.E., 1975:** Effect of essential oil of onion (allyl propyl disulfide) on blood glucose, free fatty acid and insulin level of normal subjects. *Clin. Chim. Acta*, 60; pp 121-123.

12. **Barrier P et Osinki C., 2001 :** Comment vit-on avec le diabète? Edition Frison, Roche, 2001, 190 p.

13. **Bassène E., 2012:** Initiation à la recherche sur les substances naturelles. Extraction, analyse et essais biologiques. Presse universitaire de Dakar, 150p.

14. **Baudon A., 1913:** Extract of letter to A. Chevalier (17 February 1913). In *Extraits des procès-verbaux des séances des sections, VI^e section. Colonisation, séance du 21 Avril 1913. Bull. Soc. Natl. Acclim. France* 60 : 397-398.

15. **Baumer, 1995 :** Arbres, arbustes et arbrisseaux nourriciers en Afrique occidentale. Enda-Editions. Séries Etudes et Recherches n° 168-169-1770, 114 pp.

16. **Berhaut J, 1975** : Flore illustrée du Sénégal. Dicotylédones, Ficoidées à Légumineuses, Tome III, Préface de M. Léopold Sédar Senghor Président de la république du Sénégal, pp128-131

17. **Berhaut J, 1975** : Flore illustrée du Sénégal. Dicotylédones, Connaracées à Euphorbiacées, Tome III, Préface de M. Léopold Sédar Senghor Président de la république du Sénégal, pp 402 – 404.

18. **Berhaut J., 1967** : Flore illustrée du Sénégal. 2^e édition plus complète avec les forêts humides de la Casamance. Edition Clairafrique Dakar, pp 334-335.

19. **Boutique 1960** : Flore du Congo Belge et du Ruanda-Burundi. Vol. IX. Institut Nat. pour l'Etude Argon. Congo Belge, Bruxelles.

20. **Boutique R., 1956** : Icacinaceae novae Congolanae. Bull. Jard. Bot. Etat 26: 345-348.

21. **Bravo L., 1998**. Polyphenols : chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. Nutur, Review (56) 317-333.

22. **Brunet S., 2008** : Analyse des mécanismes d'actions antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestif des ruminants. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse, 246p.

23. **Bruneton J., 1993**. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Lavoisier Tec et Doc. Paris 2^{èm} édition, 915 p.

24. **Bruneton J., 1999.** Tannins : Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, Lavoisier Tec et Doc. Paris 5^e édition, pp 369-404.
25. **Burkill H.M., 1985:** The useful plants of west tropical Africa. Royal Botanic Gardens Kew
26. **Burt-Davy J., and Hoyle A.C., 1937:** Draft of first descriptive list of the Gold Coast. Imp. For. Inst., Oxford.
27. **Buysschaert M., 2001 :** Diabétologie clinique. Edition De Boeck, Université Bruxelles, 190 p.
28. **Cadet J., Bellon S., Berger M., Bourdat A.G., Douki T., Duarte V., Frelon S., Gasparutto D., Huller E., Ravanat J.L., Sauvaigo S., 2002.** Recent aspects of oxidative DNA damage : guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. Biol. Chem, 383 (6), 93-100.
29. **Campagna A. F., 2003 :** L'apparition du diabète de type 2 chez l'enfant et ses implications en santé publique, Flammarion médecine sciences — journées de diabétologie 2003, 76 p
30. **Cerighelli M.R., 1919 :** La farine des graines et la fécule des tubercules de l'Icacina senegalensis. Ann. Inst. Bot. Géol. Colon. Marseille 3 : 169-178.
31. **Cermak R, Wolfram S.** Curr Drug Metab 2006, 7(7), 729-44.
32. **Cermak R.** Expert Opin Drug MetabToxicol, 2008, 4 (1), p. 17–35

33. **Chevalier A., 1913 :** Etude sur la flore de l'Afrique centrale française (bassins de l'Oubangui et du Chari). Mission Char-lac Tchad. Challamel, Paris, 1902-1904.

34. **Chevalier A., 1935 :** Les îles du Cap Vert : Flore de l'Archipel. Revue Internationale de Botanique Appliqué et d'Agriculture Tropicale 15 : 733-1099.

35. **Chiaki Sanbongi, Naomi Osakabe, Midori Natsume, Toshio Takizawa, Shuichi Gomi, and Toshihiko Osawa.** J. Agrc. Food Chem. 1998, 46, 454-457.

36. **Clayden J., Greeves N., Warren S., Wothers P., 2003.** Chimie organique. Edition De Boeck Université, Bruxelles, Belgique, 1508p.

37. **CTA, 2007 :** Les plantes médicinales, fiche technique programme radio rurale N° 07/3, 35p <http://www.cta.int>

38. **Dalziel J.M., 1937:** *icacina trichantha* Oliv. Family Icacinaceae: The useful plants of west Tropical Africa. London: Crown Agent Press; 291p.

39. **Dalziel J.M., 1947:** The useful plants of West Africa. London: The crown agents for the Colonies.

40. **Davis SN, Granner DK.** Insulin, oral hypoglycemic agents and the pharmacology of the endocrine pancreas Insulin, oral hypoglycemic agents and the pharmacology of the endocrine pancreas. In: S. Googman L, Gilman AG. (Eds), *The Basic Pharmacology of Therapeutics*, 6th Ed Mc Milan, New York, 1996.

41. **De whalley C.V., Rankin S.M., Hoult J.R.S., Jessup W., Leake D.S., 1990.** Flavonoids in hit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 39 (11) : 1743-1750.

42. **De Wildeman E., 1911 :** Etudes sur la flore des districts des Bangala et de l'Ubangi. Misch and Thron, Bruxelles.

43. **Dei H.K., Bacho A, Adeti J., Rose S.P., 2011:** Nutritive value of false yam (*Ipomoea pes-caprae*) tuber meal for broiler chickens. *Poultry Science* 90, 1239-1244.

44. **Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefort R.D., 2005.** Radicaux libres et stress oxydant : aspect biologiques et pathologiques. Lavoisier Edition Tec et Doc éditions médicales internationales, Paris, 1- 405.

45. **Dey Lucey M.D., Anoja S., Attele D.D.S., Chun-Su Yuan M.D., 2002.** Alternative therapies for type 2 diabètes. *Alternative medecine review.* 7 (1) : 45-58.

46. **Diouk K., 1991 :** Contribution à l'étude de la toxicité et de l'action hypoglycémiant d'une plante de la pharmacopée africaine : *Terminalia macroptera* Guill et Perr (Combretacées). Thèse Pharmacie, Dakar, n° 61.

47. **Eddouks M., Ouahidi M.L., Farid O., Moufid A., Khalidi A., Lomhadri A., 2007.** L'utilisation des plantse médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothérapie*, (5) 194-203.

48. **Education plantes contre le paludisme, 2004 :** source a360.org, consulté le 20/03/2009, www.a360.org/article.php?id_article=34, 6 pages.

49. **Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G., 1992.** The role of lipid peroxydation and antioxidant in oxidative modification of LDL, Free Rad. Biol. Med, 13: 341-349.

50. **Fall A.D., 2012 :** Etudes chimiques et pharmacologiques des racines de *Cassia Siebetiana* DC (Caesalpiniaceae). Thèse de doctorat de Pharmacognosie, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, 156 p.

51. **Fang XK, Gao Y, Yang HY, Lang SM, Wang QJ, Yu BY, Zhu DN.** Alleviating effects of active fraction of *Euonymus alatus* abundant in flavonoids on diabetic mice. Am J Chin Med. 2008 ; 36 (1) :125-140.

52. **Fanier R. Van Heerden, E. Vincent Brandt and David G. Roux,** *Phytochemistry*, 1980, 19, 2125-2129.

53. **Farnsworth., 1961 :** The pharmacology of the periwinkles : *Catharanthus roseus*. 24, pp. 105-138.

54. **Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo ZG.** Medicinal plants in therapy. Bul. World Health Org. 1985; 63 (6): 965-981.

55. **Fay J.M., 1987:** *Ipacina oliviformis* (Ipacinaceae): A close look at an underexploited crop I. Overview and ethnobotany. Economic Botany 41 (4), pp. 512-522.

56. **Fay J.M., 1991:** *Ipacina oliviformis* (Ipacinaceae): A close look at an underexploited food plant. II. Analyses of food products. Economic Botany, 45 (1), pp.16-26.

57. **Fay J.M., 1993 :** *Icacina oliviformis* (Icacinaceae) : A close look at an underexploited food plant. III. Ecology and production. Econ. Bot. 47: 163-170.
58. **Fontbonne A., Simon D.** Epidémiologie du diabète. Encyd Med Chir Editions Scientifiques et médicales Elsevier SAS, Paris, Endocrinologie-Nutrition, 10-366-B, 2001, 9p.
59. **Ganong W.F.** Physiologie médicale. Masson Ed. Paris 1977, 665p.
60. **Gardes-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedenzadeh Z et Jore D., 2003 :** Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? Mécanismes biochimiques. L'actualité chimique, novembre-décembre 2003, pp 91-95
61. **Giono-Barber P., 1971 :** Contribution à l'étude des antihypertenseurs. Thèse doctorat d'état pharmacie, Dakar, n° 6.
62. **Goudable J., Favier A., 1997.** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. Nutr Clin Mdtabal, 11 : 115-120.
63. **Grankvist K., Marklund S.L., Taljedal I.B., 1981.** CuZn – superoxide dismutase, Mn – superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. Biochem. J, 199: 393-398.
64. **Grimaldi A., Cornet P., Massebeuf N.** Guide pratique du diabète, Edition Masson. Paris 2001 : 1-415

65. **Grimaldi A., Heurtier A. H., 2000 :** Diabète insulino-dépendant-
Etiologie, physiopathologie, diagnostic, complications, Traitement, 12p.
66. **Gueye M., 1973 :** Contribution à l'étude pharmacodynamique d'une plante
antidiabétique (*Sclerocarya birrea*). Thèse Pharm. Dakar.
67. **Guillemin J.A., Perrottet S., and Richard A., 1830:** Florae senegambiae
tentamen, tomus primus. Apud Treuttel et Wurtz, Paris.
68. **Hagerman A.E., 2002.** Tannin chemistry
(www.users.muohio.edu/hagermae)
69. **Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1999.** Free radicals in biology and
medicine. 3th Ed Oxford. Clarendone press, 22 p.
70. **Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 2007.** Free radicals in biology and
Médecine 4th Ed Oxford. Clarendone press, 20-31.
71. **Hammouda Y., Plat M., and Lemen J., 1963:** Un nouvel alcaloïde de
Tecoma stans : la técostamine. Ann. Pharm. Fr. 1963 (21), pp. 699-702.
72. **Hammouda Y., Rashid A., and Amer., 1963:** Hypoglycaemic properties
of Tecomine and Tecostamine. J. Pharmacol. (16), pp. 833-834.
73. **Hnatyszyn O., Mino J, Ferraro G., Acevedo C., 2002:** The
hypoglycemic effect of *Phyllanthus sellowianus* fractions in
streptozotocin-induced diabetic mice. Phytomedicine. Volume 9, Issue 6,
Pages 556-559.

74. **Holt C.V., Bohn H., 1966:** Metabolic effects of hypoglycin and methylene cyclopropane acetic-acid. *Biochim-Biophys. Acta*, 125, 11p.
75. **Hurte J.M., 2003.** Plantes médicinales et diabète. *Phytothérapie*, plante médicinales, aromatiques, huiles essentielles. www.phytomania.com/diabète.com
76. **Hutchinson J., Dalziel J.M., 1958:** *Flora of West Tropical Africa*. Second Edition, volume I, 639 pp.
77. **Irvine F.R., 1961:** *Woody plants of Ghana*. Oxford University Press, London.
78. **Iwu M.M., 1983:** *Traditional Igbo Medicine*, Report of a project sponsored by the institute of African Studies, University of Nigeria, Nsukka, 48 pp.
79. **Kårehed J., 2002:** *Evolutionary studies in asterids emphasising Euasterids II*. *Acta Univ. Ups. Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the faculty of Science and technology*, 761. 50 pp.
80. **Karunanayake E.H., Jeevathayaparan S. and Kamani H., 1990:** Effect of *Momordica charantia* fruit juice on Streptozotocin-induced diabetes in rats. *Journ. Ethn*, 30 pp 199-204.
81. **Keay R.W. J., 1958:** *flora of west tropical Africa*. Vol. 1(2). Crown Agents of Overseas Governments and Administration, London.

82. **Kebieche M., 2009** : Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens* L : effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine. Thèse de doctorat unique en sciences, option biochimie Université de Mentouri Constantine Algérie, 143p.

83. **Kent S., 2005** : La réduction du risque de diabète de type 2 chez les enfants autochtones du Canada, Enoncé de la SCP : FN et IH, *Paediatr Child Health* Vol 10 N°1 January 2005, 53-57pp.

84. **Kerharo J., 1976** : La pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Plantes médicinales et toxiques. Ed. Vigot Frères, Paris.

85. **Kerharo J., et Adam J. G., 1974** : La pharmacopée sénégalaise traditionnelle : Plantes médicinales et toxiques. Vigot Frères, Ed. Paris, 1974 ; pp 407- 408 ; 486- 487 ; 680 -681.

86. **Kerharo J., et Adam J.G., 1974** : La pharmacopée sénégalaise traditionnelle, Plantes médicinales et toxiques. Editions Vigot Frères, Paris. pp 407-681.

87. **Koehn F.E., Carter G.T., 2005**.The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature reviews Drug Discovery*; 4:206-220.

88. **Laughton M.J., Halliwell B., Evans P.J., Houlst J., Robin S., 1989**. Antioxydant and pro-oxydant of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochem. Pharmacol.* 38 (17) : 2859-2865.

89. **Lehninger D.N., 1985.** Principe de la biochimie, Flammarion, Med. Sc. Ed., Paris, 1985, 712-740.

90. **Lenzen S., 2008.** The mechanisms of alloxan and streptozotocin induced diabetes. *Diabetologia* 51: 216-226.

91. **Lenzen S., Drinkgern J., Tiedge M., 1996.** Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med.* 20 : 463-466.

92. **Levine N.D., 1985:** Textbook of veterinary parasitology. Burgess publishing company. Minneapolis (USA), 236p.

93. **Lim Y.Y., Lim T., Tee J., 2007.** Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food chemistry* 103, 1003-1008.

94. **Lucindo J.Q.J., Jackson R.G.S.A., Julianeli T.L., Xirley P.N., Jullyana S.S., Leandra E.G.O., Reinaldo N.A., Petrônio F.A.F., José M.B.F., 2008 :** Plants with anticonvulsant properties, a review. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18, 798-819.

95. **Lutton J.P., Thomopoulos P., Basdevant A., 1999 :** Endocrinologie, nutrition et maladies métaboliques. Paris : Flammarion Médecines-Sciences, pp 214-218.

96. **Marles R.J., Farnsworth N.R., 1995.** Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 2: pp 137-189.

97. Marnett J.L, 1999: Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. Mutation Research./ Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis, Volume 424, Issues 1-2, 8 Mach, pp 83-95.

98. **Marouf A., Joël R., 2007:** La botanique de A à Z. Edition Dunod, Paris, pp 66-82.

99. **Mbatchou V.C., and Dawda, 2012 :** Phytopharmacology: Phytochemical and pharmacological profile of genus *Icacina*. Phytopharmacology, 2 (2) 135-143.

100. **Memon E., Ribeiro C., 2011.** Les comas diabétiques. Les prises en charge spécifiques, Urgences 2011, 1141-1156.

101. **Miers J., 1951:** Observations on the affinities of the Olacaceae. Annals and Magazine of Natural History 8, 11-184.

102. **Moses K.G., and Bernice A; 2013 :** Nutritional composition of the seed of *Icacina senegalensis/oliviformis* (False yam). Pakistan Journal of Nutrition 12 (1): 80-84.

103. **Muller-Harvey I., 2001.** Analysis of hydrolysable tannins. Anim. Feed Sc. Technol. 91, 3-20.

104. **Muller-Harvey I., Mc Allan A.B., 1992.** Tannins: their biochemistry and nutritional properties. Adv. Plant cell Biochem. Biotechnol. 1, 151-217.

- 105. Nath M.C., and Banerjee S.R., 1943:** New antidiabétic principle (Amellin) occurring in nature. *Ann. Biochem. Exp. Med.*, 1943 (3), pp. 55-62, 63-84.
- 106. National Research Council., 2008:** Lost Crops of Africa: Volume III: Fruits. 281-289. <http://www.nap.edu/catalog/1189.html>
- 107. Ndiaye M, Diatta W, Sy GY, Fall AD, Faye B, Bassene E.** Activité anti-hyperglycémiant de l'extrait éthanolique de feuilles d'Icacina senegalensis Juss (Icacinaceae). *Méd. d'Afr. Noir.* 2008 ; 55 (8-9) : 442-445.
- 108. Ndiaye M., 2004 :** Contribution a l'étude de la fraction active antidiabétique de *Icacina senegalensis* juss (icacinaceae). DEA, Chim. Prod.Nat., Fac Sciences et Techn., 2004, n°16.
- 109. Nmila R., Rchid H., Gross R., Manteghetti M., Ribes G., Petit P., Tijane M., Sauvaire Y., 2002 :** Mise en évidence d'un effet insulino-stimulant de fractions de graines de coloquinte (*Citrullus colocynthis* L. Schrader) ; *Biologie & Santé* vol. 2, n° 2, 2002.
- 110. Norbaek R., Aaboer D. B. F., Bleeg I. S., Christensen B. T., Kondo T., Brandt K. J.** *Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 809-813.
- 111. Odukoya O.A., Sofidiya M.O., Familoni O.B., Inya-Agha S.I., 2006:** Free radical scavenging activity of some Nigerian medicinal plants extracts. *Pakistan journal of Biologie*

- 112. Oliver D., 1868:** Flora of tropical Africa. Vol. I. Reeve, London.
- 113. OMPI., 2002 :** Extrait de plantes médicinales dans le traitement des maladies de diabétiques. Numéro de publication internationale WO 02/O94299 A1, 24p.
- 114. OMS., 2001 :** Promotion du rôle de la médecine traditionnelle dans le système de santé : stratégie de la Région africaine. Bureau Régional de l’Afrique Hararé, 19 p.
- 115. On’Okoko P., Vanhaelen M., Vanhaelen-Fastré R., Decterq J.P., and Van Meersche M., 1985:** Tetrahedron, 41, 745.
- 116. On’Okoko P., Vanhaelen M., Vanhaelen-Fastré R., Decterq J.P., and Van Meersche M., 1985:** Phytochemistry, 24, 2452.
- 117. Ozçelik B., Kartal M., Orhan I., 2011:** Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoïdes, and phenolic acids. Pharm. Biol., 49 (4): 396-402.
- 118. Paolisso G., D’Amore A., Galzerano D., Varriccho M., D’Onofrio F., 1993.** Daily vitamin E supplements improve metabolic control but not insulin secretion in elderly type 1-2 diabetic patients. Diabetes Care, 16: 1433-1437.
- 119. Percival D. A., 1968:** Common trees and shrubs of the Gambia. Ined. (MS. At K).

- 120. Pereira de Sousa E. 1949:** Contribuições para o conhecimento da flora de Guiné Portuguesa. Vol. IV, Tomo III, Fascículo I. Junta das Missões Geográficas e de Investigações Coloniais, Lisbon.
- 121. Peyre de Fabrègues B., et Lebrun J.P., 1976 :** Catalogue des plantes vasculaires du Niger. Institut d'Elevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux, Maisons-Alfort.
- 122. Puppo A., 1992.** Effect of flavonoids on hydroxyl radical formation by Fenton type reactions; Influence of the Iron chelator. *Phytochemistry*, 31 (1): 85-88.
- 123. Pongsak R., Phumkhachorn P., Fitoterapia, 2007, 78(6), 434-436.**
- 124. Raccah D., 2004.** Epidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. *EMC – Endocrinologie 1* (1) : 29-42.
- 125. Raccah D., Janand-deleenne B., Wague P., 1999:** Diabète non insulino-dépendant. Epidémiologie, étiologie, physiopathologie, diagnostic, complications, traitement. *La revue de Praticien (Paris)*, 1999, 49 : 629-634.
- 126. Ragunathan V, Sulochana N.** A new flavonol bioside from the flower of *Hibiscus vitifolius* Linn. and its hypoglycaemic activity. *J Indian Chem Soc.* 1994 ; 71 ; 705-706.

- 127. Rajnerayanama K., Reddy M., Charluvadi M.R., Krishna D.R., 2001.** Bioflavonoids: classification, pharmacological, biochemical effect and therapeutic potential. Indian Journal of Pharmacology, 33: 2-16.
- 128. Raphaël D., Eklu-Natey et Annie B.** Dictionnaire et monographies multilingues du potentiel médicinal des plantes africaines. Afrique de l'ouest, Volume 1 Editions Traditions et Médecine T et M Genève 2011, 547p
- 129. Raphaël D., Eklu-Natey et Annie B.** Pharmacopée africaine. Dictionnaire et monographies multilingues du potentiel médicinal des plantes africaines. Afrique de l'ouest, Volume 2, Editions d'en bas Traditions et Médecine T et M 2012, 547p.
- 130. Raynal J., 1975 :** Changement du nom de l'espèce-type d'icacina Juss. Adansonia, sér. 2, 15 : 193-194.
- 131. Raynal J., 1975 :** Changement du nom de l'espèce-type d'Icacina Juss. Adansonia, sér. 2, 15 : 193-194.
- 132. Reutter L., 1923 :** Traité de matières médicales. JB Baillière et fils, pp. 701.
- 133. Ribes G., Sauvaire Y., Baccou J.C., 1984.** Effect of fenugreek seeds on endocrine pancreatic secretion in dogs. Ann Nutr Metab 28: 37-43.
- 134. Richelle M., Tavazzi I., Offord E., 2001.** Comparison of the antioxidant activity of commonly beverages (coffee, cacao and tea) prepared per cup serving. J. Agric. Food Chem. 49, 3438-3442.

135. **RikkeNorbaek ,Kirsten Brandt, Tadao Kondo**, J. Agrc. Food Chem. 2000, 48, 1703-1707.
136. **Rivera G., 1942** : Preliminary chemical and pharmacological studies on « cundeamor » *Momordica charantia* L. American J. Pharm. 114, pp 72-87.
137. **Roberty G., 1954** : Petite flore de l'Ouest africain. Office de la recherche scientifique et technique Outre-mer, Paris.
138. **Robolot George et Renée Wylde**, J. Nat. Prod., **1988**, 51, 596-598;
139. **Rodier M., 2001** : Définition et classification du diabète, Médecine Nucléaire. Imagerie fonctionnelle et métabolique, 2001 ; vol.25 - n°2 , 91-93 pp.
140. **Rosevear D.R., 1961** : Gambia trees and shrubs. Ined. (MS. At).
141. **Rufus M.U., 2010: Ethnobotany** and Biodiversity Conservation in the Niger Delta. Nigeria. International Journal of Botany 6, 310-322.
142. **Sakande J., 2004** : Etude bioguidée des propriétés pharmacologiques d'extraits et fractions de *Borassus aethiopum* Mart (Arecaceae) : approche du mécanisme biochimique d'action. Thèse de doctorat unique en sciences biologiques appliquées, option biochimie et chimie des substances naturels, Université de Ouagadougou, 214 p.

143. **Sarfati J., 2008** : La Collection Epreuves Classantes Nationale Hippocrate Endocrinologie métabolisme Réanimation- Urgence : Diabète sucré de types 1 et 2 de l'enfant et de l'adulte, 53 p.
[p. www.laconferencehippocrate.com](http://www.laconferencehippocrate.com)

144. **Sarr S.O, Perrotey S, Fall I., Ennahar S., Zhao M., Diop Y.M., Candolfi E and Marchioni E.** *Icacina senegalensis* (Icacinaceae), traditionally used for the treatment of malaria, inhibits in vitro plasmodium falciparum growth without host cell toxicity. *Malaria Journal*, 2011; 10:85, 10 p.

145. **Seck J.F., 1991** : Contribution à l'étude de l'activité antidiabétique d'une plante de la pharmacopée traditionnelle sénégalaise : *Cassia occidentalis* L. (Césalpiniciacées). Thèse Pharmacie, Dakar, n° 25.

146. **ShaheenFaizl, Muhammad Ali**, *Magn. Reson. Chem.* 2000, 38: 701–703.

147. **Sharma A., Kharb S., Chungh S.N., Kakkar R., Singh G.P., 2000.** Evaluation of oxidative stress befor and after control of glycemia and after vitamin E supplementation in diabetic patients. *Metabolism*, 49: 160-162.

148. **Sharma S.B., Viswanath G., Salunke R., Roy P., 2008.** Effect of flavonoide rich extract from seeds of *Eugenias Jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. *Food Chemistry* 110: 697-705.

149. **Sillans R., 1958** : Les savanes de l'Afrique centrale. Lechevalier, Paris.

150. **Silverstein R.M., Webster F.X., Kiemle D.Jeuxièm., 2007.** Identification spectrométrique de composés organiques, deuxième édition. Edition De Boeck Université, Belgique, 501p.
151. **Soicke H, Gorler k, Warning H.** Terpenic constituents from *Icacina senegalensis*. *Planta Medica*, 1991, vol 57 (Suppl 1). pp 86-87.
152. **Srivastava Y., Venkatakrishna-Bhatt H., Verma y., 1993.** Antidiabetic and adaptogenic properties of *Momordica charantia* extract. An experimental and clinical evaluation. *Phytother Res*, 7: 285-289.
153. **T. Yoshihara, H. Yoshikawa, S. Sakamura, T. Sakuma,** *Agric. Biol.Chem.*,1974, 38, 1107(isolation).
154. **T.Yoshihara, H. Yoshikawa, S. Sakamura, T. Sakuma,** *Agric. Biol.Chem.*,1977, 41, 1679 (isolation)
155. **Tchobrouisky C.** Grossesse et diabète. *Rev. Du prat.* 1991(26) : 2783.
150. **Tchobroustsky G et Guy-Grand B.** *Nutrition Métabolismes et Diététique.* Edition Flammarion Médecine-Sciences, 1979, 337 p.
151. **Teye G.A., Adua E.A., Teye M., 2011:** Effect of soaked and dried false yam (*Icacina oliviformis*) seed meal on carcass and sensory characteristics of boiler chicken. *Animal and freed Research* 1, 144-149.

152. **Timonthée O., Idyo M., 2011:** Preliminary phytochemistry and in vitro antimicrobial properties of aqueous and methanol extracts of *Icacina trichantha* Oliv. Leaf. International Journal of Medicinal Aromatic Plants.1, 1-5.

153. **Tisserant P.C., 1950 :** Catalogue de la flore de l'Oubangui-chari. Mem. Inst. Etudes centrafr. n° 2. Julia , Brazzaville. In Faye J.M, 1987. *Icacina oliviformis* (Icacinaceae): A close look at an Underexploited crop. I. Overview and Ethnobotany. Economic Botany, 41 (4), pp 512-522.

154. **Tomas-Barberan F.A., Lopez-Gomez C., Villar A., Tomas-Lorente F., 1986:** Inhibition of lens Aldose reductase by labiatae flavonoids, *Planta Medica*, vol 3, pp 239-240

155. **Trinder P., 1969.** Determination of glucose in blood using glucose oxidase with on alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem*, 1969; 6: 24-27.

156. **Van Acker S.A.B.E., Van den Berg D.J., Tromp M.N.J.L., Griffioen D.H., Van Bennekom W.P., Van der vijgh W.J.F., Bast A., 1996.** Structural aspect of antioxydant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* 20: 331-342.

157. **Vanhaelen M., Planchon C., Vanhaelen-Fastre R., On'Okoko P., 1986 :** Terpenic constituents from *Icacina senegalensis*. *Journal of Natural Products* 50, 312.

158. **Villiers J.F., 1973 :** Flore du Gabon. Icacinacées Olacacées Pentadiplandracées Opiliacées Octoknémacées. 50 pp.

- 159. Vischer U. M., 2003 :** La prévention du diabète de type 2 : activité physique ou médicaments ? Revue Médicale Suisse N°560 publiée le 04/06/2003
- 160. Welihinda J., Karunanayake E.H., Sheriff M.H., Jayasinghe K.S., 1986.** Effect of *Momordica charantia* on glucose tolerance in maturity onset diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 17: 277-282.
- 161. Wessely F, Moser GH, Monatsh. Chem., 1930, 56(1), 97–105.**
- 162. Woot-Tsuen W.L., Busson F., and Jardin C., 1968.** Food composition table for us in Africa, pp 35, Rome : Food and Agriculture Organization of United Nations, pp 306.
- 163. Yu H., Rifai N., 2000 .** High sensitivity C reactive protein and atherosclerosis: from theory to therapy *Clinical Biochemistry*, vol 33, 8, pp 601- 610

ANNEXES

Tableau XVI : valeurs moyennes de la glycémie (g/L) chez des rats normo-glycémiques

Temps (heure)	T0	T1	T2	T3	T4
Eau physiologique (10ml/kg)	0,77 ± 0,04	0,77 ± 0,07	0,85 ± 0,04	0,82 ± 0,07	0,87 ± 0,08
FEB (300mg/kg)	0,88 ± 0,03	0,89 ± 0,04	1,06 ± 0,11	1,17 ± 0,16	1,30 ± 0,17
FEB (150mg/kg)	0,68 ± 0,03	0,57 ± 0,03	0,63 ± 0,05	0,67 ± 0,06	0,74 ± 0,06
FA (300mg/kg)	0,85 ± 0,03	0,84 ± 0,08	0,92 ± 0,10	1,04 ± 0,09	1,13 ± 0,18

Tableau XVII : valeurs moyennes de la glycémie (g/L) sur un modèle de tolérance au glucose chez des rats

Temps (minutes)	T-90	T0	T30	T60	T90	T120
Eau physiologique (10ml/kg)	0,94 ± 0,09	0,81 ± 0,06	2,56 ± 0,22	2,43 ± 0,32	2,55 ± 0,33	2,88 ± 0,26
FEB (150mg/kg)	0,66 ± 0,04	0,74 ± 0,04	2,01 ± 0,22	2,03 ± 0,64	1,82 ± 0,27	1,41 ± 0,37
FAEM (150mg/kg)	0,83 ± 0,05	0,93 ± 0,05	1,90 ± 0,09	1,69 ± 0,19	1,64 ± 0,13	1,40 ± 0,28

Tableau XIII : valeurs moyennes de la glycémie (g/L) chez des rats
Diabétiques de type 2

Temps (jours)	J0	J2	J4	J6	J8
Eau physiologique (10ml/kg/j)	2,82 ± 0,09	2,93 ± 0,14	3,16 ± 0,11	3,22 ± 0,12	3,27 ± 0,06
FAEM (150mg/kg)	2,81 ± 0,08	1,84 ± 0,23	1,72 ± 0,18	1,63 ± 0,25	1,34 ± 0,20
FAEM (300mg/kg)	2,79 ± 0,05	1,78 ± 0,21	1,64 ± 0,15	1,31 ± 0,19	1,06 ± 0,11
Glibenclamide (0,3mg/kg)	2,94 ± 0,06	2,10 ± 0,29	1,80 ± 0,19	1,19 ± 0,12	0,99 ± 0,04

Résumé

Icacina oliviformis est une plante des jachères à la fois utile à l'environnement et à la pharmacopée traditionnelle sénégalaise et dont les feuilles sont utilisées au Sénégal dans le traitement du diabète. Cette étude se propose de déterminer les molécules qui seraient responsables de cette activité afin de promouvoir la valorisation de l'espèce par la synthèse de nouvelles molécules antidiabétiques.

L'étude chimique a montré que la fraction éthanolique brute (FEB) et la fraction acétate d'éthyle méthanol (FAEM) des feuilles de *Icacina oliviformis*, renferment des polyphénols (tanins et flavonoïdes). La purification de la FAEM a permis d'isoler 2 nouveaux flavonoïdes C-glycosylés (AG2 et AG3) non connues de la littérature et le trans (S,E)-(-)-Clovamide.

Les tests pharmacologiques ont montré que chez des rats normo-glycémiques, la FEB (150 mg/kg, per os) entraîne une baisse du glucose sanguin ($0,57 \pm 0,03$ g/L vs $0,68 \pm 0,03$ g/L) ($p < 0,05$; $n = 5$) au bout d'1 heure d'observation. Cette baisse est toutefois transitoire, avec un retour progressif de la glycémie à l'état de base au bout de 4 h. Sur un test de tolérance au glucose, la FEB (150 mg/kg, per os) et la FAEM (150 mg/kg, per os) préviennent de façon significative l'apparition d'un pic d'hyperglycémie. La variation Δ du pic d'hyperglycémie est de $1,75 \pm 0,20$ g/L dans la groupe contrôle. Elle est respectivement de $1,27 \pm 0,26$ g/L et de $0,97 \pm 0,13$ g/L pour la FEB et la FAEM. Chez des rats diabétiques de type 2, l'administration quotidienne de la FAEM (150 mg/kg, per os) entraîne, tout comme le glibenclamide, un effet anti-hyperglycémiant au bout de 8 jours de traitement. En effet, le glucose varie de $2,81 \pm 0,08$ g/L à $1,34 \pm 0,02$ g/L ($p < 0,05$; $n = 5$).

Subject: Medicinal valorization of a plant fallow, *Icacina oliviformis* (Poirét) Raynal (*Icacinaceae*): chemical and pharmacological study.

Summary

Icacina oliviformis is a plant fallow that is useful to the environment and senegalese traditional pharmacopoeia and whose leaves are used in Senegal in the treatment of diabetes. This study aims to identify the molecules that are responsible for this activity in order to promote the valorization of the specie for the synthesis of new antidiabetic drugs.

Chemical study showed that the crude ethanol fraction (CEF) and the methanol ethyl acetate fraction (MEAF) of *Icacina oliviformis*'s leaves, contain polyphenols (tannins and flavonoids) Purification of MEAF allowed to isolate two new C-glycosylated flavonoids (AG2 and AG3) not known from the literature and trans (S,E)-(-)-Clovamide.

The pharmacological tests have shown that in normoglycemic rats, CEF (150 mg/kg, per os) causes a decrease of blood glucose (0.57 ± 0.03 g/L vs 0.68 ± 0.03 g/L) ($p < 0.05$; $n = 5$) one hour after administration, with gradual return to base line values of blood glucose after 4 hours. In oral glucose tolerance test, the CEF (150 mg/kg, per os) and the MEAF (150 mg/kg, per os) prevent significantly the apparition of hyperglycemic peak. The Δ variation of hyperglycemia peak is 1.75 ± 0.20 g/L in the control group. This variation is respectively, 1.27 ± 0.26 g/L and 0.97 ± 0.17 g/L for CEF and the MEAF. In type 2 diabetic rats, the daily administration of MEAF (150 mg/kg, per os) induced, like glibenclamide, an anti-hyperglycemic effect after 8 days of treatment. In fact, the glycaemia varied from 2.81 ± 0.08 g/L to 1.34 ± 0.02 g/L ($p < 0.05$; $n = 5$).

Discipline : Environnement

Mots clés : *Icacina oliviformis*, feuilles, chimie, pharmacologie, diabète de type 2.