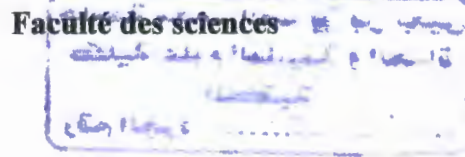


024

Université de Jijel

Bc. 10.2003



01/01

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme des études supérieures en biologie
Option : Biochimie

Thème

Etude de l'effet des différents types de *flavonoïdes* : *aglycones*, *mono-*
di et *tri glycosides*, extraits à partir de la plante *Ranunculus repens L*,
sur quelques paramètres biochimiques liés au diabète.

Les membres de jury :

Président : Mr. BOUHOUS Mestapha
Examineur : Dr. LAHOUEL Mesbah
Encadreur : Mr KEBEICHE Mohammed



KEBSA Widad
CHERBALE Asma
LABRECHE Leila

REMERCIEMENT

Nous tenons à remercier Dieu, le tout puissant, qui nous a donné la force afin d'accomplir ce modeste travail. Et il nous est agréable d'exprimer nos vive et sincère gratitude à notre promoteur. Mr. Kebieche Mohamed pour avoir suivi et dirigé notre travail avec patience, et pour sa précieuse aide, sa compétence et sa présence.

Notre remerciement s'adresse également au :

- Dr. Lahouel Mesbah pour sa précieuse aide.
- Dr. Bouzenoune Azzeddine pour sa précieuse aide.
- Dr. Laghouchi Saïd, Directeur de l'Institut, pour avoir mis les moyens pédagogiques à notre disposition.
- Directeur du laboratoire central de l'hôpital de JIJEL, Dr. Maïza Mohamed.
- Personnel du laboratoire d'hygiène et de la santé de JIJEL, et particulièrement Mm. Baha.
- L'association d'aide des malades et du don du sang.
- Personnel du laboratoire de l'institut des sciences de la nature de l'université de JIJEL.
- Personnel de la bibliothèque de l'université de JIJEL.
- Les étudiants de la Post-Graduation physique pour leur collaboration, et tout particulièrement : Karima, Nabila et Fayçal.

Nous voudrions aussi remercier tous les enseignants de l'institut des sciences de la nature, qui nous ont transmis leur savoir durant les quatre ans, et en particulier ceux qui nous ont aidé dans notre travail, entre autres : Mr. Bounamous, Mr. Bouldjedri. Mr. Mayache et Mr. Boudjerda.

Nous tenons à remercier également Monsieur le président d'avoir bien voulu présider notre jury et Monsieur l'examineur.

En fin, nous remercions toute personne ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Sommaire

I-Introduction	1
II- Etude bibliographique	2
II- 1- Le diabète.....	2
II- 1- 1- Définition.....	2
II- 1- 2- Types de diabète.....	2
II- 1- 2- 1- Diabète insulino dé pendant.....	2
II- 1- 2- 2- Diabète non insulino dé pendant.....	2
II- 1- 2- 3- Diabète gestationnel.....	2
II- 1- 2- 4- Autres types spécifiques.....	2
II- 1- 3- Symptômes et diagnostic.....	2
II- 1- 3- 1- Symptômes.....	2
II- 1- 3- 2- Diagnostic.....	2
II- 1- 4- Régulation endocrinienne du mé ta bolisme glucidique.....	3
II- 1- 4- 1- L'insuline.....	3
II- 1- 4- 2- Le glucagon.....	3
II- 1- 4- 3- La somatostatine.....	3
II- 1- 5- Régulation de l'insulino sé crétion.....	5
II- 1- 6- Thérapie du diabète.....	5
II- 1- 6- 1- Le respect d'une di é t é tique.....	5
II- 1- 6- 2- L'activité physique.....	5
II- 1- 6- 3- Le traitement médicamenteux.....	5
II- 1- 6- 3- 1- L'insulino th érapie.....	5
II- 1- 6- 3- 2- Traitement par les hypoglyc é m ia nts oraux.....	5
II- 1- 6- 4- Phyto th érapie.....	6



III- 2- 1- 1- Séchage.....	13
III- 2- 1- 2- Broyage.....	13
III- 2- 1- 3- Extraction hydro-éthanolique.....	13
III- 2- 1- 4- Evaporation à sec.....	13
III- 2- 1- 5- Reprise par l'eau bouillante.....	13
III- 2- 1- 6- Affrontement.....	13
a- Affrontement par l'ether de pétrole.....	14
b- Affrontement par l'éther diéthylique.....	14
c- Affrontement par l'acétate d'éthyl.....	14
d- Affrontement par le n-butanol.....	14
III- 2- 1- 7- Evaporation à sec.....	14
III- 2- 2- Fractionnement chromatographique des flavonoïdes.....	15
III- 2- 3- Préparation des solutions administrées.....	15
III- 2- 3- 1- Préparation des solutions flavonoïdiques.....	15
III- 2- 3- 2- Préparation de la solution du gliclazide.....	15
III- 2- 3- 3- Préparation de la solution du glucose.....	15
III- 2- 4- Traitement des animaux.....	17
III- 2- 5- Dosage.....	19
a- glycémie.....	19
b- cholestérolémie.....	20
c- triglycéridémie.....	20
d- kaliémie.....	21
e- insulinémie.....	21
III- 2- 6- Etude histologique.....	21
III- 2- 6- 1- Préparation des blocs.....	21

II- 2- Phytochimie.....	7
II- 2- 1- Généralités sur la plante <i>Ranunculus repens L.</i>	7
II- 2- 1- 1- Systématique de la plante.....	7
II- 2- 1- 2- Caractéristiques de la plante.....	7
II- 2- 2- Les flavonoïdes.....	9
II- 2- 2- 1- Définition.....	9
II- 2- 2- 2- localisation.....	9
II- 2- 2- 3- Distribution.....	9
II- 2- 2- 4- Structure générale.....	9
II- 2- 2- 5- Classification.....	10
II- 2- 2- 6- Biosynthèse.....	10
II- 2- 2- 7- Rôle des flavonoïdes.....	10
II- 2- 2- 7- 1- Rôles biologiques et physiologiques.....	10
II- 2- 2- 7- 2- Rôles pharmacologiques.....	10
II- 2- 2- 8- Méthodes d'étude des flavonoïdes.....	11
II- 2- 2- 8- 1- Extraction.....	11
II- 2- 2- 8- 2- Séparation.....	11
II- 2- 2- 8- 3- Identification.....	11
II- 2- 2- 9- Pharmacocinétique des flavonoïdes.....	11
III- Matériel et méthodes.....	13
- III- 1- Matériel.....	13
III- 1- 1- Matériel végétal.....	13
III- 2- 2- Matériel animal.....	13
III- 2- Méthodes.....	13
III- 2- 1- Extraction des flavonoïdes.....	13

III- 2- 6- 2- Réalisation des coupes et coloration.....	22
III- 2- 6- 3- Mise en évidence du glycogène.....	22
III- 2- 7- Extraction et mise en évidence de la quantité du glycogène hépatique.....	22
III- 2- 8- Test de glycosylation in vitro : effet des flavonoïdes sur la concentration du glucose in vitro.....	25
III- 3- Evaluation statistique.....	26
IV- Résultats et interprétation.....	27
IV- 1- Résultat de l'extarction des différents types de flavonoïdes.....	27
IV- 2- Résultat de la séparation de flavonoïdes.....	27
IV- 3- Etude de l'effet des flavonoïdes sur la glycémie, cholestérolémie et triglycéridémie.....	28
IV- 3-1- Effet temps des différents types de flavonoïdes sur la glycémie.....	28
IV- 3- 2- Effte dose des différents types de flavonoïdes sur la glycémie, la cholestérolémie et la triglycéridémie.....	29
IV- 4- Résultats de l'extraction et mise en évidence de la quantité du glycogène hépatique stocké sous l'effet des flavonoïdes.....	33
IV- 5- Résultats de l'étude histologique.....	35
IV- 6- Résultats de l'effet des flavonoïdes sur l'insulinémie.....	39
IV- 6- 1- Evaluation indirecte : kaliémie.....	39
IV- 6- 2- Evaluation directe : insulinémie.....	40
IV- 7- Résultats de l'effet des flavonoïdes sur la complexation in vitro.....	40
V- Discussion.....	51
VI- Conclusion.....	54
VII- Bibliographie	

I- Introduction

I - Introduction

Dans notre environnement, on estime entre 500 000 et 800 000 le nombre d'espèces de plantes existantes sur la terre. A côté de leur métabolisme primaire, ces végétaux synthétisent des molécules de faible poids moléculaire, les métabolites secondaires, tel que les *alcaloïdes*, les *terpénoïdes* et les *flavonoïdes*, qui constituent une biodiversité moléculaire que l'ordinateur ne peut pour l'instant encore imaginer. (2)

L'origine de la phytothérapie commence avec l'apparition de l'homme sur la planète, cependant, le développement explosif de la chimie organique à la fin du siècle dernier a, petit à petit, conduit à délaisser les sources naturelles, pour créer de nouvelles molécules, les médicaments de synthèse, sans rapport structural avec les substances d'origine naturelle. (17)

Actuellement, après l'amplification du nombre de médicaments de synthèse et l'apparition claire de leurs effets secondaires et de leurs interactions néfastes avec d'autres médicaments ou avec les aliments et pour plus d'espoir, on doit retourner à nos origines, à la nature, en utilisant ses usines chimiques gratuites que le Dieu nous a donné, afin de lutter contre les maladies n'ayant pas une thérapeutique efficace dans la pharmacopée actuelle. Entre autres le diabète, la première des maladies métaboliques par sa fréquence comme par sa gravité et qui n'a pas encore de traitement malgré le développement de la chimie thérapeutique.

✧ C'est d'ailleurs tout l'intérêt que présente l'étude scientifique des plantes inédites afin de découvrir de nouvelles molécules pouvant servir de point de départ à la synthèse de nouveaux médicaments.

Cet ultime objectif de la phytochimie thérapeutique, doit nécessairement passer par une étude phytochimique des plantes à vertus thérapeutiques puis la recherche des activités pharmacologiques de leurs principes actifs.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'étude de :

- L'activité hypoglycémiant des *flavonoïdes* type *aglycone*, *mono-*, *di* et *triglycosides* après leur extraction et séparation à partir de la plante *Ramunculus repens L.*
- Leurs effet sur la cholestérolémie et la triglycéridémie.
- Leurs effet sur l'insulinosécrétion, la quantité du glycogène hépatique.
- Ainsi que leurs capacité de *complexer le glucose in vitro*.

II- Etude bibliographique

II – Etude bibliographique

II - 1- Diabète:

Les maladies métaboliques résultent de désordre du métabolisme, eux même provoqués par des anomalies des enzymes cellulaires ou des systèmes hormonaux chargés de contrôler ces dernières. (14)

II -1- 1- Définition du diabète:

Le diabète est une maladie fréquente, qui touche environ 1% de la population. Elle est due à un trouble de l'assimilation du glucose par l'organisme qui est normalement contrôlée par une hormone pancréatique, l'insuline. (24)

II- 1- 2- Types de diabète:

Selon la nouvelle classification de l'OMS 1997, le diabète est classé comme suit :

II- 1- 2- 1- Diabète insulino-dépendant (type I) :

Il concerne le plus souvent les enfants, mais il peut survenir à tout âge . Il est lié à un déficit en insuline. Les cellules qui sécrètent l'insuline sont détruites jusqu'à 90% de leur quantité normale (causes auto-immunes ou idiopathiques). (24,33)

II-1- 2- 2- Diabète non insulino-dépendant (type II) :

Ce type de diabète débute généralement après l'âge de 40 ans et représente 90% de l'ensemble des cas mondiaux. Il résulte de l'incapacité de l'organisme à réagir correctement à l'action de l'insuline, cette insuline est basse ou élevée (insulinorésistance prédominante ou insulinopénie prédominante). (23,24)

II-1- 2- 3- Diabète gestationnel:

Découvert de façon fortuite pendant la grossesse, et dû à une modification hormonale, souvent se disparaît après l'accouchement. (11,33)

II-1- 2- 4- Autres types spécifiques:

Il y a aussi des diabètes liés à:

- une maladie pancréatique (pancréatite chronique, cancer du pancréas, ...)
- Une endocrinopathie (acromégalie, hyperthyroïdies, ...)
- Une maladie génétique (Turner, Klinefelter, ...)
- Une prise de certains médicaments (corticoïdes, diurétiques, ...)
- Une malnutrition et infections. (11,33)

II-1- 3- Symptômes et diagnostic :

II -1 - 3- 1 - Symptômes :

En l'absence de traitement, le diabète se reconnaît par une élévation chronique de la glycémie. Celle-ci s'accompagne parfois par les symptômes suivants : polydipsie, polyurie, asthénie, polyphagie, amaigrissement ou obésité, et des troubles de la conscience aboutissant à un coma mortel. (3)

II- 1- 3- 2- Diagnostic :

Le diagnostic clinique du diabète repose sur les symptômes décrits ci-dessus. Pour le diagnostic biologique, l'OMS a défini deux principaux critères :

- Le dosage de la glycémie plasmatique à jeun (si la glycémie est supérieur à 1.40 g /l le sujet est diabétique).

- Le dosage de la glycémie post prandiale (mesurée deux heures après l'administration d'une dose d'épreuve de 75 g de glucose, si la glycémie est supérieur ou égale à 2 g / l, le sujet est diabétique). (11)

II- 1- 4- Régulation endocrinienne du métabolisme glucidique :

Bien que les apports en glucose soient très variables dans le temps, la glycémie reste toujours comprise entre 0.8 et 1.17 g / l chez l'Homme. (31)

Cette homéostasie est assurée essentiellement par les sécrétions endocriniennes du pancréas : l'insuline, le glucagon et la somatostatine. (31,44)

II- 1- 4- 1- L'insuline :

Hormone polypeptidique formée, après élimination du peptide C par hydrolyse, de deux chaînes de 21 et 30 acides aminés, reliées par deux ponts disulfures. Elle est sécrétée par les cellules Bêta des îlots de Langerhans du pancréas. Cette hormone hypoglycémiante agit sur le métabolisme des glucides, des protéines, des lipides et sur le transport de potassium, au niveau du foie et des tissus périphériques.

- Au niveau du foie : l'insuline stimule la glycogénogenèse et inhibe la gluconéogenèse, la glycogénolyse et la cétogenèse. (7)

- Au niveau des tissus périphériques :

L'insuline facilite la pénétration du glucose dans les cellules en augmentant la perméabilité de leurs membranes. la captation des acides aminés par les cellules musculaires et les triglycérides par les adipocytes. (16)

✕ - Action sur le transport de potassium :

L'insuline agit sur la répartition de certains ions principalement le potassium, elle augmente leur captation par les cellules musculaires, adipeuses et hépatique. (12)

L'insulinosécrétion activée provoque une hypokaliémie. (28)

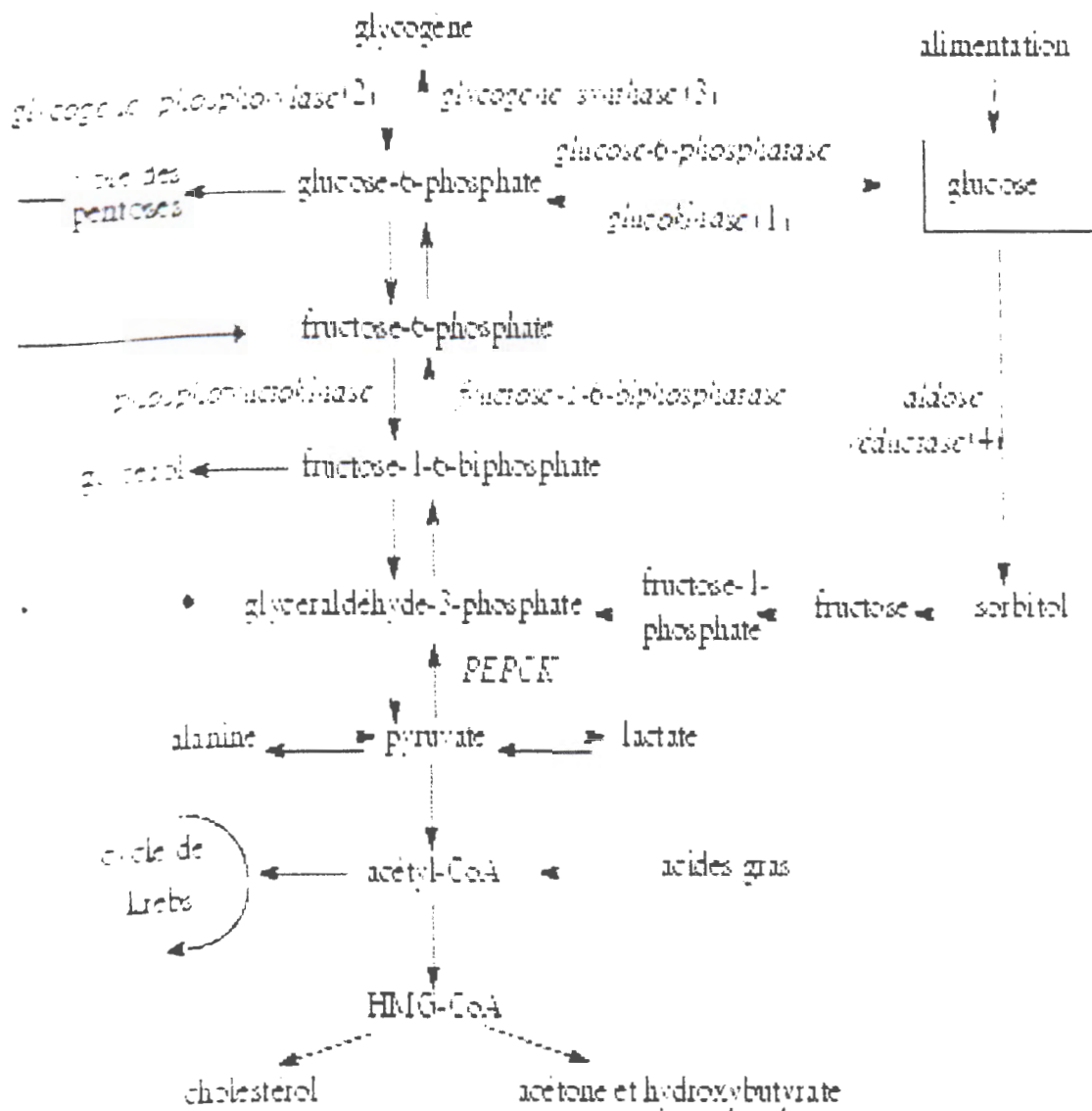
Ces effets de l'insuline sont la conséquence de ses effets nucléaires indirectes : module la transcription des gènes à l'origine de la synthèse d'enzymes impliquées notamment dans le métabolisme des glucides. (39)

II- 1- 4- 2- Le glucagon :

Hormone hyperglycémiante antagoniste de l'insuline, synthétisée par les cellules Alpha des îlots de Langerhans. Elle active la glycogénolyse, la gluconéogenèse, la lipolyse, la cétogenèse et la dégradation des acides aminés. (31)

II- 1- 4- 3- La somatostatine :

Hormone hyperglycémiante, synthétisée par les cellules Sigma des îlots de Langerhans. Elle freine la mobilité intestinal et la sécrétion des hormones gastro-intestinales. (16)



- (1) glucokinase, activité augmentée par l'insuline
- (2) glycogène phosphorylase : activité diminuée par l'insuline
augmentée par le glucagon
- (3) glycogène synthase, activité augmentée par l'insuline
- (4) aldose réductase : transforme l'excès de glucose en sorbitol
- (5) PEPCK : phosphoenolpyruvate carbonéylase, activité diminuée par l'insuline
- (6) 3 hydroxy-3-méthylglutaryl CoA

Fig.1- Régulation du métabolisme glucidique. (39)

II- 1- 5- Régulation de l'insulinosécrétion :

Le principal stimulant de la sécrétion d'insuline est le glucose . la stimulation nécessite plusieurs étapes :

- pénétration dans la cellule Bêta, pénétration indépendante de la présence d'insuline .
- sa phosphorylation par une glucokinase puis sa métabolisation avec synthèse de l'ATP .

L'augmentation de l'ATP entraîne la fermeture des canaux potassiques ATP dépendants et donc l'arrêt de la sortie de potassium, ce qui entraîne l'ouverture des canaux calcium voltage dépendants. L'entrée du calcium provoque l'activation de phospholipase A2 et C et la sécrétion d'insuline .

Les autres stimulants sont les acides aminés, les acides gras et les corps cétoniques.

Des médiateurs modulent la sécrétion d'insuline : certains l'augmentent (acétylcholine et divers hormones d'origine intestinal tels que la gastrine et la sécrétine), d'autres la diminuent (les catécholamines et la somatostatine). (13,39,44)

II- 1- 6- Thérapie du diabète :

Le traitement du diabète vise à maintenir une glycémie normale, le diabétique peut ainsi mener une vie physico-sociale normale . (31)

Le traitement comporte quatre aspects principaux :

II- 1- 6- 1- Le respect d'une diététique :

Quel que soit le type de diabète, le traitement alimentaire est nécessaire en évitant les apports exagérés en sucres d'absorption rapide, et en consommant des nutriments riches en fibres qui ralentissent l'absorption des glucides et du cholestérol. Ils ont également un effet chélateur sur les acides biliaries de l'intestin. (11,19)

II- 1- 6- 2- L'activité physique :

L'activité physique régulière est un facteur de bon développement et d'équilibre chez le diabétique. Elle permet d'éviter les complications du diabète. Elle agit également sur l'insulinorésistance en améliorant la sensibilité des tissus à l'insuline. (20)

II- 1- 6- 3- Le traitement médicamenteux :

II- 1- 6- 3- 1- L'insulinothérapie :

L'insuline thérapeutique est obtenue traditionnellement par la purification d'extrait de pancréas de porc ou de bœuf. Depuis quelques années, il existe des insulines qui sont fabriquées par le génie génétique, et qui ont exactement la même composition que l'insuline d'origine humaine. Il existe différentes variétés d'insuline. Ainsi, selon la durée d'action de l'insuline employée, on distingue trois formes :

- de 6 à 8 heures, on parle d'une forme ordinaire.
- de 8 à 12 heures, on parle d'une forme intermédiaire.
- de plus de 12 heures, on parle d'une forme lente.

L'insuline est uniquement prescrite en cas de diabète insulinodépendant (cependant, dans quelques cas, elle est utilisée en dehors de cette pathologie). Le malade apprend généralement à se faire les injections par voie sous cutanée, une à trois fois par jour. D'autres voies d'administration d'insuline ont été proposées: nasale, rectale, pompe à insuline...etc., mais ils sont délaissées à cause de leurs inconvénients. (16,28)

II-1- 6- 3- 2- Traitement par les hypoglycémiant oraux :

Il existe deux groupes :

■ **Les sulfonylurées :**

Leur administration est réservée exclusivement aux diabétiques de type II . Leur mécanisme d'action est la stimulation de l'insulinosécrétion, et la potentialisation de l'action de l'insuline. Ils n'ont aucune action sur la synthèse elle même de l'insuline. (16)

■ **Les biguanides :**

Leur mécanisme d'action est encore assez mal connu, elles diminuent l'absorption intestinale du glucose. (16)

Ils ont plusieurs sites d'action :

- Sur la glycémie : ce sont des antidiabétiques vraie, c'est à dire un anti-hyperglycémiant.
- Sur les lipides : cette action se traduit par une diminution du cholestérol total et une augmentation des HDL. (11,16)
- Sur l'hémostase : les biguanides apparaissent comme des protecteurs vasculaires (contre les thromboses), donc susceptibles de prévenir les complications du diabète.

II- 1- 6- 4- La phytothérapie :

C'est l'utilisation des plantes médicinales sous formes de tisanes, d'extraits secs ou nébulisés. (7)

Plusieurs plantes sont utilisées pour traiter le diabète.

- **L'oignon :**

Il contient une substance dite " l'orinase " qui active la synthèse et la sécrétion d'insuline . Il contient aussi des enzymes " glucokinases " qui ont le même effet que l'insuline . (20)

- **L'ail :**

IL a un rôle dans la prévention des complications surtout vasculaires du diabète . (18)
Une étude sur les rats diabétiques a montrée que des composés de l'ail et de l'oignon pouvait être aussi efficaces que l'insuline . (38)

- **Le fenugrec :**

IL a un effet hypoglycémiant, hypocholestérolémiant et triglycéridémiant. (18)

- **Les pommes, la tomates :**

En plus de leur haute valeur nutritionnelle, elles ont un effet puissant sur la régulation de la glycémie. (18)

- **La levure de bière :**

Elle contient le " chromonium ", substance naturelle qui résiste au glucose et qui est indispensable pour la stimulation de l'insulinosécrétion dans le corps. (18)

- **La sauge :**

Une nouvelle étude Allemagne confirme que la sauge diminue la glycémie surtout si elle est prise à jeun. (18)

- **Le bleuet :**

Possède plusieurs principes actifs (anthocyanosides, hétérosides, tanins) . Elle possède des propriétés hypoglycémiantes et anti-diabétiques. (37)

- **Le glouteron ou chou d'âne :**

A un effet hypoglycémiant puisqu'il contient une substance proche de l'insuline. (21)

- **L'olivier :**

Agent hypoglycémiant, et a un rôle dans la prévention des complications de la Maladie. (20)

- **Les céréales :**

Tous les céréales riches en fibres, selon une nouvelle étude, ont un effet hypoglycémiant en augmentant le nombre de récepteurs insuliniques. (18)

II- 2- Phytochimie**II - 2- 1- Généralités sur la plante :****II - 2- 1- 1- Systématique de la plante :**

Les renoncules , appelées aussi « Bouton d'or » appartient à la famille des renunculacées qui comprend une quarantaine de genres et 1500 à 1800 espèces , dont le genre *Ranunculus* comprend environ 300 espèces (6) .

Ce vaste genre comprend des plantes herbacées et de mauvaises herbes dont *Ranunculus repens* , la seule espèce décrite , est largement répandue dans les jardins (15 . 32) .

La taxonomie de la plante *Ranunculus repens* L est la suivante : (32)

Règne	: <i>Plantae</i> .
Sous règne	: <i>Tracheobionta</i> .
Super division	: <i>Spermatophyta</i> .
Division	: <i>Magnoliophyta</i> .
Classe	: <i>Magnoliopsida</i> .
Sous classe	: <i>Magnoliidae</i> .
Ordre	: <i>Ranunculales</i> .
Famille	: <i>Ranunculaceae</i> .
Genre	: <i>Ranunculus</i> .
Espèce	: <i>Ranunculus repens</i> L .
Nom commun	: <i>Renoncule rampante</i> .

Cette espèce est représentée dans la figure 2.

II- 2- 1- 2- Caractéristiques de la plante :

Les principaux critères de la plante *Ranunculus repens* L sont résumés dans le tableau I .

Tableau -I - Les caractéristiques de plante *Ranunculus repens* L . (6.8.15.34.35)

Habitat	Très commune , se rencontre dans les lieux ombragés et suffisamment humides .
Description de la semence	Dimension : 2.0 x 3.5 mm . Couleur : jaune-brun . Forme : lenticulaire marginée à bec grêle en crochet de 0.5 à 1mm .
Description de la plantule	Plantule à rosette et à feuilles alternes , cotylédons allongés en forme de cuillère .
Description de la plante adulte	Tige plus ou moins dressée , 20 à 50 cm de hauteur . Feuilles tripartites , velues , lobes eux mêles profondément divisés , lobes centraux à long pétiole . Fleurs : isolées, terminales , de 2 à 2.5 cm de diamètre , d'un jaune brillant , contient 5 pétales et plusieurs étamines . Fruits : le fruit est un akène, ovale et lisse .
Cycle de vie	Plante annuelle, vivace , pérenne , se multipliant par stolons . Floraison d' Avril à Juillet . Plante plus riche en principes actifs un peu avant la floraison .
Médecine	Plante caustique , peut provoquer des brûlures si elle est mâchée , et des problèmes cutanés du fait du lactone qu'elle libère .
Culinaire	Sans intérêt alimentaire .



Fig . 2 - *Ranunculus repens* L . (27)

II- 2- 2- Les flavonoïdes

II- 2- 2- 1- Définition :

Le nom *flavonoïdes* est dérivé du mot « *Flavus* » en latin , qui signifie jaune . Ce terme rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des « polyphénols » . (1,6)

Ces diverses substances , presque toujours hydrosolubles , sont issues du métabolisme secondaire des végétaux . Leur fonction principale semble être la coloration des plantes. (1,42)

II- 2- 2- 2- Localisation :

Les *flavonoïdes* existent sous forme d'*aglycones* et de *glycosides*. Les formes hétérosidiques , hydrosolubles , s'accumulent dans les vacuoles et , selon les espèces , se rencontrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle . Lorsque les *flavonoïdes* sont présents dans la cuticule foliaire, il s'agit presque toujours de *génines* libres . (5)

II- 2- 2- 3- Distribution :

Les *flavonoïdes* se retrouvent chez tous les végétaux, mais sa présence chez les algues n' a pas à ce jour été démontré . Ils se trouvent dans les divers organes : racines , tiges , bois , feuilles , fleurs , et fruits bien que certains *flavonoïdes* sont plus spécifiques de certains tissus. (5)

Le monde animal est lui aussi concerné par les *flavonoïdes* . On trouve , par exemple de la *chrysin* , de la *quercétine* ; de la *galangine* dans la propolis des abeilles . Ces insectes la fabriquent à partir des sécrétions de nombreux arbres et la modifient par leurs enzymes salivaires . (41)

II- 2- 2- 4- Structure générale :

Les *flavonoïdes* possèdent un squelette de base de quinze atomes de carbone , constitués de deux cycles benzéniques (A et B) reliés par une chaîne de 3 carbones Fig.3 . (1)

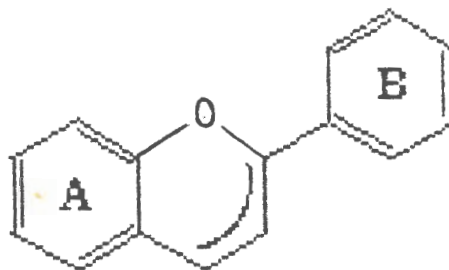


Fig . 3 -Squelette de base des *flavonoïdes* (37)

II- 2- 2- 5- Classification :

Les *flavonoïdes* se répartissent en quinze familles de composés, dont les plus importantes sont les suivantes : *flavones*, *flavonols*, *flavanones*, *flavanonols*, *isoflavones*, *isoflavanones*, *chalcones*, *aurones* et *anthocyanes*. (42)

Les composés de chaque sous classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituents sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne intermédiaire. (29)

Les *flavonoïdes* se rencontrent à la fois sous forme libre (toxique et peu soluble généralement) 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. Elle est formée avec des hexoses (D-glucose, D-galactose, D-allose...), avec des pentoses (D-apirose, L-arabinose, L-ramnose...) ou avec des acides (D-glucuronique, D-galacturonique...). La partie osidique peut être linéaire ou ramifiée. (5)

II- 2- 2- 6- Biosynthèse :

Les *flavonoïdes* sont issus de deux voies complémentaires :

- voie de l'acide malonique : voie de synthèse du noyau A qui résulte de la condensation d'une para-coumaroyl CoA avec 3 unités malonyl CoA.
- voie de l'acide shikimique : consiste à la formation du noyau B et les hétérocycles des *flavonoïdes*. L'acide shikimique et la phénylalanine sont les meilleurs précurseurs de cette voie.

En fin les deux voies se condensent pour donner naissance à un précurseur commun ; la 2,4,6,4'-tetrahydroxychalcone.

Par action d'enzymes spécifiques, cette chalcone est métabolisée en différentes classes des *flavonoïdes*.

Des étapes ultérieures surtout de glycosylation et d'acylation amènent les *flavonoïdes* à la forme définitive dont laquelle ils se trouvent *in vivo*. (9,41)

Les principales étapes de la biosynthèse des flavonoïdes sont représentées par la figure 4.

II- 2- 2- 7- Rôles des flavonoïdes :

Les *flavonoïdes* ont plusieurs rôles, à savoir :

II- 2- 2- 7- 1- Rôles biologiques et physiologiques :

Une des fonctions majeurs des *flavonoïdes* est de contribuer à la couleur des plantes et notamment à celle des fleurs, et servent ainsi à attirer les insectes et les oiseaux pollinisateurs, ou au contraire à dessiner certaines formes pour éloigner les prédateurs. (30)

Les *flavonoïdes* présentent des propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance, la respiration et de la morphogénèse. Certains d'entre eux jouent un rôle de phytoalexine, c'est à dire des substances que la plante synthétise pour lutter contre les infections bactériennes ou virales. (36)

II- 2- 2- 7- 2- Rôles pharmacologiques :

Les *flavonoïdes* sont de bons antioxydants par leur exceptionnelle capacité de piéger et de neutraliser les radicaux libres. Cette capacité est liée à leur structure qui permet la fixation de deux atomes d'hydrogène fournis par deux fonctions phénol.

D'autres *flavonoïdes* sont de bons inhibiteurs d'enzymes. Ils ont également des propriétés antibiotiques, antivirales, anti-inflammatoires, antiallergiques et diurétiques. Un petit nombre d'entre eux est cytostatique *in vitro*.

■ L'activité hypoglycémiant des flavonoïdes :

Les flavonoïdes (anthocyanosides , hétérosides) possèdent des propriété antidiabétique. (37). Ils peuvent également protéger les cellules pancréatiques qui peuvent être endommagées par les radicaux libres . (40)

II- 2- 2- 8- Méthodes d'études des flavonoïdes :

II- 2- 2- 8 -1- Extraction :

L'extraction des flavonoïdes nécessite une extraction hydro-éthanolique par des alcools (éthanol , méthanol) additionnés d'eau (20% à 50%) selon que la drogue est fraîche ou sèche . Il est possible de procéder ensuite à une évaporation sous vide et lorsque le milieu ne contient que de l'eau , de mettre en œuvre une série d'extractions liquide-liquide par les solvants non miscibles à l'eau :

- par de l'éther de pétrole pour éliminer la chlorophylle et les lipides .
- par l'éther diéthylique qui extrait les génines libres .
- par l'acétate d'éthyle qui extrait qui extrait les monoglycosides .
- par le n-butanol qui entraîne les di et les triglycosides . (5)

II- 2-2- 8- 2- Séparation :

La séparation des différents flavonoïdes est fondée sur des techniques chromatographiques habituelles (sur polyamide , sur gel de séphadex , et la chromatographie liquide à haute performance HPLC pour un bon contrôle de pureté). (5)

II- 2- 2-8- 3- Identification :

Il y a plusieurs méthodes d'études qui fournissent des indications fiables sur le type structural, la nature et la position des substituents : la spectrophotométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire (RMN) . (5)

II- 2- 2- 9- Pharmacocinétique des flavonoïdes :

Jusqu'à l'heure , le métabolisme des flavonoïdes est mal connu . Ainsi , il n'est pas encore reconnu par la FDA (Food and Drug Association) . (30)

Des données de littérature ont permis de dresser un schéma général de la biodisponibilité des flavonoïdes , ces étapes étant similaires chez le rat et chez l'homme .

Les flavonoïdes sont présents dans notre alimentation sous plusieurs formes , et cette particularité va leur conférer des métabolismes différents . C'est ainsi que les formes libres sont absorbées directement au niveau de l'intestin grêle , tandis que les formes glycosylées sont hydrolysées par la flore intestinale au niveau du côlon , avant de pouvoir être absorbées. Cependant , les formes libres issues de l'hydrolyse peuvent aussi être dégradés par la microflore en acides phénoliques , eux mêmes absorbés ou éliminés via les fèces .

Dans le sang , les flavonoïdes ne sont pas présents sous leur forme native car ils ont été transformés au niveau du foie par les enzymes de conjugaison qui transforment les flavonoïdes en métabolites qui vont atteindre leur tissus cibles pour avoir un effet biologique ou être éliminés définitivement dans les urines .

Toutefois , une fraction des flavonoïdes peut être déversée au niveau de l'intestin via la bile , qui éventuellement pourra être réabsorbée , et constitue un recyclage entérohépatique des flavonoïdes . (43,45)

Le temps de demi-vie des flavonoïdes est de 11 heures . (25)



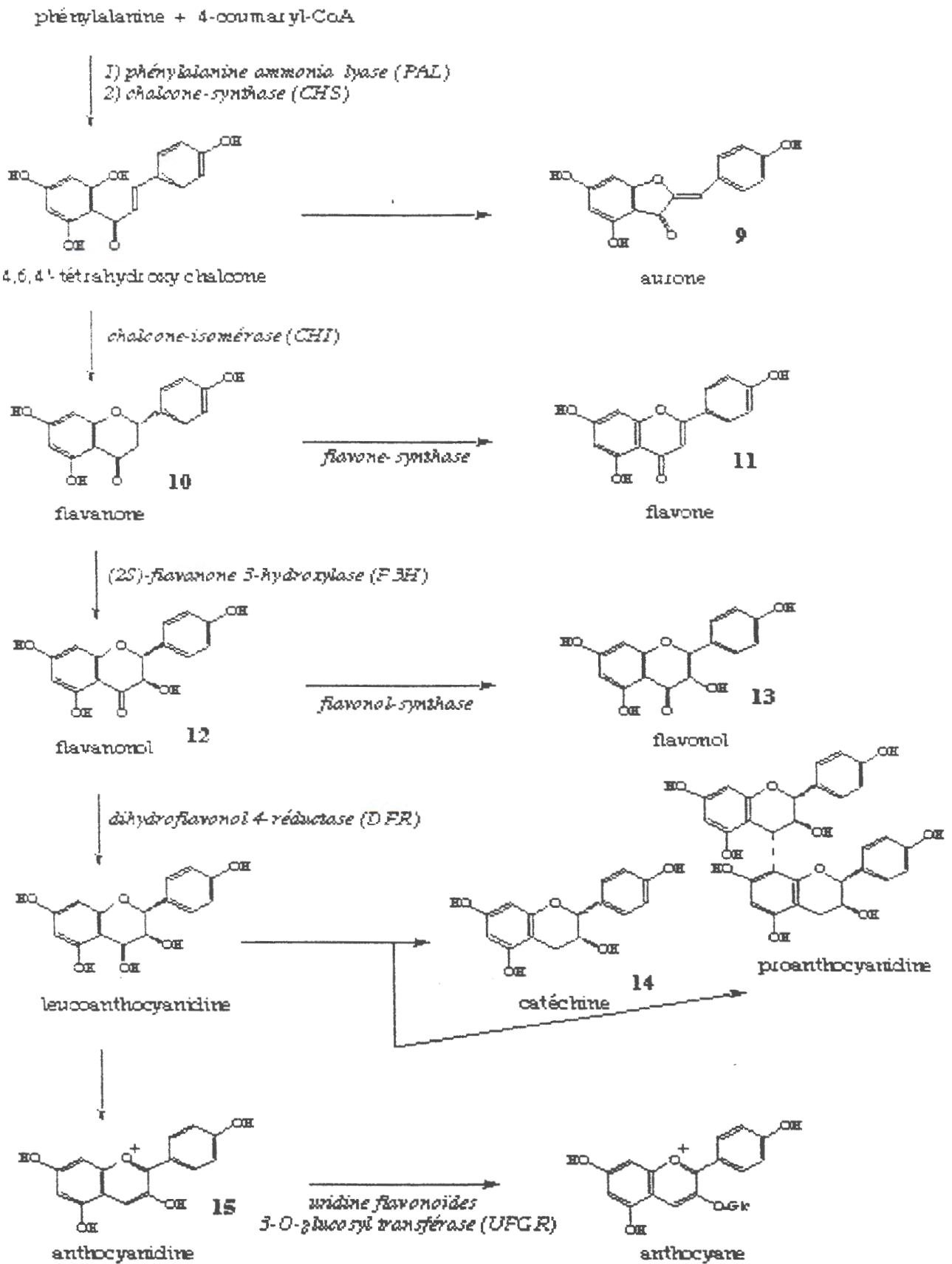


Fig. 4 - Biosynthèse des flavonoïdes (41)

III- Matériel et Méthodes

III -Matériel et méthodes**III -1-Matériel****III -1-1-matériel végétal**

La cueillette de la plante *Ranunculus repens L* a été faite à partir de la région de Kaous et Taxanna – Jijel la fin d'Avril 2003 .

III- 1- 2- matériel animal

Nous avons réalisé notre travail sur des rats albinos Wistar mâles et femelles de poids moyen de 280 g provenant de l'instituts Pasteur d'Alger . Ils sont élevés dans des cages en métal, nourris de croquettes et d'eau , et vivant dans l'animalerie à température ambiante de 20 - 27°C .

III- 2- Méthodes**III- 2- 1- Extraction des flavonoïdes**

L'extraction se fait au niveau du laboratoire de l'institut de biologie selon le protocole expérimental suivant :

III- 2- 1- 1- Séchage :

Après la cueillette de la plante et le lavage par l'eau distillée , on la sèche à l'air libre pendant 3 jours , puis dans l'étuve à 45°C pendant 2 jours .

III- 2- 1- 2- Broyage :

Nous avons fait le broyage des parties les plus jeunes de la plante à l'aide d'un broyeur de 8000 tours /mn pendant 25 secondes jusqu'à obtention d' une poudre très fine .

III- 2- 1- 3- Extraction hydro-éthanolique :

Nous avons pris 31 g du matériel végétal avec 500 ml de l'éthanol dilué à 75% (soit 350 ml d'éthanol + 150 ml d'eau distillée) dans une fiole, et on laisse macérer pendant 3 jours , puis on filtre le mélange à l'aide du papier filtre .

III- 2- 1- 4- Evaporation à sec :

Afin de séparer l'extrait sec de la phase éthanolique , nous avons utilisé le rotavapeur à température de 79°C à 2 tours / mn jusqu'à obtention d' un extrait sec des substances organiques et notamment les *flavonoïdes* .

III- 2- 1- 5- Reprise par l'eau bouillante :

Nous avons :	10 g de matière végétale	→	100 ml d'eau distillée
	31 g de matière végétale	→	x ml d'eau distillée

$x = 310 \text{ ml}$

donc le volume d'eau distillée qu'on ajoute est 310 ml .

On laisse macérer pendant 24 heures , puis on filtre à fin d'éliminer les impuretés .

Le volume final de la phase aqueuse obtenue est de 300 ml .

III- 2- 1- 6- Affrontement :

L'affrontement de la phase aqueuse se fait par 4 solvants différents :

- éther de pétrole pour éliminer la chlorophylle .
- éther diéthylique : solvant préférentiel des *aglycones* flavoniques .
- acétate d'éthyle : solvant préférentiel des *monoglycosides* .
- n-butanol : solvant préférentiel des *di* et *triglycosides*.

a- Affrontement par l'éther de pétrole :

Nous avons ajouté 100 ml d'éther de pétrole à la phase aqueuse . Après agitation énergique et repos de 10 mn , on met le mélange dans une ampoule à décantation . Deux phases sont obtenues :

- une phase éther de pétrole en haut contenant la chlorophylle .
- une phase aqueuse en bas .

b- Affrontement par l'éther diéthylique :

Sur la phase aqueuse obtenue après affrontement par l'éther de pétrole , nous avons répété les mêmes opérations mais avec un autre solvant qui est l'éther diéthylique . Deux phases sont obtenues :

- la phase éther diéthylique contenant les *aglycones* en haut .
- la phase aqueuse en bas .

Pour extraire le maximum possible des *aglycones*, la phase aqueuse obtenue subi un autre affrontement par l'ether diethyl.

c- Affrontement par l'acétate d'éthyle :

Même technique que précédemment mais avec un autre solvant qui est l'acétate d'éthyle . De même , deux phases sont obtenues :

- une phase acétate d'éthyle contenant les *monoglycosides* en haut.
- une phase aqueuse en bas .

d- affrontement par le n-butanol :

Même technique que précédemment , mais le solvant utilisé est le n-butanol . De même , deux phases sont obtenues :

- une phase n-butanol contenant les *di* et les *triglycosides* en haut .
- une phase aqueuse en bas .

III- 2- 1- 7- Evaporation à sec :

Les différentes phases : éther , acétate d'éthyle , n-butanol ont subi une évaporation à sec dans le rotavapeur (rotation 2) .

- pour la phase éther diéthylique la température est de 34°C .
- pour l'acétate d'éthyle la température est de 76.8°C .

pour le n-butanol, l'évaporation s'effectue dans l'étuve à 50°C .

Nous avons obtenu l'extrait brut de chaque phase , et à l'aide d'une balance électronique sensible nous avons calculé la masse des extraits bruts obtenus à partir de 62 g du matériel végétal broyé :

a- Extrait des *aglycones* :

$m = 280.1$ g (poids du ballon contenant l'extrait brut des *aglycones*)

$m' = 279.5$ g (poids du ballon vide)

$\Delta m = 0.6$ g (masse de l'extrait sec des *aglycones*)

b- Extrait des *monoglycosides* :

$m = 280.2$ g (poids du ballon contenant l'extrait sec des *monoglycosides*)

$m' = 279.5$ g (poids du ballon vide)

$\Delta m = 0.7$ g (masse de l'extrait sec des *monoglycosides*)

c- Extrait des *di* et des *triglycosides* :

$m = 280.1$ g (poids du cristalliseur contenant l'extrait but des *di* et des *triglycosides*)

$m' = 278.9$ g (poids du cristalliseur vide)

$\Delta m = 1.2$ g (masse de l'extrait sec des *di* et des *triglycosides*)

III- 2- 2- Fractionnement chromatographique des *flavonoïdes* :

Nous avons récupéré une petite quantité de chacun des extraits : *aglycones* , *monoglycosides* , *di* et *triglycosides* par 4 ml de méthanol . Grâce à des pipettes pasteur , nous avons déposé 4 spots sur une plaque de silice 20 x20 et on les sèche par un sèche cheveux . Les spots déposés correspondent chacun à une phase , le 4^{ème} spot étant un mélange des 3 phases . Le système solvant utilisé pour cette chromatographie est le suivant : toluène /méthanol /éther de pétrole /acétate d'éthyle (20 /10 /10 /10) volume / volume . Ce mélange est versé dans une cuve à chromatographie. Après saturation de celle-ci, le papier à chromatographie est introduit et cette dernière s'effectue.

III- 2- 3- Préparation des solutions administrées :

III- 2- 3- 1- Préparation des solutions flavonoïdiques :

Nous avons préparé la solution des *aglycones* en additionnant 50 ml d'eau distillée bouillante à l'extrait brut des *aglycones* (0.6 g) , nous avons donc obtenu une solution des *aglycones* à 12 mg /ml .

Pour préparer la solution des *monoglycosides* , nous avons ajouté 58 ml d'eau distillée bouillante à l'extrait brut des *monoglycosides* (0.7 g) . La solution obtenue est de 12 mg /ml.

De même , nous avons ajouté 100 ml d'eau distillée bouillante à l'extrait brut des *di* et des *triglycosides* (1.2 g) afin d'obtenir une solution de 12 mg /ml .

Les étapes de l'extraction sont représentées dans la figure 5.

III-2- 3- 2- Préparation de la solution de gliclazide :

Le gliclazide (DIAMICRON) est un hypoglycémiant de la famille des sulfonylurées, qui entraîne une baisse de la glycémie par action sur la libération d'insuline par le pancréas et par l'augmentation de la sensibilité cellulaire à l'insuline. Ce médicament se présente sous forme de comprimés blanc de 80 mg.

Nous avons besoin de 30 ml de la solution du gliclazide à 12 mg /ml.

$$\begin{array}{l} 12 \text{ mg du gliclazide} \longrightarrow 1 \text{ ml d'eau distillée.} \\ X \text{ mg de gliclazide} \longrightarrow 30 \text{ ml d'eau distillée.} \end{array}$$

$X = 360$ mg du gliclazide.

On dissout donc 360 mg du gliclazide soit 4 comprimés et demi dans 30 ml d'eau distillé.

III- 2- 3- 3- Préparation de la solution du glucose :

Nous avons besoin de 100 ml de la solution du glucose à 0.3 g /ml pour provoquer l'hyperglycémie .

$$\begin{array}{l} 0.3 \text{ g de glucose} \longrightarrow 1 \text{ ml d'eau distillée.} \\ X \text{ g de glucose} \longrightarrow 100 \text{ ml d'eau distillée.} \end{array}$$

$X = 30$ g de glucose .

Nous avons dissout 30 g de glucose dans 100 ml d'eau distillé.

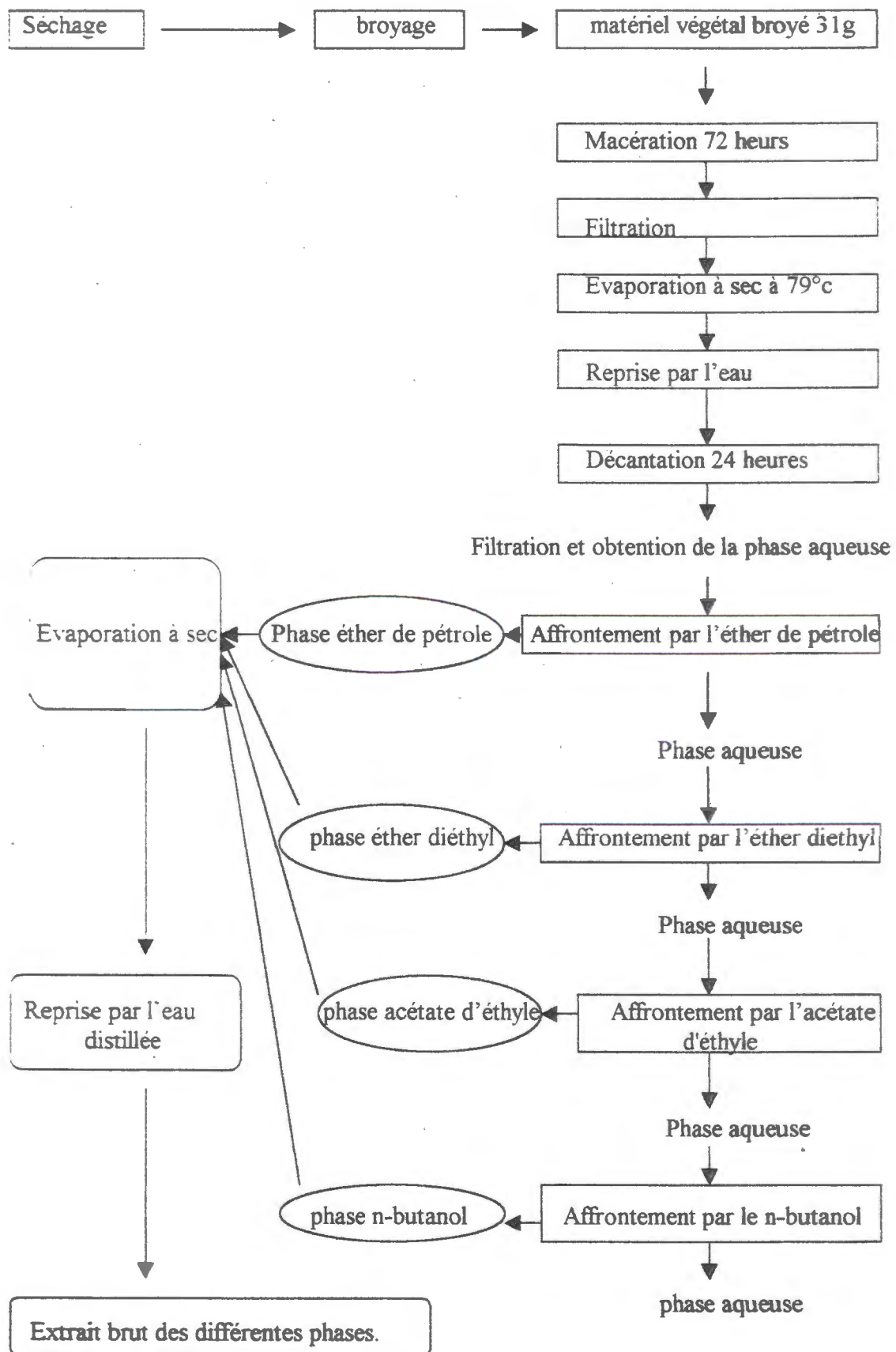


Fig.5 – Protocole d'extraction des flavonoïdes.

Lot 5	3 ml de la solution de glucose + 3 ml de la solution des <i>aglycones</i>
Lot 6	3 ml de la solution de glucose + 1 ml de la solution des <i>monoglycosides</i>
Lot 7	3 ml de la solution de glucose + 2 ml de la solution des <i>monoglycosides</i>
Lot 8	3 ml de la solution de glucose + 3 ml de la solution des <i>monoglycosides</i>
Lot 9	3 ml de la solution de glucose + 1 ml de la solution des <i>di</i> et des <i>triglycosides</i>
Lot 10	3 ml de la solution de glucose + 2 ml de la solution des <i>di</i> et des <i>triglycosides</i>
Lot 11	3 ml de la solution de glucose + 3 ml de la solution des <i>di</i> et des <i>triglycosides</i>
Lot 12	3 ml de la solution de glucose + 1ml de la solution de gliclazide
Lot 13	3 ml de la solution de glucose + 2 ml de la solution de gliclazide
Lot 14	3ml de la solution de glucose + 3 ml de la solution de gliclazide

Deux heures après l'administration, nous avons prélevé le sang des rats. De même, les échantillons subissent une centrifugation, et le plasma est réservé pour le dosage.

- **3^{ème} groupe : Evaluation de l'effet des flavonoïdes sur l'insulinémie :**

Afin d'étudier l'effet des *flavonoïdes* sur l'insulinosécrétion, nous avons procédé en premier lieu (en absence du réactif utilisé pour le dosage de l'insulinémie), à une évaluation indirecte de l'insulinémie, qui se repose sur le dosage de la kaliémie en fonction du temps après administration des *flavonoïdes*, du moment qu'une insulinosécrétion activée provoque une hypokaliémie par l'augmentation de la captation du potassium par les cellules musculaires, adipeuses et hépatiques.

Et en deuxième temps à une évaluation directe par le dosage de l'insulinémie.

- a- **Evaluation indirecte : variation de la kaliémie en fonction du temps**

Elle consiste à étudier l'effet temps des *flavonoïdes* sur la kaliémie. Pour cela nous avons utilisé 6 lots à 3 rats chacun, la dose utilisée est de 36 mg / rat. (Tableau IV)

Le prélèvement s'effectue toutes les 30 mn pendant 2 heures.

Tableau IV : distribution et traitement des animaux utilisés pour le dosage de la kaliémie

Lots	Reçoit
Lot 1= Témoin 1	1 ml d'eau distillée
Lot 2= Témoin 2	3 ml de la solution du glucose
Lot 3	3 ml de la solution du glucose + 3 ml de la solution des <i>aglycones</i>
Lot 4	3 ml de la solution du glucose + 3 ml de la solution des <i>monoglycosides</i>
Lot 5	3ml de la solution du glucose +3 ml de la solution des <i>di</i> et <i>triglycosides</i>
Lot 6	3 ml de la solution du glucose + 3 ml de la solution du gliclazide

- b- **Evaluation directe : insulinémie**

Pour étudier l'effet des *flavonoïdes* sur l'insulinémie, nous avons utilisé une dose de 36 mg / rat de chaque type de *flavonoïdes* (*aglycones*, *mono-*, *di* et *triglycosides*) administrée à jeun par voie orale. Chaque lot contient 3 rats.

Le tableau V résume ce travail.

Tableau V : Distribution et traitement des lots pour le dosage de l'insulinémie

	Reçoit
Lot 1 = témoin	1 ml d'eau distillée
Lot 2	3 ml de la solution des <i>aglycones</i>
Lot 3	3 ml de la solution des <i>monoglycosides</i>
Lot 4	3 ml de la solution des <i>di</i> et <i>triglycosides</i>

Le prélèvement s'effectue après 1 heure .

- **4^{ème} groupe : Etude histologique**

Ce groupe est destiné à être traité pour réaliser une étude histologique pour mettre en évidence le glycogène hépatique, dans le but de voir l'effet des *flavonoïdes* sur le processus de l'internalisation (stockage) du glucose dans le foie . Pour cela , nous avons utilisé 4 rats soumis à un jeûne de 18 heures :

1^{er} rat : reçoit 4 ml de la solution de glucose (0.3 g /ml) + 3 ml d'eau distillée.

2^{ème} rat : reçoit 4 ml de la solution glucosée (0.3 g /ml) + 3 ml des *aglycones*.

3^{ème} rat : reçoit 4 ml de la solution glucosée (0.3 g /ml) + 3 ml des *monoglycosides*.

4^{ème} rat : reçoit 4 ml de la solution glucosée (0.3 g /ml) + 3 ml des *di* et *triglycosides*.

Après 3 heures, nous avons sacrifié les 4 rats après anesthésie par l'éther ; les rats sont placés sur le dos et bien fixés par des épingles, et à l'aide d'une pince et d'une paire de ciseau, on réalise une dissection de l'abdomen afin d'extraire le foie. Une fois celui-ci est extrait, on le lave bien et on le conserve dans un fixateur qui est la solution du Bouin (formol / acide picrique / acide acétique).

- **5^{ème} groupe : Extraction et mise en évidence de la quantité du glycogène hépatique stocké sous l'effet des différents types de flavonoïdes**

Pour évaluer l'effet des *flavonoïdes* sur le stockage hépatique du glycogène, nous avons administré une dose de 36 mg / rat de chaque type de *flavonoïdes* en plus de 4 ml de la solution de glucose à 0.3 g /ml après un jeûne de 18 heures. L'administration se fait par voie orale. Pour cela , 4 lots à 3 rats chacun sont utilisés .

Le tableau VI résume ce travail.

Tableau VI : Distribution et traitement des lots utilisés pour la mise en évidence de la quantité de glycogène hépatique stockée sous l'effet des différents types de flavonoïdes

	Reçoit
Lot 1= T	4 ml de la solution de glucose + 3 ml d'eau distillée
Lot 3	4 ml de la solution de glucose + 3 ml de la solution des <i>aglycones</i>
Lot 4	4 ml de la solution de glucose + 3 ml de la solution des <i>monoglycosides</i>
Lot 5	4 ml de la solution de glucose + 3 ml de la solution des <i>di</i> et des <i>triglycosides</i>

Après 3 heures, nous avons effectué le sacrifice des animaux et l'extraction du foie comme il est expliqué préalablement .

III- 2- 5- Dosage :

Le dosage de la glycémie, cholestérolémie, triglycéridémie et la kaliémie a été réalisé au niveau du laboratoire central de l'hôpital de Jijel, celui de l'insulinémie, au niveau du laboratoire Ibn Sina à Constantine.

Les dosages biochimiques ont été effectués en utilisant les réactifs BIOLABO.

a - Glycémie :

Le plasma doit être séparé le plus rapidement possible, afin d'éviter la glycolyse. La glycémie est dosée selon la méthode enzymatique colorimétrique à la glucose oxydase.

Principe :

En présence de glucose oxydase, le glucose est oxydé en acide gluconique. L'eau oxygénée libérée au cours de la réaction, réagit sous l'action de la peroxydase avec le phénol et l' amino-4-phénazone. pour former un complexe rose. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en glucose.

Mode opératoire :

	Dosage	Etalon	Blanc
Echantillon	10 μ l	-	-
Etalon	-	10 μ l	-
Mélange réactif	10 μ l	10 μ l	10 μ l

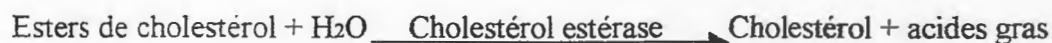
On mélange et on laisse reposer 15 mn à 37°C .La lecture de la concentration se fait directement sur le spectrophotomètre contre le blanc réactif à 500 nm . La coloration est stable une heure à l'abri de la lumière.

b - Cholestérolémie :

Le cholestérol est un constituant des membranes cellulaires et c'est le précurseur d'hormones stéroïdes et des sels biliaires. Le cholestérol peut être obtenu à partir de l'alimentation ou synthétisé dans le foie à partir de l'acétyl CoA.

Principe :

La détermination enzymatique colorimétrique du cholestérol total se fait selon les réactions suivantes :

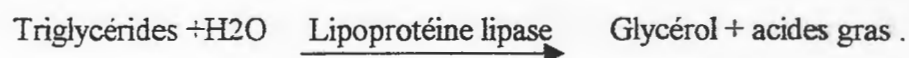
**Mode opératoire :**

	Blanc	Etalon	Dosage
Mélange réactif	1 ml	1ml	1ml
Etalon	-	10 μ l	-
Echantillon	-	-	10 μ l

On mélange, et on lit la concentration après 5 mn d'incubation à 37°C. La lecture se fait contre le blanc réactif à 500 nm. La coloration finale est stable une heure au maximum.

c- Triglycéridémie :**Principe :**

La détermination enzymatique colorimétrique des triglycérides se fait selon les réactions suivantes :



III- 2- 4- Traitement des animaux :

Les animaux sont répartis en 5 groupes :

1^{ème} groupe : Evaluation de l'effet temps des différents types de flavonoïdes sur la glycémie

Pour évaluer l'effet temps des *flavonoïdes* sur la glycémie, nous avons fait la répartition des lots à ce que nous avons obtenu 6 lots à 3 rats chacun. Nous avons administré nos principes actifs par voie orale à l'aide d'une sonde métallique, aux animaux soumis à un jeûne d'au moins 12 heures. Les rats reçoivent la même dose (à savoir 36 mg /rat).

Cette tâche est expliquée dans le tableau II .

Tableau II : Distribution et traitement des animaux pour l'étude de l'effet temps des flavonoïdes sur la glycémie .

	Reçoit
Lot 1= témoin1	1 ml d'eau distillée
Lot 2 = témoin2	3 ml de solution du glucose
Lot 3	3 ml de solution du glucose +3 ml de la solution des <i>aglycones</i>
Lot 4	3 ml de solution du glucose + 3 ml de la solution des <i>monoglycosides</i>
Lot 5	3 ml de solution du glucose + 3 ml de la solution des <i>di</i> et des <i>triglycosides</i>
Lot 6	3 ml de solution du glucose + 3 ml de la solution de gliclazide

Le prélèvement s'effectue en fonction du temps, c'est à dire nous procédons à un prélèvement toute les 30 mn pendant 02 heures. Nous avons prélevé le sang des rats à partir du sinus caverneux : un capillaire à hématocrite enfoncé dans l'angle antérieur de l'œil perce la paroi du sinus caverneux, le sang monte par capillarité, et est ensuite récupéré (environ 1.5 ml) dans des tubes à hémolyse héparinés

Les échantillons ainsi prélevés subissent une centrifugation à fin de séparer les cellules sanguines du plasma, et ce dernier est récupéré dans des épandorfs pour le dosage.

- **2^{er} groupe : Evaluation de l'effet dose des différents types de flavonoïdes sur la glycémie, cholestérolémie et la triglycéridémie :**

Pour l'évaluation de l'effet dose, nous avons fait la répartition des animaux en 14 lots à 3 rats chacun. Nous utilisons le glucose pour provoquer l'hyperglycémie, et le gliclazide (DIAMICRON) pour comparer son effet avec celui des *flavonoïdes*. Les concentrations utilisées sont les suivantes :

- la solution de glucose 0.3 g / ml.
- la solution des *aglycones* 12 mg / ml.
- la solution des *monoglycosides* 12 mg / ml.
- la solution des *di* et des *triglycosides* 12 mg / ml.
- la solution du gliclazide 12 mg/ ml.

Le tableau III résume la répartition et le traitement des animaux utilisés pour cette étude.

Tableau III : Distribution et traitement des animaux pour l'étude de l'effet dose des trois types des flavonoïdes sur la glycémie, la cholestérolémie et la triglycéridémie

	reçoit
Lot 1 = témoin 1	1 ml d'eau distillée
Lot 2 = témoin 2	3 ml de la solution de glucose
Lot 3	3 ml de al solution de glucose + 1 ml de la solution des <i>aglycones</i>
Lot 4	3 ml de la solution de glucose + 2 ml de la solution des <i>aglycones</i>

Glycérol-3-P + H₂O $\xrightarrow{\text{GPO}}$ Déshydroxyacétone phosphate + H₂O .

2 H₂O + 4 quinoantipyrine + ADPS $\xrightarrow{\text{Peroxydase}}$ quinone rouge + H₂O .

GPO = Glycérol-3-phosphate oxydase .

ADPS = N-éthyl-N-sulfopropyl -n-méthxyaniline .

Mode opératoire:

	Blanc	Etalon	Dosage
Mélange réactif	1 ml	1 ml	1 ml
Etalon	-	10µl	-
Echantillon	-	-	10µl

On mélange , et on lit la concentration après 5 mn d'incubation à 37°C . La lecture se fait contre le blanc réactif à 37°C . La coloration finale est stable 30 mn au maximum .

d- Kaliémie :

Nous avons centrifugé le sang immédiatement après le prélèvement pour empêcher la diffusion du potassium globulaire qui peut se produire dès que le sang est retiré de l'organisme. Le potassium est dosé par la photométrie de flamme, technique physique simple et rapide.

Principe :

L'excitation d'un atome peut être obtenu par passage dans une flamme, on observe alors l'émission de raies de longueurs d'ondes caractéristique de l'atome, dont l'intensité est fonction du nombre d'atomes excités.

En nébulisant la solution à doser à travers une flamme, cette dernière prend une coloration caractéristique de la nature des atomes qui la traversent et d'une intensité proportionnelle à leur concentration.

e- Insulinémie :

Le dosage de l'insulinémie est pratiqué sur le sérum, après centrifugation en évitant l'hémolyse qui gêne le dosage immuno-enzymatique, on doit apporter le sérum aussi vite que possible au laboratoire pour éviter la destruction de l'insuline par les insulinases plasmatiques. L'insuline est dosée par la méthode immuno-enzymatique dite ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

Principe :

Le principe général consiste à mettre en évidence l'insuline par l'utilisation d'un antisérum marqué par une enzyme. Cette dernière peut transformer un substrat spécifique en un produit coloré dont l'intensité de coloration indiquera la quantité d'enzyme présente et par conséquent la concentration d'insuline.

III- 2- 6- Etude histologique :

III- 2- 6- 1- Préparation des blocs :

Après fixation dans le Bouin , les fragments des foies sont submergés dans des bains d'éthanol pour la déshydratation des cellules . Les bains d'éthanol utilisés sont :60° , 70° ,80° , et 100° .

Après déshydratation par l'alcool, les échantillons subissent deux bains de xylène, et deux autres de paraffine fondue, le xylène occupe la place de l'eau et donc facilite la pénétration de la paraffine puisque cette dernière est hydrophobe.

Chaque bain (que ce soit d'éthanol, de xylène ou de paraffine) dure 24 heures.

En fin, nous avons placé les échantillons dans des moules (barres de Leucart) qui sont ensuite recouverts de la paraffine fondue à la température du laboratoire. On laisse refroidir, et les blocs seront prêts pour la réalisation des coupes.

III- 2- 6- 2- Réalisation des coupes et coloration :

Cette étape est réalisée au niveau du service d'anatomo-pathologie de laboratoire d'hygiène de Jijel.

Nous avons placé les blocs (l'un après l'autre) dans le microtome qui nous a fourni des coupes de 3 μm d'épaisseur. Nous avons réalisé plusieurs coupes pour chaque bloc afin d'obtenir de meilleures lames.

A l'aide d'une pince très fine, nous avons placé avec souplesse extrême les coupes sur les lames couvertes de gélatine (qui sert à fixer les tissus sur les lames). Les lames sont ensuite mises pendant une heure dans l'étuve afin d'éliminer la paraffine (déparaffinage).

En fin, nous avons fait deux colorations des coupes : l'une qui est la coloration de base sert à mettre en évidence les cellules hépatiques, et l'autre pour mettre en évidence les granules de glycogène.

La coloration de base se fait après réhydratation des tissus qui consiste à immerger les coupes successivement dans les bains suivants : 2 bains de toluène (30 mn), 5 bains d'éthanol 100°, 90°, 80°, 70°, 60° (5 mn chacun). Après rinçage par l'eau distillée, un bain d'hématoxyline (8 mn) est utilisé pour colorer les noyaux l'excès est enlevé par l'acide chloridrique et un bain d'éosine (8 mn) pour colorer le cytoplasme. L'excès est enlevé par l'éthanol.

La deuxième coloration consiste à immerger les lames qui ont subi la coloration de base dans un bain de lugol (l'eau iodée) pendant 15 mn puis dans un bain d'éthanol pour éliminer l'excès de lugol.

Les lames ainsi colorées sont couvertes des lamelles après mise d'une goutte de Kit (qui permet de fixer les lamelles).

Une autre série de lames est colorée par le bleu de méthylène et le lugol.

III- 2- 6- 3- Mise en évidence du glycogène :

Les lames préalablement préparées, sont maintenant observées sous microscope optique à l'aide d'un objectif 100 (après mise d'une goutte de l'huile à immersion).

Nous avons choisi les bons champs d'observation, et pris les meilleures photos.

III- 2- 7- Extraction et mise en évidence de la quantité du glycogène hépatique :

Le but de ce travail est de déterminer par la méthode colorimétrique de Beer-Lambert, la quantité du glycogène préalablement extraite d'un échantillon du foie le plus frais possible, plus le sacrifice des animaux sera récent, plus le résultat de la manipulation sera probant.

Il faut en premier lieu extraire le glycogène du foie, puis dans un deuxième temps réaliser le dosage des échantillons obtenus par rapport à une gamme étalon.

Pour cela nous avons peser et couper en petits morceaux 5 g de foie frais, qui est ensuite bouilli dans 50 ml d'eau distillée pendant 2 mn. A l'aide d'une passoire on égoutte les fragments de foie et on les broie avec le mortier. On rajoute 25 ml d'eau distillée et on fait bouillir 5 mn.

On filtre sous vide sur Buchner puis le filtrat est récupéré avec 3 gouttes d'HCl (pour précipiter les protéines) et est filtré à nouveau. Le filtrat récupéré est traité par 4 fois son

volume d'alcool à 95° puis filtré sous vide. Finalement , on récupère le filtrat final et on le reprend avec 2 ml d'eau distillée . (Fig.6)

Pour tester la présence du glycogène , on prend 3 gouttes du liquide obtenu et on rajoute une goutte de lugol (on doit obtenir une couleur brun-acajou) .

Les cuves se préparent de la manière suivante :

1 ml du liquide obtenu + 3 ml d'eau distillée + 1 goutte de lugol .

Le blanc permettant de régler le 100% de transmission se fait avec 4 ml d'eau distillée + une goutte de lugol . Les mesures se font avec une longueur d'onde de 470 nm . On place ensuite les échantillons dans le spectrophotomètre , on mesure l'absorbance , on la reporte sur la courbe d'étalonnage et on déduit ainsi la concentration en glycogène de nos 5g de foie du départ .

Les mesures qui nous ont permis de dessiner la courbe d'étalonnage sont les suivantes :

Concentration de glycogène en mg/ml	4.250	2.125	1.063	0.536
Absorbance	0.45	0.20	0.10	0.05

Ces mesures de la gamme étalon sont pris tels qu'ils sont du TP mis au point et présenté par Nadine MORANGE et Dominique GANTHEL (46), puisque nous n'avons pas du glycogène commercialisé pour préparer nous mêmes la gamme étalon.

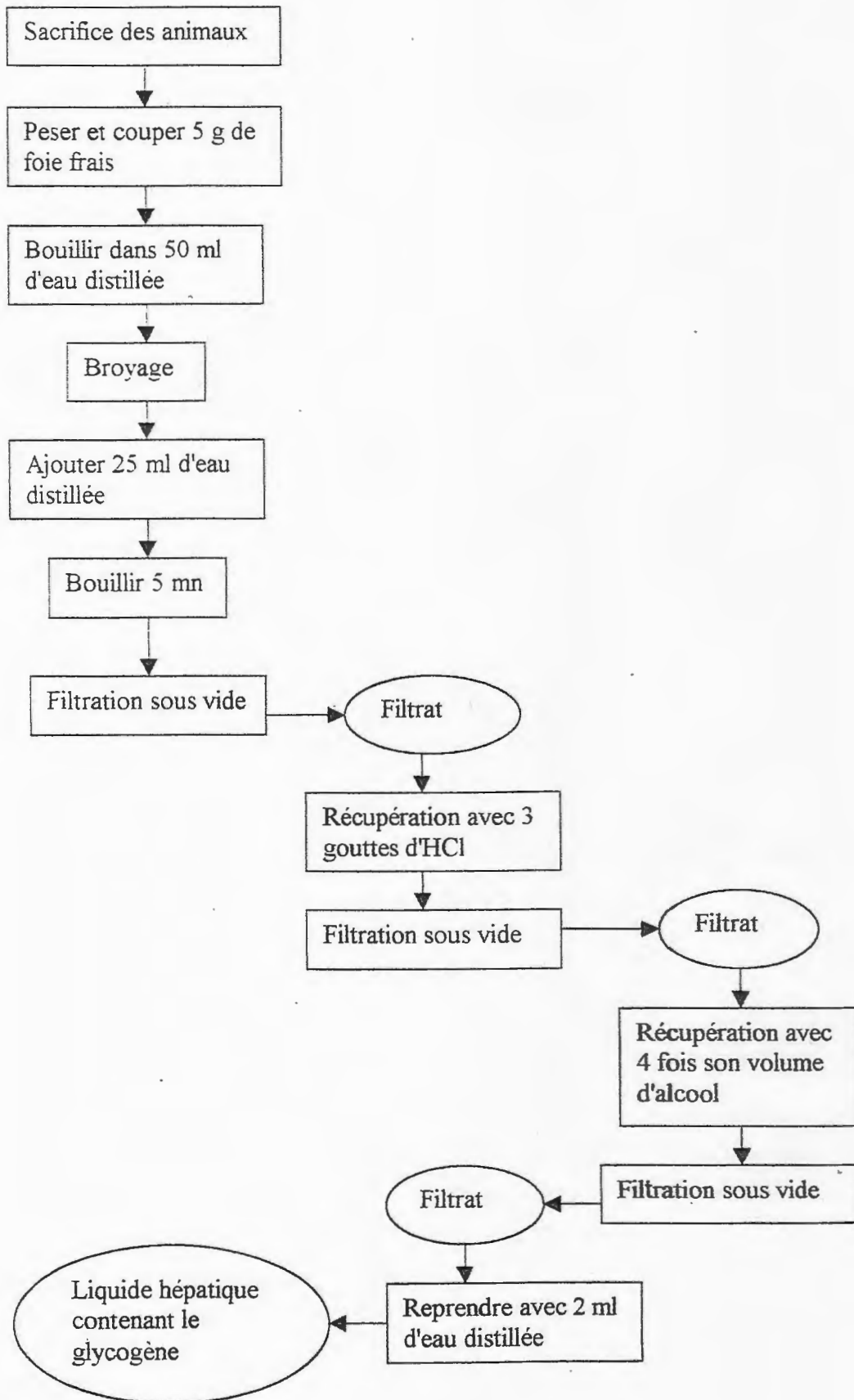


Fig. 6 - Etapes d'extraction du glycogène hépatique.

III-2- 8- Test de glycosylation *in vitro* : effet des flavonoïdes sur la concentration du glucose *in vitro*

Le but de ce test est d'estimer la capacité des *flavonoïdes* de complexer, ou bien de lier *in vitro* le glucose libre et donc de jouer un rôle de "glucophage" pour ainsi dire . Bien que les conditions *in vivo* et *in vitro* se diffèrent , ce test peut quant même donner une idée sur l'un des mécanismes par lesquels les *flavonoïdes* agissent vis-à-vis d'une hyperglycémie .

Dans un premier temps , on laisse la réaction de complexation s'effectue entre les flavonoïdes et la solution du glucose à 1 g / l pendant 15 mn à 37°C comme suit :

■ *Aglycones* :

- 10 µl de la solution du glucose + 10 µl de la solution des *aglycones* à 12 mg / ml .
- 10 µl de la solution du glucose + 10 µl de la solution des *aglycones* à 8 mg / ml .
- 10 µl de la solution du glucose + 10 µl de la solution des *aglycones* à 4 mg / ml .

■ *Monoglycosides*

- 10 µl de la solution du glucose + 10 µl de la solution des *monoglycosides* à 12 mg / ml .
- 10 µl de la solution du glucose + 10 µl de la solution des *monoglycosides* à 8 mg / ml .
- 10 µl de la solution du glucose + 10 µl de la solution des *monoglycosides* à 4 mg / ml .

■ *Di et triglycosides* :

- 10 µl de la solution du glucose + 10 µl de la solution des *di et triglycosides* à 12 mg / ml .
- 10 µl de la solution du glucose + 10 µl de la solution des *di et triglycosides* à 8 mg / ml .
- 10 µl de la solution du glucose + 10 µl de la solution de *di et triglycosides* à 4 mg / ml .

■ *Témoin* :

- 10 µl de la solution du glucose + 10 µl d'eau distillée .

Puis on passe au dosage de la concentration du glucose . Le tableau VII explique le mode opératoire .

Tableau VII : protocole du dosage de la concentration du glucose.

	Blanc	Dosage
Témoin	1 ml de réactif + 10 µl d'eau distillée .	1 ml de réactif +10 µl de la solution du glucose du témoin .
<i>Aglycones</i>	1 ml de réactif + 10 µl de la solution des <i>aglycones</i> .	1 ml de réactif + 10 µl du mélange du glucose et des <i>aglycones</i> .
<i>Monoglycosides</i>	1 ml de réactif + 10 µl de la solution des <i>monoglycosides</i> .	1 ml de réactif +10 µl du mélange du glucose et des <i>monoglycosides</i> .
<i>Di et triglycosides</i>	1 ml de réactif + 10 µl de la solution des <i>di et triglycosides</i> .	1 ml de réactif +10 µl du mélange du glucose et des <i>di et triglycosides</i> .

On lit la concentration directement sur le spectrophotomètre à la longueur d'onde de 500 nm .

III- 3- Evaluation statistique :

Les résultats numériques et graphiques sont présentés sous forme de moyenne \pm écart type .

Nous avons également fait la comparaison des moyennes par le test de Student , pour tester la significativité de la différence entre la moyenne des deux lots traité et témoin. Pour cela on doit calculer le volume de t qui est donné par la formule suivante :

$$t = \frac{|\bar{X}_A - \bar{X}_B|}{\sqrt{\frac{s_A^2}{N_A} + \frac{s_B^2}{N_B}}} \quad \text{Avec : } s^2 = \frac{s_A^2 (N_A - 1) + s_B^2 (N_B - 1)}{[(N_A - 1) + (N_B - 1)]}$$

\bar{X}_A : moyenne pour le lot témoin.

\bar{X}_B : moyenne pour le lot traité.

$|\bar{X}_A - \bar{X}_B|$ signifie la valeur absolue de la différence entre les deux moyennes.

N : le nombre de rats.

Après le calcul de t , on cherche dans la table de t la valeur correspondante au degré de liberté qui est égale à : $N_A + N_B - 2$.

La valeur trouvée par le calcul de t nous renseigne sur la signification de la différence entre le lot témoin et le lot traité selon le risque d'erreur P.

$P > 0.05$: la différence n'est significative (ns)

$0.05 > P > 0.01$: la différence est significative (*) .

$0.01 > P > 0.001$: la différence est hautement significative (**) .

$P \leq 0.001$: la signification est très hautement significative (***)

Nos résultats sont également vérifiés par l'étude de la corrélation entre les doses des principes actifs et les paramètres biochimiques étudiés en calculant « r » , le coefficient de corrélation tel que :

$$r = \text{Cov}(x,y) / S_x.S_y \quad \text{avec} \quad \text{Cov}(X,Y) = \frac{\sum XY}{N} - \bar{X} \bar{Y}$$

Si la valeur de r est voisine du zéro la corrélation est très faible, plus r tend vers 1, plus la corrélation est forte, si $r = 1$ la corrélation est parfaite.

IV- Résultats et Interprétation

IV - Résultats et interprétation :

Notre étude est divisée en deux parties : une étude sur la phytochimie de la plante *Ranunculus repens L* qui nous a permis d'extraire les différents types de flavonoïdes et de les séparer par chromatographie, et une étude de l'activité pharmacologique de ces principes actifs sur quelques paramètres biochimiques (glycémie, cholestérolémie, triglycéridémie, insulinosécrétion, glycogénogenèse hépatique et glycosylation invitro).

IV- 1- Résultat de l'extraction des différents types de flavonoïdes :

Après affrontement de l'extrait brut de la plante *Ranunculus repens L* par les solvants appropriés (éther diéthylique, acétate d'éthyle et le n-butanol), nous avons obtenu 3 types de flavonoïdes : les aglycones, les monoglycosides et les di et triglycosides. En effet, à partir de 62 g du matériel végétal broyé, nous avons obtenu :

- 0.6 g des aglycones.
- 0.7 g des monoglycosides.
- 1.2 g des di et triglycosides.

IV- 2- Résultat de la séparation des flavonoïdes :

La chromato monodimensionnelle sur plaque de silice des trois types de flavonoïdes a permis de séparer les différents spots de chaque type de flavonoïdes. après la lecture sous la lampe à UV, nous avons révélé le nombre et la couleur des spots et mesuré les RF de chacun d'eux. (Tableau VIII)

Tab. VIII : Résultats de la chromatographie monodimensionnelle sur plaque de silice (CCM)

Type de flavonoïdes	Numéro et couleur du spot	RF
Aglycones	1- rouge	0.94
	2- rouge	0.85
	3- vert	0.81
	4- bleu	0.69
	5- violet	0.66
	6- rouge	0.58
	7- rouge	0.53
	8- rouge	0.46
	9- rouge	0.42
Monoglycosides	1- violet	0.67
	2- marron-rouge	0.55
	3- violet	0.52
	4- rouge	0.50
	5- violet	0.47
	6- marron-rouge	0.43
	7- marron	0.40
	8- marron	0.39
	9- jaune	0.35
	10- marron	0.24



Di et triglycosides	1- rouge	0.78
	2- violet	0.74
	3- marron-rouge	0.71
	4- rouge	0.62
	5- bleu-vert	0.59
	6- marron	0.56
	7- bleu	0.49
	8- bleu	0.44
	9- jaune	0.41
	10- marron	0.38
	11- jaune	0.36
	12- marron	0.34
	13- jaune	0.30
	14- marron	0.28

Nous avons obtenu 33 fractions : 9 aglycones, 10 monoglycosides et 14 di et triglycosides.

IV- 3- Etude de l'effet des flavonoïdes sur la glycémie, cholestérolémie et triglycéridémie :

VI- 3- 1- Effet temps des différents types de flavonoïdes sur la glycémie :

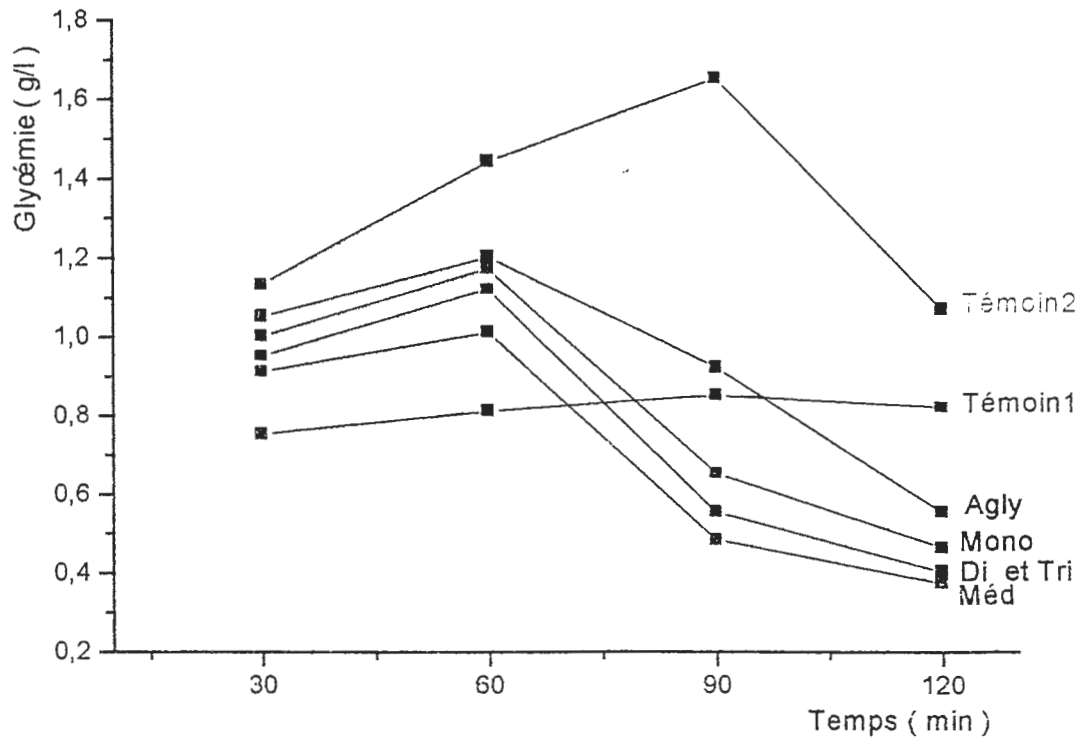
Les résultats de l'effet temps d'une dose de 36 mg/rat de chacun des trois types des flavonoïdes (aglycones, mono-, di et triglycosides), et du médicament, sont représentés dans le tableau IX et illustrés par la figure 7.

Tab. IX : Variation de la glycémie (g /l) en fonction du temps après administration d'une dose de 36 mg /rat des différents types de flavonoïdes

	30 mn	60 mn	90 mn	120 mn
Lot 1= Témoin 1	0.75 ± 0.08	0.81 ± 0.02	0.85 ± 0.05	0.82 ± 0.03
Lot 2= Témoin 2	1.13 ± 0.08	1.44 ± 0.05	1.65 ± 0.12	1.07 ± 0.06
Lot 3= Aglycones	1.05 ± 0.11 ns	1.20 ± 0.04 **	0.92 ± 0.03***	0.55 ± 0.02 ***
Lot 4= Monoglycosides	1.00 ± 0.08 ns	1.17 ± 0.04 **	0.65 ± 0.12***	0.46 ± 0.02 ***
Lot 5= Di et triglycosides	0.95 ± 0.06 *	1.12 ± 0.15 *	0.55 ± 0.12***	0.40 ± 0.02 ***
Lot 6= gliclazide	0.91 ± 0.09 ns	1.01 ± 0.12 **	0.48 ± 0.01***	0.37 ± 0.02 ***

Chaque valeur correspond à la moyenne ± l'écart type.

(test de Student : ns p > 0.05 , * p > 0.01 , ** p > 0.001 , *** p < 0.001)



Agly : aglycone
Mono : monoglycosides

Di et tri : di et triglycosides
Méd : médicament

Fig. 7 - : Variation de la glycémie en fonction du temps après administration d'une dose de 36 mg /rat des différents types de flavonoïdes

Nous observons que les variations de la glycémie du lot qui prend de l'eau distillée (lot1) est négligeable en fonction du temps.

Après administration d'une dose de 36 mg /rat de l'extrait brut des différents types de flavonoïdes, nous observons que ces trois types entraînent une chute de la glycémie à partir de 60 mn empêchant la formation du pic d'hyperglycémie existant chez le témoin à 90 mn. Cette diminution est très hautement significative pour les trois types de flavonoïdes ($p < 0.001$) par rapport au témoin. Puis-cette diminution se poursuit progressivement pour provoquer après 120 mn une hypoglycémie très apparente chez les lots traités par les mono-, di et triglycosides qui atteint 0.40 ± 0.02 g /l pour les di et triglycosides, comparable à celle du gliclazide et très hautement significative par rapport au témoin 1.07 ± 0.06 g /l.

Remarque : dans notre étude, nous avons fait la comparaison avec le témoin 2 qui prend le glucose .

IV- 3- 2- Effet dose des flavonoïdes sur la glycémie, cholestérolémie et triglycéridémie :

Les résultats de l'effet dose des flavonoïdes sur la glycémie, la cholestérolémie et la triglycéridémie sont représentés dans le tableau X .

Tab.X : Effet dose des différents types de flavonoïdes sur la glycémie, cholestérolémie et triglycéridémie (en g / l).

Lots	Glycémie	r	cholestérolémie	r	Triglycéridémie	r
Lot1= Témoin 1	0.82 ± 0.126 1.43 ± 0.104		1.11 ± 0.219		0.74 ± 0.005	
Lot2= Témoin 2			1.05 ± 0.300		0.89 ± 0.178	
Aglycones						
Lot 3 =12 mg	0.89 ± 0.022 ***		0.66 ± 0.005 ns		1.10 ± 0.330 ns	
Lot 4 =24 mg	0.65 ± 0.031 ***	-0.98	0.66 ± 0.109 ns	+0.24	1.61 ± 0.446 ns	-0.39
Lot 5 =36 mg	0.53 ± 0.104 ***		0.68 ± 0.031 ns		1.58 ± 0.288 ns	
Monoglycosides						
Lot 6 =12 mg	0.93 ± 0.044 **		0.43 ± 0.094 *		0.38 ± 0.063 ***	
Lot 7 =24 mg	0.57 ± 0.077 ***	-0.99	0.46 ± 0.005 *	+0.98	0.46 ± 0.068 ***	+0.94
Lot 8 =36 mg	0.42 ± 0.044 ***		0.55 ± 0.070 *		0.47 ± 0.083 **	
Di et triglycosides						
Lot 9 =12 mg	0.85 ± 0.044 ***		0.32 ± 0.044 *		0.74 ± 0.197 ns	
Lot10 =24 mg	0.55 ± 0.031 ***	-0.85	0.45 ± 0.02 *	+0.56	0.57 ± 0.178 *	-0.43
Lot11 =36 mg	0.39 ± 0.010 ***		0.39 ± 0.282 *		0.55 ± 0.328 *	
Gliclazide						
Lot12 =12 mg	0.5 ± 0.020 ***		-		-	
Lot13 =24 mg	0.41 ± 0.03 ***	-0.45	-	-	-	-
Lot14 =36 mg	0.37 ± 0.01 ***		-		-	

Chaque valeur correspond à la moyenne ± l'écart type.

(test de Student : ns p > 0.05 , * p > 0.01 , ** p > 0.001 , *** p < 0.001)

Les figures 8,9 et 10 montrent respectivement les variations de la glycémie, la cholestérolémie et la triglycéridémie en fonction de la dose des différents types de flavonoïdes (mono-, di et triglycosides).

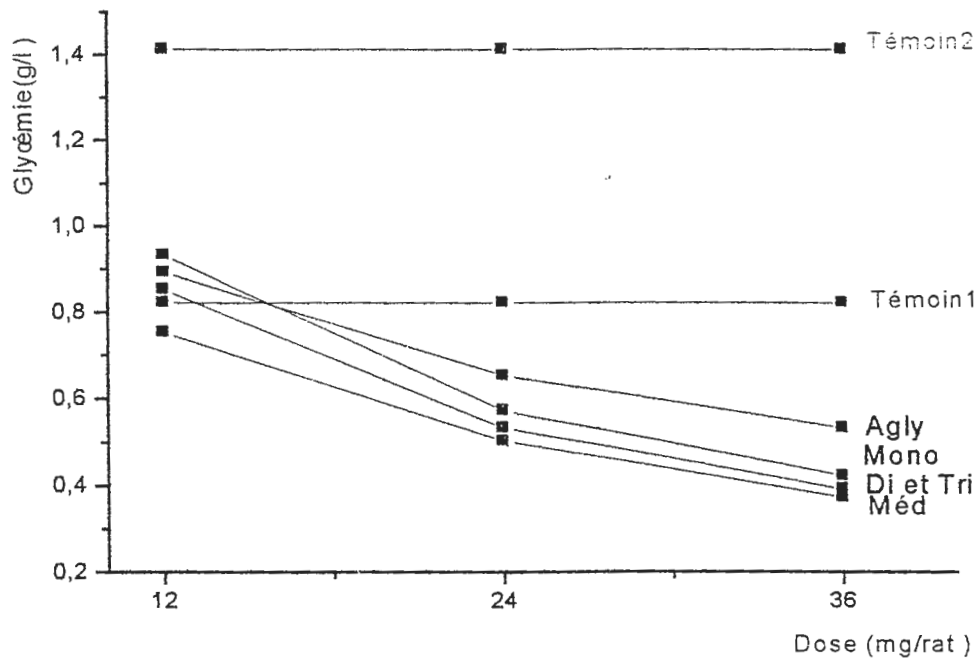


Fig. 8 – Effet dose des différents types de flavonoïdes sur la glycémie.

Agly : aglycone
 Mono : monoglycosides

Di et tri : di et triglycosides
 Méd : médicament

Nous avons constaté qu'il y a une corrélation négative (presque linéaire) entre la dose des différents flavonoïdes et la glycémie.

Nous observons également que les trois doses utilisées entraînent une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) de la glycémie . En effet, la dose de 36 mg /rat des monoglycosides et celle des di et triglycosides conduisent à une forte hypoglycémie qui atteint chez les di et triglycosides 0.39 ± 0.01 g /l par rapport au 1.43 ± 0.02 g /l du témoin et comparable à celle du gliclazide 0.37 ± 0.02 g /l.

Nous constatons aussi que les formes glycosylées donnent un effet comparable à celui de l'hypoglycémiant oral gliclazide, et mieux que celui des aglycones.

La valeur normal de la glycémie chez les rats est de 0.55 – 1.35 g /l. (10)

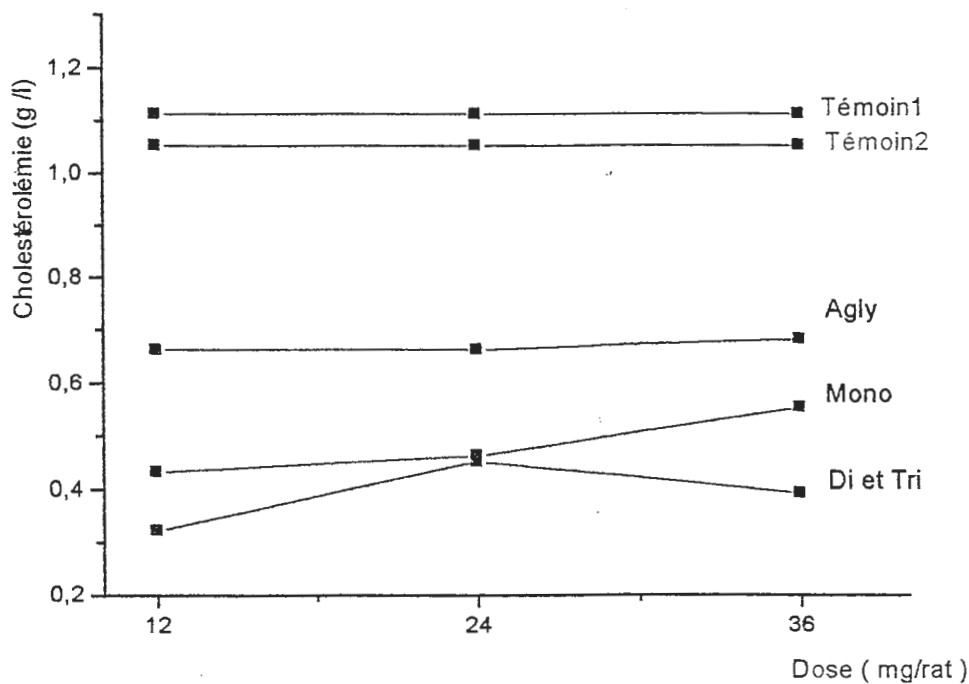


Fig. 9 – Effet dose des différents types de flavonoïdes sur la cholestérolémie.

Agly : aglycone

Mono : monoglycosides

Di et tri : di et triglycosides

Méd : médicament

Nous observons une diminution significative de la cholestérolémie chez les lots traités par les glycosides, atteint 0.32 ± 0.04 g /l à la dose de 12 mg /rat des di et triglycosides par rapport à 1.05 ± 0.300 g /l chez le lot témoin.

La diminution est non significative chez les lots traités par les aglycones.

Nous observons également une corrélation positive entre la dose des monoglycosides et la cholestérolémie. Celle-ci augmente donc progressivement à la dose de 24 et 36 mg /rat, mais la différence par rapport au témoin reste toujours significative.

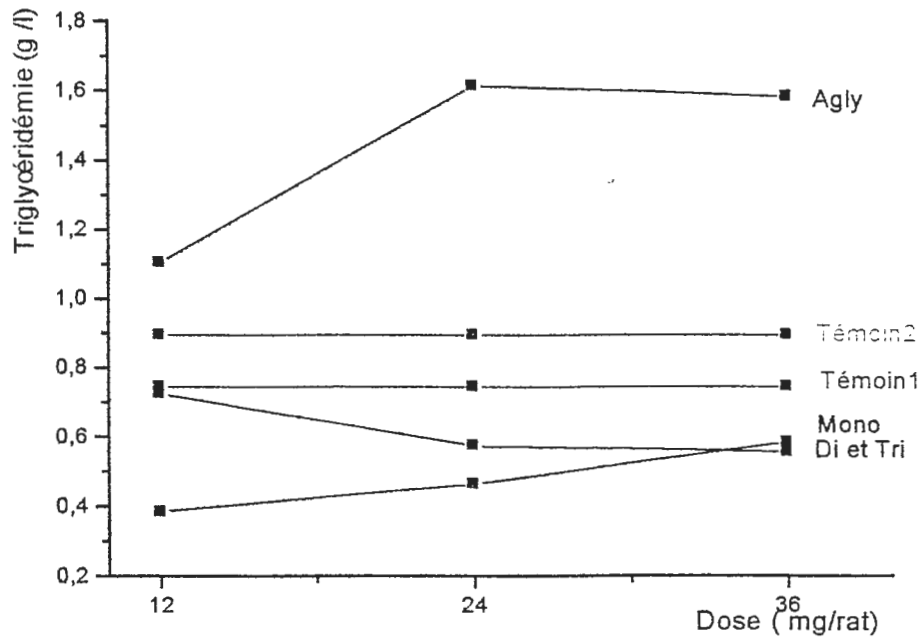


Fig. 10- Effet dose des différents types de flavonoïdes sur la triglycéridémie.

Nous observons une diminution très hautement significative et significative chez les lots traités respectivement par les monoglycosides et les di et triglycosides, et une augmentation non significative chez le lot traité par les aglycones.

Nous constatons également une corrélation positive entre la dose des monoglycosides et la triglycéridémie.

IV- 4- Résultats de l'extraction et mise en évidence de la quantité du glycogène hépatique stocké sous l'effet des flavonoïdes :

La gamme étalon qui nous a permis de déduire la concentration du glycogène est la suivante : (Figure.11)

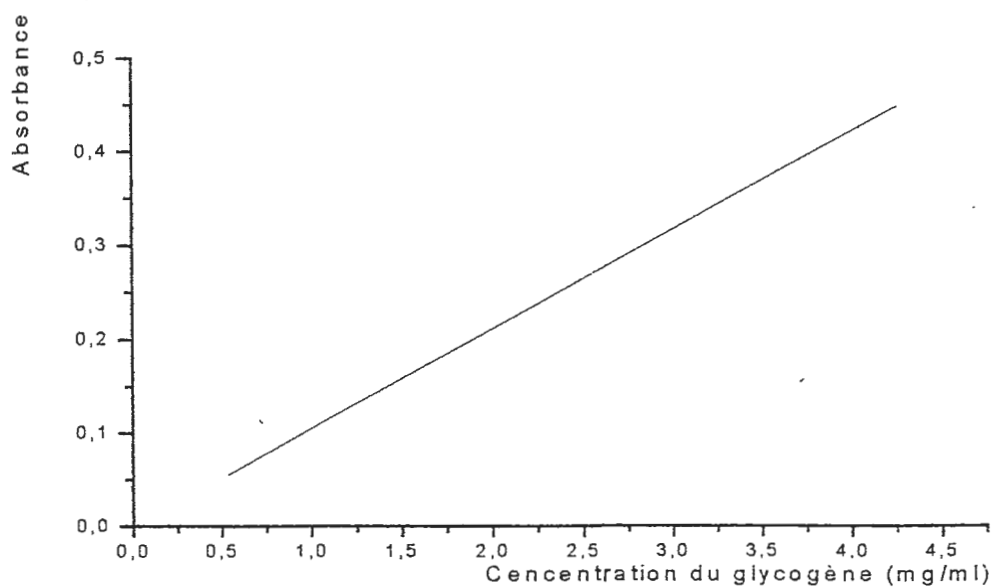


Fig. 11 – Gamme étalon du glycogène.

Les résultats de la quantification du glycogène hépatique stocké sous l'effet d'une dose de 36 mg /rat de différents types de flavonoïdes sont représentés dans le tableau XI et illustrés par la figure 12 ci-dessous.

Tab. XI : Variation de la quantité du glycogène hépatique stocké en fonction de la dose des flavonoïdes

Lots	[Glycogène] en mg /ml
Lot 1 = Témoin	2.72 ± 0.134
Lot 2 = Aglycones	4.43 ± 0.503 **
Lo 3 = Monoglycosides	4.63 ± 0.107 ***
Lot 4 = Di et triglycosides	6.60 ± 0.715 ***

Chaque valeur correspond à la moyenne ± l'écart type.
(test de Student : ** p > 0.001 , *** p < 0.001)

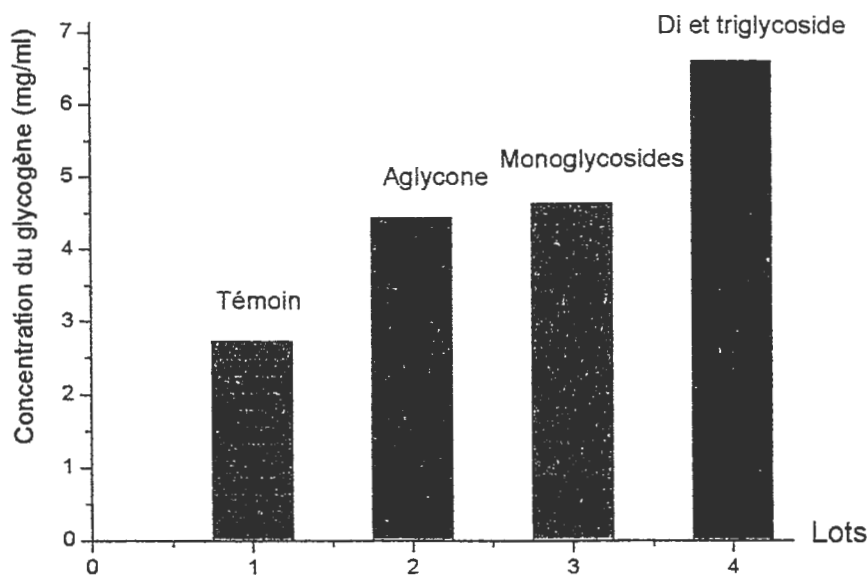


Fig .12 – concentration du glycogène hépatique stocké sous l'effet des différents types de flavonoïdes

Agly : aglycone
Mono : monoglycosides

Di et tri : di et triglycosides
Méd : médicament

A la dose de 36 mg /rat, nous avons constaté une augmentation très hautement significative de la quantité du glycogène hépatique stocké sous l'effet des glycosides atteint 4.63 ± 0.503, 6.60 ± 0.415 mg /ml chez les mono et les di et triglycosides respectivement, et une augmentation hautement significative sous l'effet des aglycones atteint 4.43 ± 0.503 mg /ml contre 2.72 ± 0.134 mg /ml chez le lot témoin.

IV- 5- Résultat de l'étude histologique :

Le tissu hépatique est formé de lobules de forme polyédrique , au centre des lobules se trouve la veine centrolobulaire .

Les hépatocytes ont une forme polygonale , chaque hépatocyte contient un noyau arrondi , le cytoplasme renferme un reticulume endoplasmique très abondant et du glycogène .

Chez le témoin (photo 1), le cytoplasme hépatocytaire renferme des granules de glycogène de couleur brun-acajou, ces granules ne sont pas réparties de façon homogène dans tout le cytoplasme .

Le traitement par les aglycones (photo 2) montre un tissu hépatique où le glycogène se répartit sous forme d'agrégats et de façon plus abondante par rapport au témoin.

On note les mêmes observations chez le tissu du rat traité par les monoglycosides (photo 3) .

Par contre , le traitement par les di et triglycosides donne une coupe histologique (photo 4) où les hépatocytes renferment le glycogène qui se voit diffusé et couvre tout le cytoplasme à l'exception des espaces péri nucléaires.

Pour la coloration par le bleu de méthylène + lugol, nous n'avons pas pu réaliser que deux lames.

Nous observons le cytoplasme hépatocytaires du tissu hépatique du rat traité par 36 mg des aglycones (photo 6) est envahi par la couleur brun acajou qui montre le glycogène diffusé dans tout le cytoplasme par rapport au témoin (photo 5) où la couleur brun acajou du glycogène est très claire.

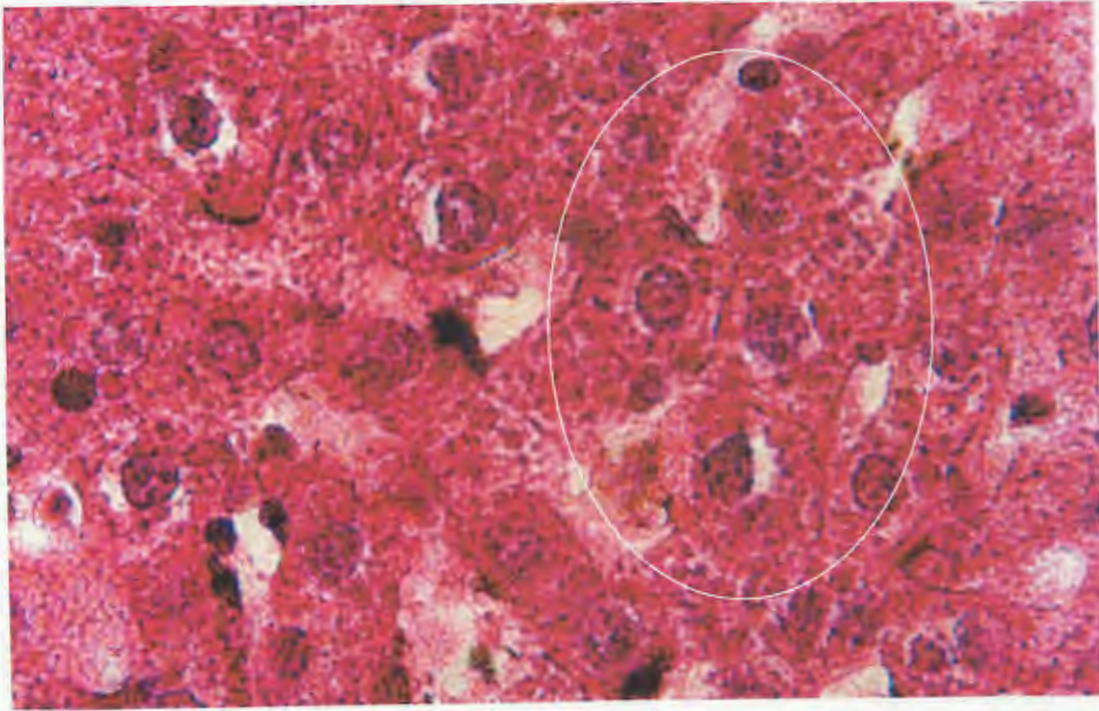


Photo1- tissu hépatique du rat témoin.
Coloration par l'hématoxyline +éosine + lugol.

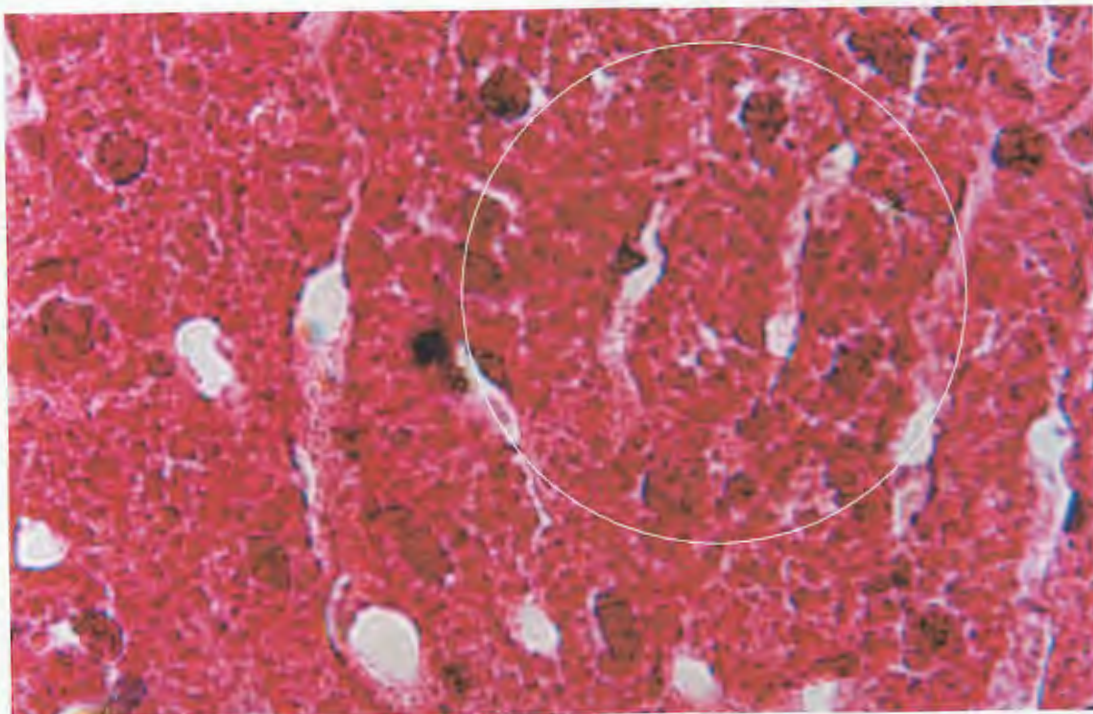


Photo -2- tissu hépatique du rat traité par 36mg de l'extrait brut des aglycones.
Coloration par l'hématoxyline + eosine+ lugol.(X100)

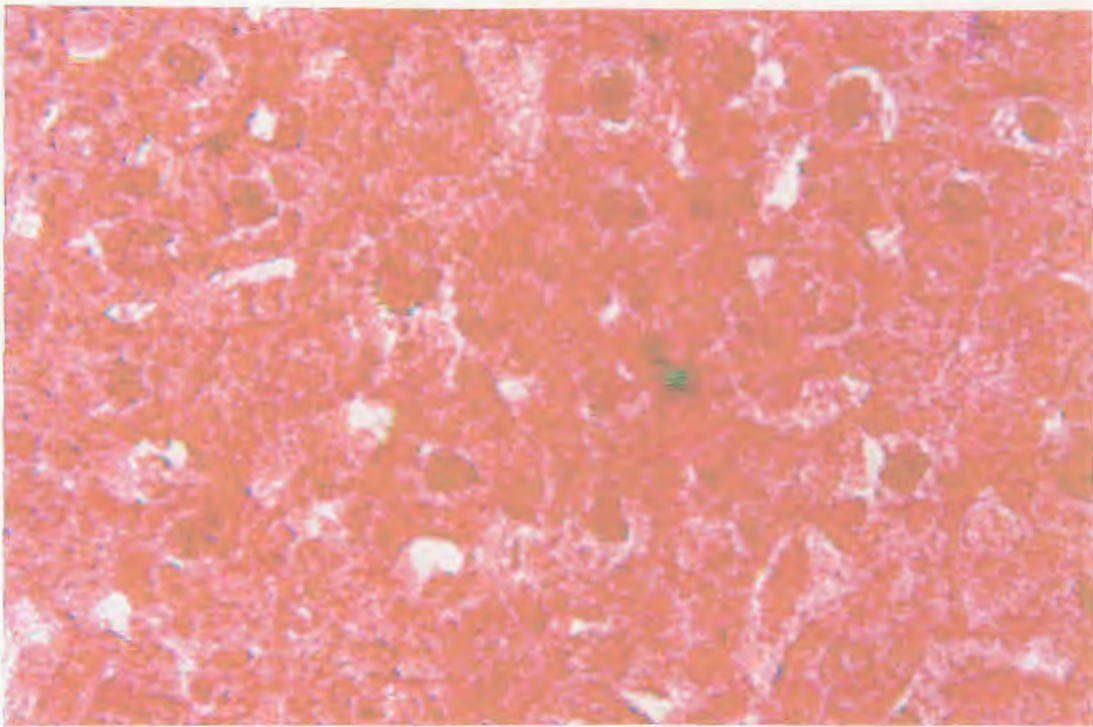


Photo3-tissu hépatique du rat traité par 36mg de l'extrait brut des monoglycosides.
Coloration par l'hématoxyline + éosine + lugol (X100)

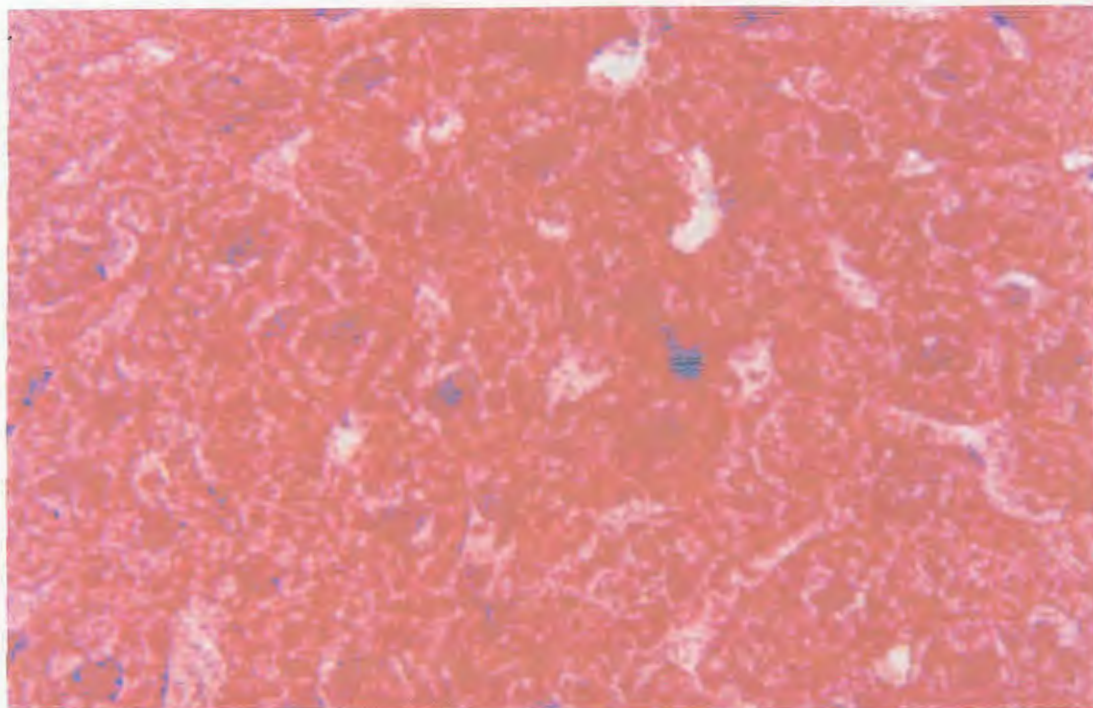


Photo4-tissu hépatique du rat traité par 36mg des di- et triglycosides.
Coloration par l'hématoxyline + éosine + lugol (X100)

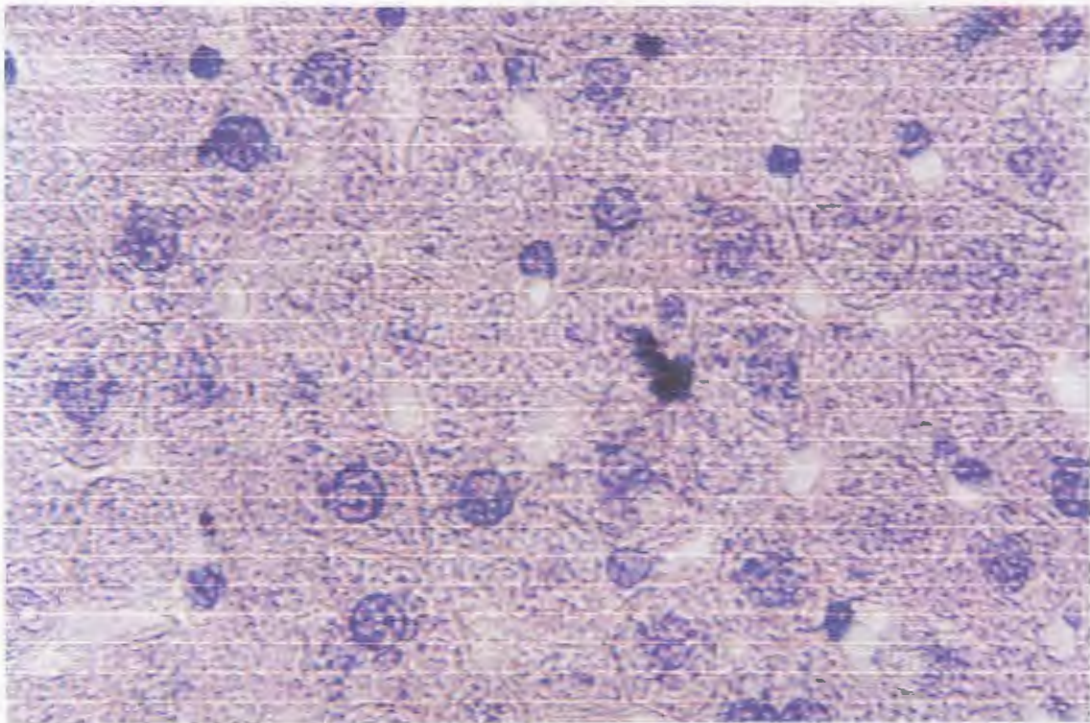


Photo5-tissu hépatique du rat témoin.
Coloration par le Bleu de méthylène + lugol. (X100)

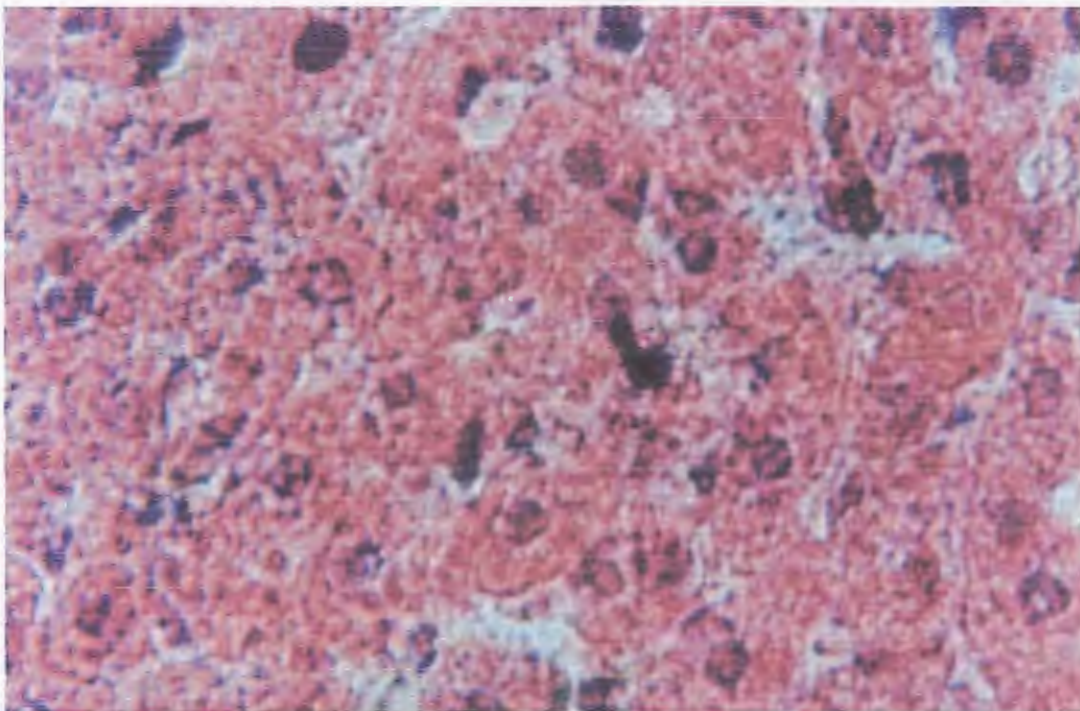


Photo6- tissu hépatique du rat traité par 36mg de l'extrait brut des aglycones.
Coloration par le Bleu de méthylène + lugol.(X100)

IV- 6- Résultats de l'effet des flavonoïdes sur l'insulinémie :

IV- 6- 1- Evaluation indirecte : Kaliémie :

Le tableau XII et la figure 13 montrent la variation du taux de potassium en fonction du temps après administration d'une dose de 36 mg / rat des différents types de flavonoïdes et du gliclazide.

Tab. XII : Variation de la kaliémie (en mmol /l) en fonction du temps après administration d'une dose de 36 mg des différents types de flavonoïdes

	30mn	60 mn	90 mn	120 mn
Lot 1=Témoin1	5.45 ± 0.03	5.65 ± 0.139	5.53 ± 0.08	5.48 ± 0.09
Lot 2=Témoin 2	6.22 ± 0.10	7.03 ± 0.77	6.34 ± 0.16	5.30 ± 0.12
Lot 3=Aglycones	5.89 ± 0.03 **	6.35 ± 0.44 ns	5.95 ± 0.15 ns	5.35 ± 0.03 ns
Lot 4=Monoglycosides	5.80 ± 0.05 **	6.20 ± 0.06 *	5.85 ± 0.04 ***	4.25 ± 0.07 ***
Lot5=Di et triglycosides	5.83 ± 0.22 ns	6.32 ± 0.02 **	5.68 ± 0.191 **	4.23 ± 0.15 ***
Lot 6=gliclazide	5.80 ± 0.11 *	6.05 ± 0.44***	5.45 ± 0.05 ***	4.10 ± 0.21 ***

Chaque valeur correspond à la moyenne ± l'écart type.

(test de Student : ns p > 0.05 , * p > 0.01 , ** p > 0.001 , *** p < 0.001)

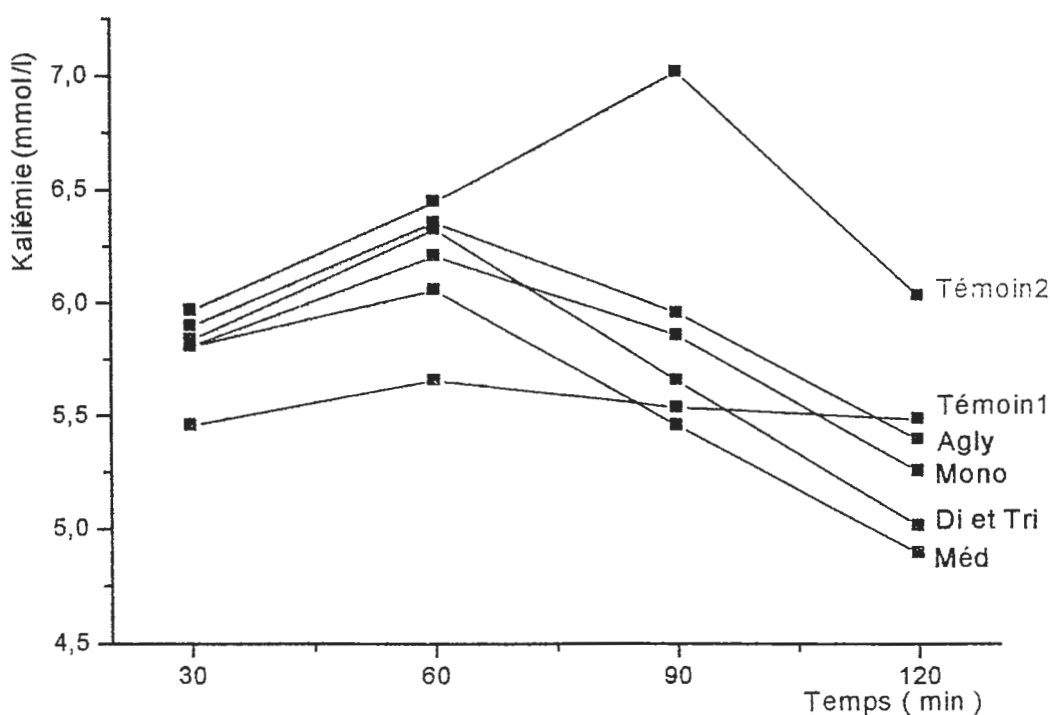


Fig.13 - Variation de la kaliémie en fonction du temps après administration d'une dose de 36 mg /rat des différents types de flavonoïdes.

Agly : aglycone
Mono : monoglycosides

Di et tri : di et triglycosides
Méd: médicament

Chez le lot traité par les aglycones, nous constatons une diminution hautement significative de la kaliémie après 30 mn. Cette diminution devient non significative à 60, 90 et 120 mn. Par contre, nous constatons une chute significative et hautement significative de la kaliémie à 60 mn chez le lot traité par les monoglycosides et les di et triglycosides respectivement. Cette diminution se poursuit à 90 mn et provoque après 120 mn une diminution très hautement significative par rapport au témoin, qui atteint 4.23 ± 0.07 g/l, comparable à celle du gliclazide (4.10 ± 0.21 g/l).

La valeur normal de la kaliémie chez les rat est de 5.5 – 7 mmol/l. (10)

IV- 6- 2- Evaluation directe : insulinémie

Le tableau XIII représente les résultats du dosage immuno-enzymatique de l'insulinémie chez les lots traités par une dose de 36 mg / rat de l'extrait brut des trois types de flavonoïdes (aglycones, mono-, di et triglycosides) et chez le lot témoin.

Tab. XIII : Variation de l'insulinémie (μU /ml) après administration d'une dose de 36 mg /rat des trois types de flavonoïdes.

Lots	Lot 1= Témoin	Lot2=Aglycones	Lot 3=Mono	Lot 4=Di et tri
Insulinémie (μU /ml)	0.0 ± 0.0	0.03 ± 0.04	0.03 ± 0.04	0.06 ± 0.03

Chaque valeur correspond à la moyenne ± l'écart types.

Nous observons que les valeurs de l'insuline émie sont très faibles chez les traités et nulle chez le lot témoin. Mais malgré ces faibles valeurs, le tableau montre que les aglycones et les monoglycosides ont le même effet sur l'insulinémie, et que les di et triglycosides ont un effet mieux.

IV- 7- Résultats de l'effet des flavonoïdes sur la complexation in vitro :

La variation de la concentration du glucose en fonction de la dose des différents types de flavonoïdes (aglycones, mono-, di et triglycosides) sont représentés dans le tableau XIV et la figure 14.

Tab. XIV : Variation de la concentration du glucose (g/l) et du degré de la réduction du taux de glucose en fonction de la concentration des différents types de flavonoïdes.

Concentration des principes actifs	[Glucose] (g/l)	Degré de réduction du taux de glucose
<u>Aglycones</u>		
4 mg/ml	0.33	45.90 %
8 mg/ml	0.25	59.01 %
12 mg/ml	0.23	62.29 %
<u>Monoglycosides</u>		
4 mg/ml	0.23	62.29 %
8 mg/ml	0.21	65.57 %
12 mg/ml	0.20	67.21 %
<u>Di et triglycosides</u>		
4 mg/ml	0.19	68.85 %
8 mg/ml	0.11	81.96 %
12 mg/ml	0.09	85.20 %

Le témoin = 0.61 g/l.

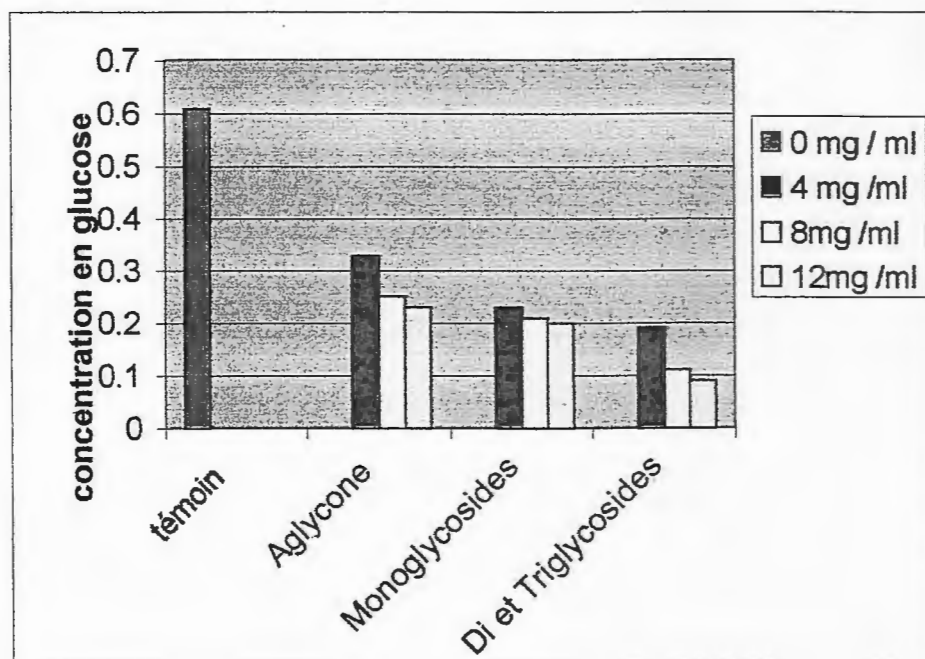


Fig. 14 - Variation de la concentration du glucose (g / l) en fonction de la concentration des différents types de flavonoïdes.

Nous observons que les trois types de flavonoïdes ont une capacité très apparente de la réduction du taux de glucose in vitro. Cette capacité est dose dépendante.

A la concentration de 4 mg, nous constatons une chute considérable de la concentration de glucose qui atteint 0.33, 0.23 et 0.19 g / l avec les aglycones, les mono-, les di et triglycosides respectivement contre 0.61 g / l du témoin.

La diminution de la concentration du glucose se poursuit à la dose de 8 et 12 mg pour atteindre 0.23 et 0.20 g / l avec les aglycones et les monoglycosides respectivement, et tend vers le zéro (0.09 g / l) avec les di et triglycosides contre 0.61 g / l du témoin.

Nous constatons également que le degré de la réduction du taux de glucose dans le milieu est proportionnelle à la concentration des principes actifs. A la dose de 12 mg / ml, ce degré de réduction atteint 62.29 %, 67.21 % et 85.20 % sous l'effet des aglycones, monoglycosides et di et triglycosides respectivement.

■ Résultats de quelques activités pharmacologiques de la chlorophylle :

C'est par défaut d'utilisation de l'éther de pétrole au lieu de l'éther diéthylique que nous avons fait l'extraction de la chlorophylle, avant de corriger et poursuivre notre extraction des flavonoïdes. Nous l'avons considéré comme aglycones et l'avons testé sur tous les paramètres étudiés pour les flavonoïdes.

C'est la chlorophylle qui a la capacité unique de capter l'énergie solaire et de synthétiser les sucres à partir du carbone atmosphérique.

Le terme « Soigner » a été associé à cette couleur verte à travers l'histoire, car la thérapie par la chlorophylle n'a pas d'effet secondaire toxique. Lors de ces dernières années, les investigations

ont démontré que la chlorophylle inversait la capacité mutagène de certains produit chimiques cancérigènes .

C'est cette chlorophylle qui, associée au fer, intervient dans la production de l'hémoglobine. Elle est avant tout anti-anémique et antiseptique.

La chlorophylle stimule les muscles et les nerfs, combat la constipation, diminue le taux du cholestérol et favorise la diurèse .(45)

Dans ce domaine, le travail peut fournir d'autres rôles thérapeutiques à la chlorophylle.

1- Résultats du fractionnement de l'extrait brut de la chlorophylle :

Les résultats de la chromato monodimensionnelle sur plaque de silice sont représentés dans le tableau XV ci-dessous.

Tab.XV :chromato monodimensionnelle sur plaque de silice de l'extrait brut de la chlorophylle

Phase	Nombre des spots	RF
Ether de pétrole	1-orange	0.61
	2-vert jaunâtre	0.55
	3-jaune	0.48
	4-jaune	0.45
	5-vert	0.42
	6-vert jaunâtre	0.34

La chromatographie monodimensionnelle sur plaque de silice a permis de séparer les différents pigments de la chlorophylle :

- Les carotènes de couleur orange.
- La xanthophylle de couleur jaune.
- La chlorophylle.
-

2- Effet temps de la chlorophylle sur la glycémie :

Les variations de la glycémie en fonction du temps après administration d'une dose de 36 mg /rat de la chlorophylle sont représentées dans le tableau XVI et illustrées par la figure 15.

Tab. XVI : Effet temps d'une dose de 36 mg /ml de la chlorophylle sur la glycémie . (g /l)

	30 mn	60 mn	90 mn	120 mn
Lot 1= témoin 1	0.75 ± 0.08	0.81 ± 0.02	0.85 ± 0.05	0.82 ± 0.03
Lot 2= témoin 2	1.13 ± 0.08	1.44 ± 0.05	1.65 ± 0.12	1.07 ± 0.06
Lot 3= chlorophylle	1.05 ± 0.460 ns	1.22 ± 0.120 *	0.73 ± 0.04 ***	0.51 ± 0.01 ***
Lot 4= gliclazide	0.91 ± 0.09 ns	1.01 ± 0.12 **	0.48 ± 0.015 ***	0.37 ± 0.002 ***

Chaque valeur correspond à la moyenne ± l'écart type.
(test de Student : ns p > 0.05 , ** p > 0.001 , *** p < 0.001)

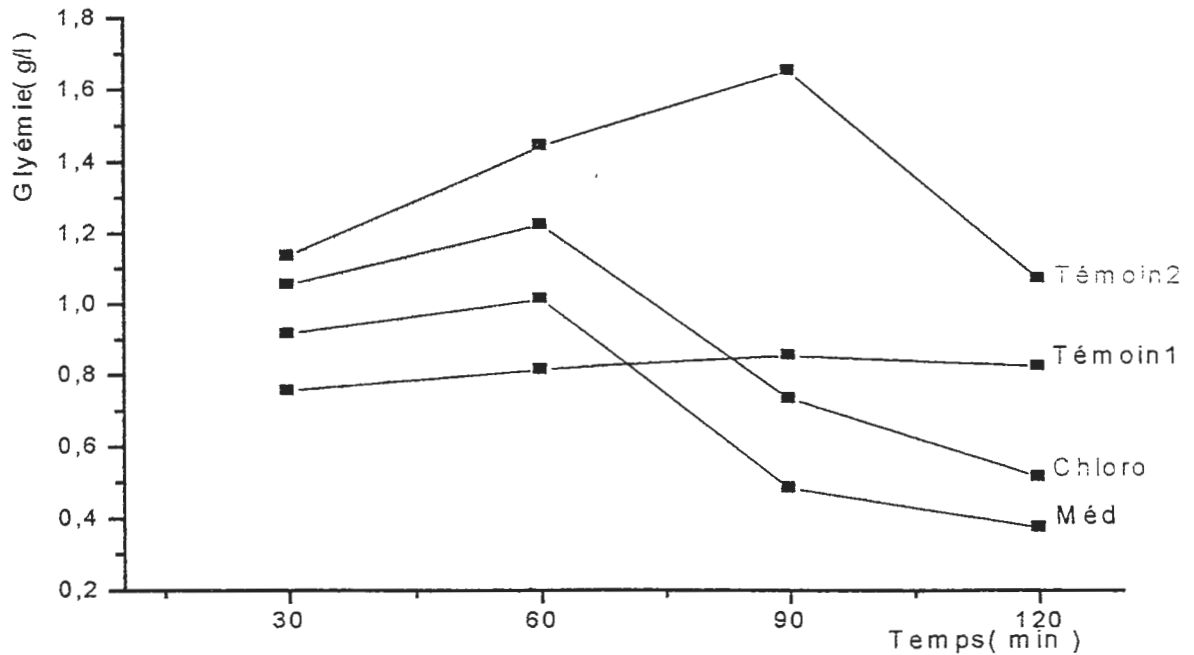


Fig .15- Effet temps d'une dose de 36 mg de la chlorophylle sur la glycémie.

Chloro : chlorophylle

Méd : médicament

Après administration d'une dose de 36 mg /rat de l'extrait brut de la chlorophylle, nous observons une diminution de la glycémie à partir de 60 mn empêchant le pic hyperglycémique observé chez le témoin à 90 mn. Cette diminution très hautement significative ($p < 0.001$) se poursuit progressivement pour atteindre $0.73 \pm 0.04g /l$ à 90 mn et provoquer une nette hypoglycémie à 120 mn qui atteint $0.51 \pm 0.01g /l$, comparable à celle du gliclazide $0.37 \pm 0.002 g /l$ ($p < 0.001$).

3- Effet dose de la chlorophylle sur la glycémie, cholestérolémie et triglycéridémie :

Cette étude est résumée dans le tableau XVII.

Tab.XVII : Effet dose de la chlorophylle sur la glycémie, cholestérolémie et triglycéridémie. (g /l)

	Glycémie	r	Cholestérolémie	r	Triglycéridémie	r
Témoins						
Lot 1	0.82 ± 0.126		1.11 ± 0.219		0.74 ± 0.005	
Lot 2	1.43 ± 0.104		1.05 ± 0.300		0.89 ± 0.178	
Chlorophylle						
Lot 3 (12 mg)	0.86 ± 0.083 ***		0.35 ± 0.74 **		0.46 ± 0.50 *	
Lot 4 (24 mg)	0.57 ± 0.074 ***	-0.47	0.39 ± 0.046 **	+0.86	0.40 ± 0.06 **	-0.30
Lot 5 (36 mg)	0.45 ± 0.016 ***		0.50 ± 0.138 *		0.36 ± 0.102 *	
Médicament						
Lot 6 (12 mg)	0.75 ± 0.02 ***		-		-	
Lot 7 (24 mg)	0.50 ± 0.03 ***	0.68	-		-	
Lot 8 (36 mg)	0.37 ± 0.01 ***		-		-	

Chaque valeur correspond à la moyenne \pm l'écart type.
 (test de Student : * $p > 0.01$, ** $p > 0.001$, *** $p < 0.001$)

Les figures 16, 17, 18 montrent l'effet dose de la chlorophylle sur la glycémie, la cholestérolémie et la triglycéridémie respectivement.

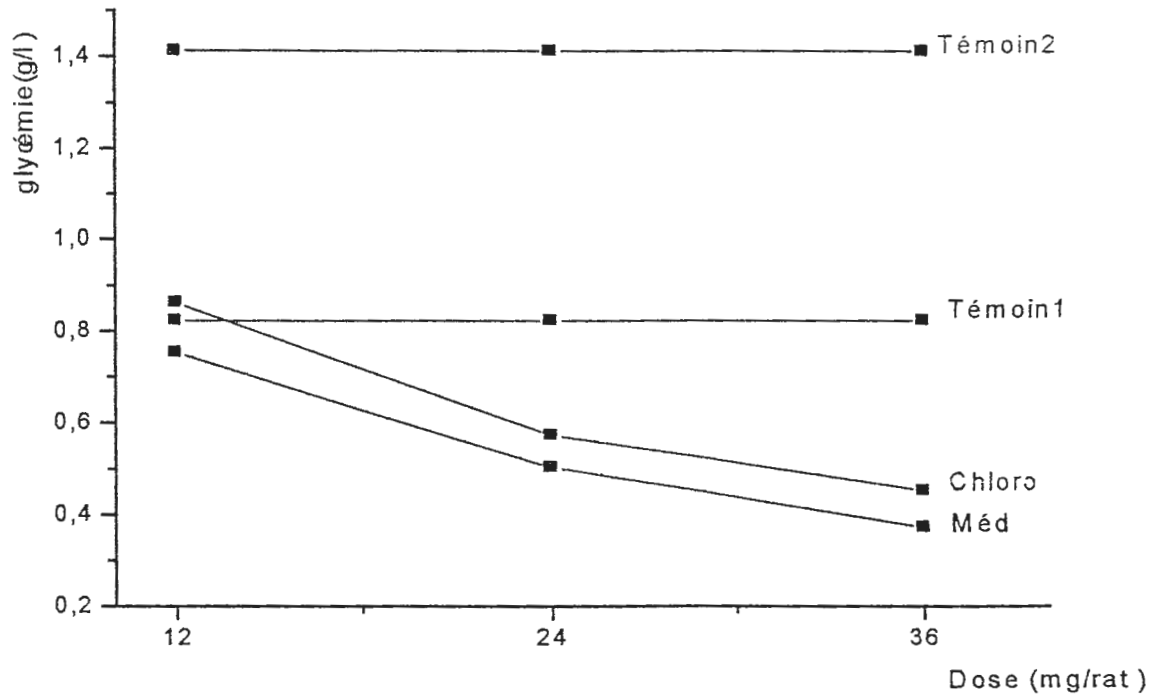


Fig.16 - Effet dose de la chlorophylle sur la glycémie .

Chloro : chlorophylle

Méd : médicament

Nous avons constaté une diminution continue de la glycémie en fonction de la dose administrée de la chlorophylle. Cette diminution est très hautement significative ($p < 0.001$) pour les trois doses, qui atteint 0.57 ± 0.074 g /l à la dose de 24 mg /ml et provoque une forte hypoglycémie à la dose de 36 mg /ml qui atteint 0.45 ± 0.016 g /l contre 1.43 ± 0.104 g /l chez le témoin et 0.37 ± 0.01 g /l chez le rat traité par le gliclazide.

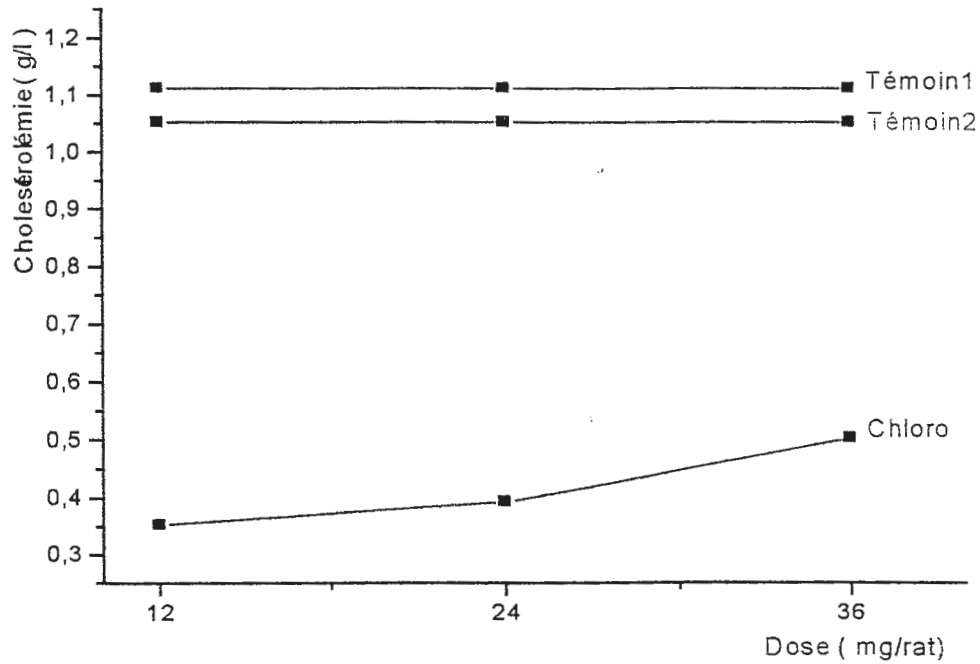


Fig.17 – Effet dose de la chlorophylle sur la cholestérolémie

Chloro : chlorophylle

Méd : médicament

Nous avons constaté une chute hautement significative ($p < 0.01$) de la cholestérolémie à la dose de 12 et 24 mg /rat qui atteint 0.35 ± 0.074 et 0.39 ± 0.046 g /l respectivement contre 1.05 ± 0.300 g /l chez le témoin, et significative à la dose de 36 mg /rat.

Nous avons constaté également qu'il y a une corrélation positive entre la dose de la chlorophylle et la cholestérolémie ($r = +0.99$) mais la différence avec le témoin reste toujours significative.

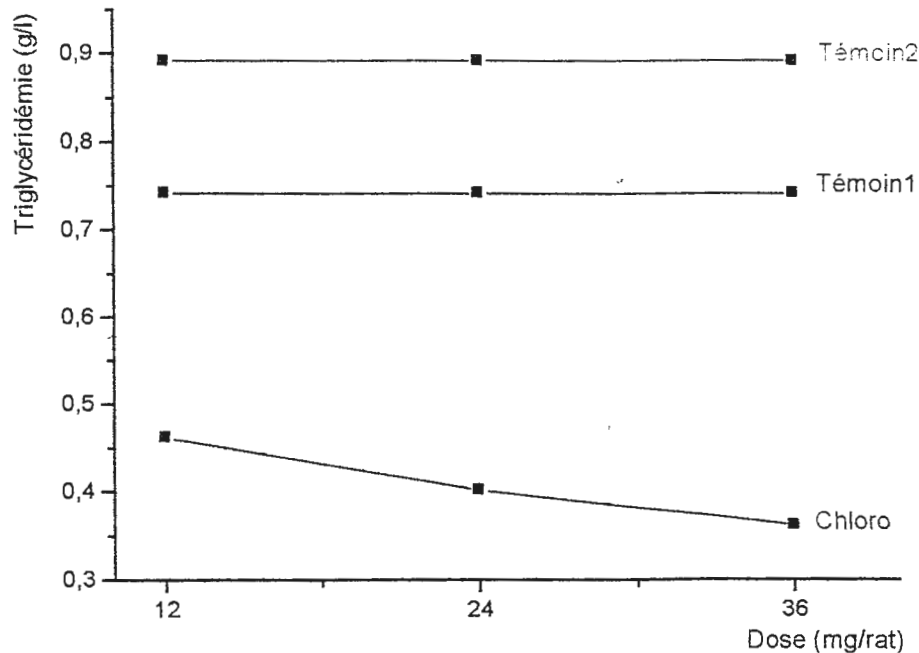


Fig .18 – Effet dose de la chlorophylle sur la triglycéridémie

Chloro : chlorophylle

Méd : médicament

Nous avons remarqué une chute significative du taux des triglycérides à la dose de 12 et 36 mg /rat qui atteint 0.46 ± 0.50 et 0.36 ± 0.102 g /l respectivement, et hautement significative à la dose de 24 mg /rat qui atteint 0.40 ± 0.6 g /l contre 0.89 ± 0.178 g /l chez le témoin.

Nous constatons également une corrélation négative ($r = - 0.97$) entre la dose de la chlorophylle et la triglycéridémie.

4- Etude histologique :

Les photos 1 et 7 montrent le tissu hépatique du rat traité par 36 mg de la chlorophylle et celle du témoin après réalisation des coupes histologiques et coloration.

Chez le témoin (phot 1), le cytoplasme renferme le glycogène montré (de couleur brun acajou) sous forme de granulation qui ne sont pas réparties de façon homogène dans le tissu.

Le traitement par une dose de 36 mg /rat de l'extrait brut de la chlorophylle donne une coupe histologique (photo 7) où les hépatocytes renferment le glycogène en abondance. Le cytoplasme est observé envahi par la couleur brun acajou du glycogène (coloré par le lugol).

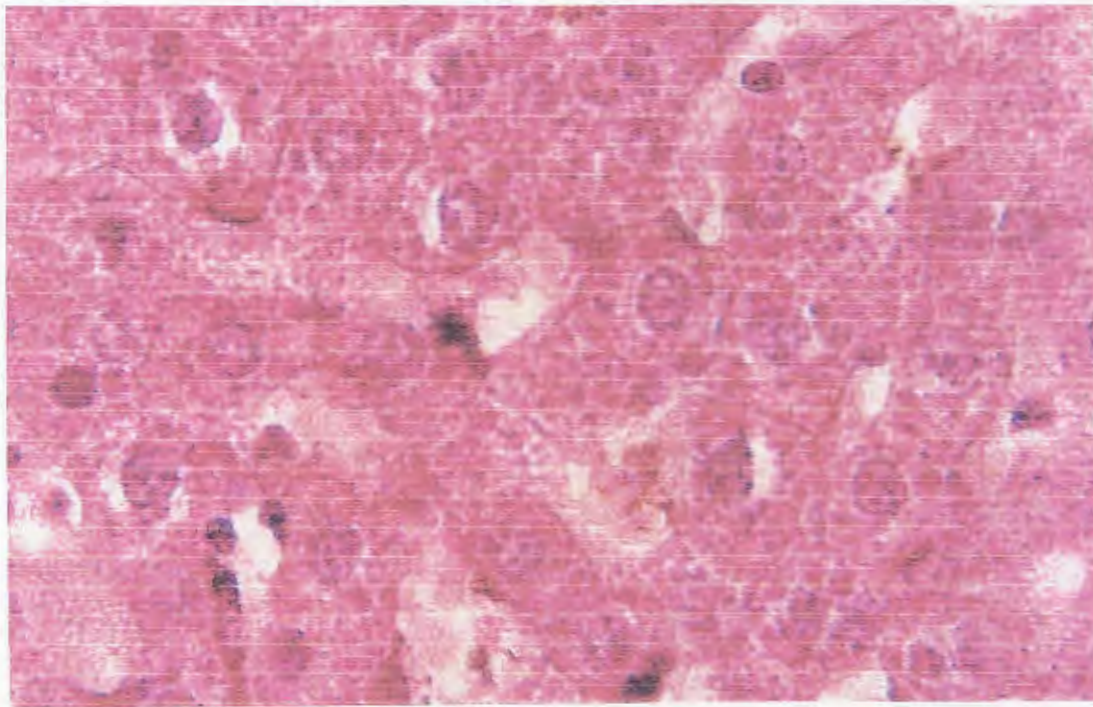


Photo1- tissu hépatique du rat témoin.
Coloration par l'hématoxyline + éosine + lugol. (X100)

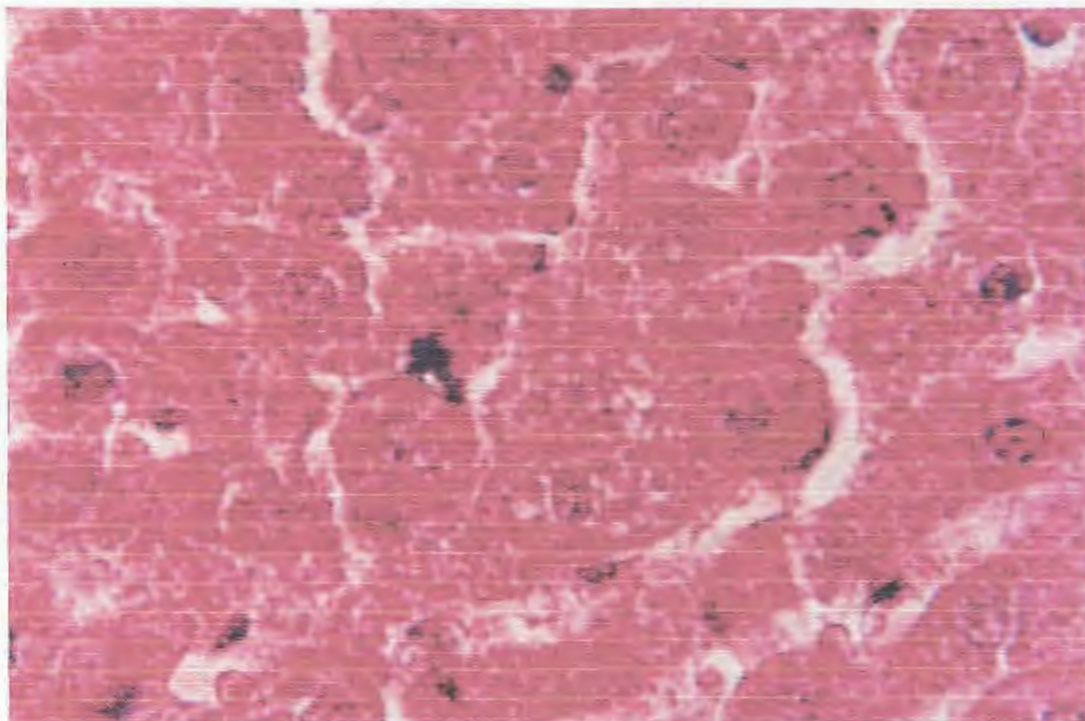


Photo 7- tissu hépatique du rat traité par 36 mg de l'extrait brut de la chlorophylle.
Coloration par l'hématoxyline+éosine +lugol.(X100)

5- Effet de la chlorophylle sur la quantité du glycogène hépatique stocké :

Le tableau XVIII et la figure 19 montrent la concentration du glycogène hépatique stocké sous l'effet d'une dose de 36 mg de la chlorophylle.

Tab.XVIII : Variation de la quantité du glycogène hépatique sous l'effet d'une dose de 36 mg de la chlorophylle

Lots	Lot témoin	Lot traité par la chlorophylle
Concentration du glycogène (mg /ml)	2.72 ± 0.135	5.42 ± 0.115 ***

Chaque valeur correspond à la moyenne l'écart type.
(test de Student : *** p < 0.001)

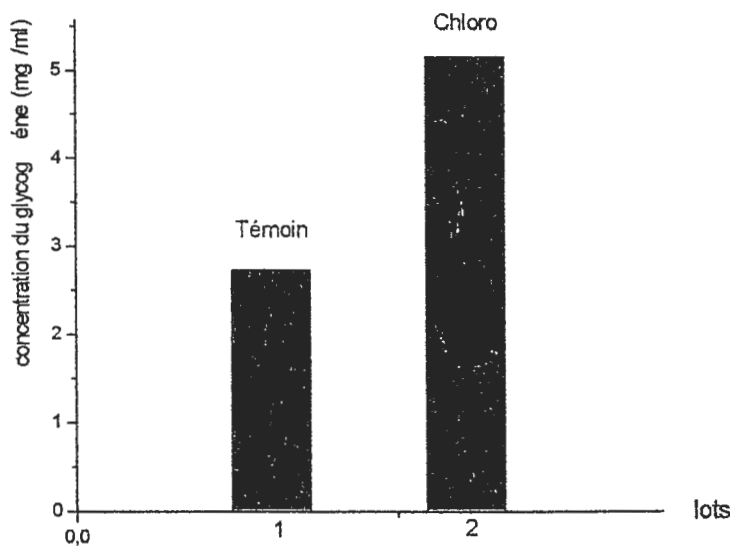


Fig . 19 – Variation de la quantité du glycogène stocké dans le foie sous l'effet d'une dose de 36 mg /rat de la chlorophylle .

Après administration d'une dose de 36 mg de l'extrait brut de la chlorophylle, nous avons constaté une augmentation très hautement significative (p < 0.001) de la concentration du glycogène hépatique qui atteint 5.042 ± 0.115 mg /ml contre 2.72 ± 0.135 mg /ml chez le lot témoin.

6- Effet de la chlorophylle sur la complexation du glucose *in vitro* :

Les variations de la concentration du glucose en fonction de la dose de l'extrait brut de la chlorophylle sont représentées dans le tableau XIX et illustrées par la figure 20 ci-dessous.

Tab . XIX : variation de la concentration du glucose (en g /l) en fonction de la dose de la chlorophylle

Dose de la chlorophylle	4 mg /ml	8 mg /ml	12 mg /ml
Concentration du glucose (g /l)	0.38	0.22	0.18
Pourcentage de la réduction de la concentration du glucose	37.70 %	63.40 %	70.49 %

Témoin = 0.61 g /l.

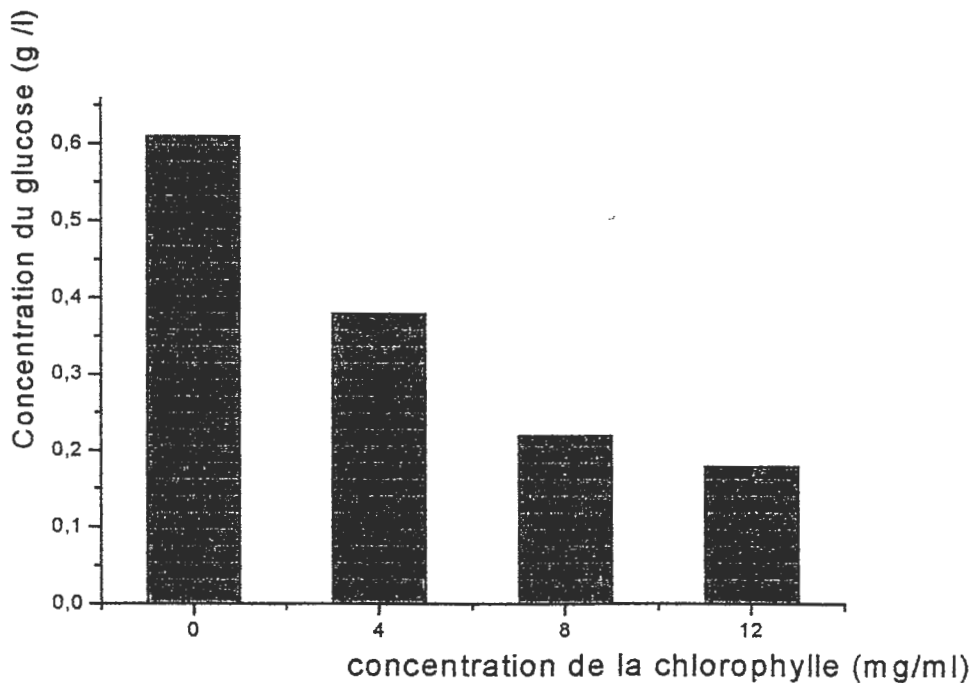


Fig. 20 - Variation de la concentration du glucose (en g /l) en fonction de la dose de la chlorophylle.

La chlorophylle réduit le taux du glucose in vitro, cette réduction est dose dépendante.

A la concentration de 4, 8 et 12 mg /ml , la chlorophylle entraîne une chute considérable de la concentration du glucose in vitro, atteint 0.38, 0.22 et 0.18 g /l respectivement contre 0.61 g /l du témoin.

Nous constatons également que le degré de la réduction du taux de glucose dans le milieu est proportionnel à la concentration de la chlorophylle.

Le degré de la réduction atteint 37.70 % à la concentration de 4 mg /ml , 63.40 % à la concentration de 8 mg /ml et 70.49 % à la concentration de 12 mg /ml de la chlorophylle.

7- Effet de la chlorophylle sur l'insulinémie :

a- Evaluation indirecte : effet temps de la chlorophylle sur la kaliémie

Le tableau XX et la figure 21 montrent les variations de la kaliémie en fonction du temps, après administration d'une dose de 36 mg / rat de l'extrait brut de la chlorophylle.

Tab.XX : Variation de la kaliémie après administration d'une dose de 36 mg /rat de la chlorophylle

	Lot 1 = Témoin	Lot 2= Témoin	Lot 3=traité par la chloro	Lot 4=gliclazide
30 mn	4.45 ± 0.03	6.22 ± 0.10	5.72 ± 0.03 **	5.80 ± 0.11 *
60 mn	5.65 ± 0.139	7.03 ± 0.17	5.90 ± 0.03 ***	6.05 ± 0.44 ***
90 mn	5.53 ± 0.08	6.34 ± 0.16	5.23 ± 0.02 ***	5.45 ± 0.05 ***
120 mn	5.48 ± 0.09	5.30 ± 0.12	4.24 ± 0.03 ***	4.10 ± 0.21 ***

Chaque valeur correspond à la moyenne ± l'écart type.
(test de Student : ** p > 0.001 , *** p < 0.001)

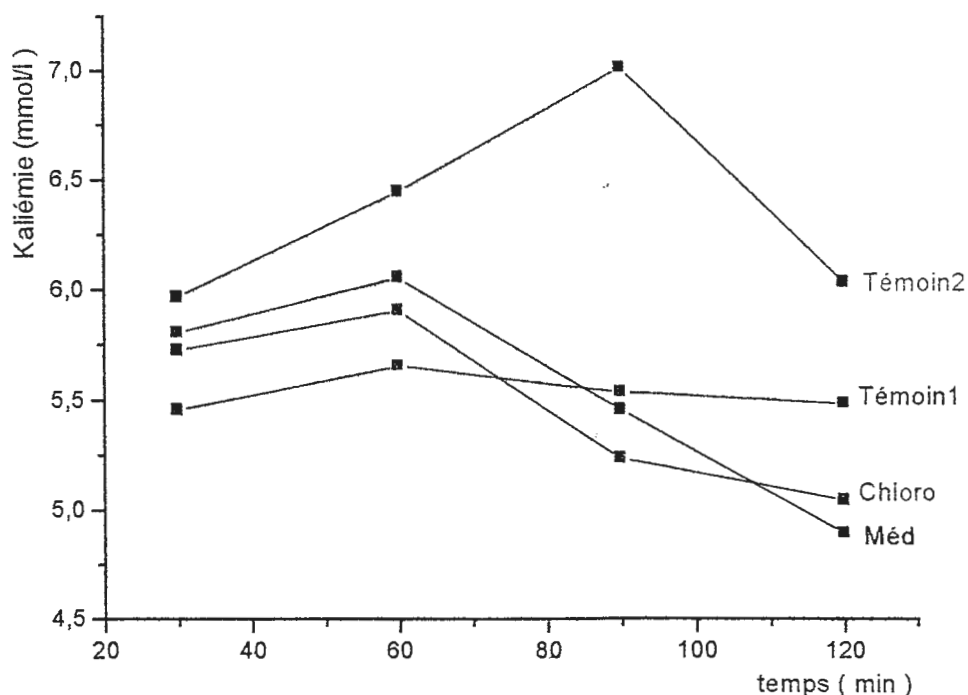


Fig. 21 – Variation de la kaliémie après administration d’une dose de 36 mg/rat de la chlorophylle.

Chloro : chlorophylle

Méd : médicament

Après administration d’une dose de 36 mg /rat de l’extrait brut de la chlorophylle, nous constatons une diminution très hautement significative de la kaliémie à partir de 60 mn qui atteint 5.90 ± 0.03 mmol /l contre 7.03 ± 0.17 mmol /l chez le témoin.

Cette diminution se poursuit progressivement pour provoquer une hypokaliémie apparente après 120 mn qui atteint 4.24 ± 0.03 mmol /l contre 5.30 ± 0.12 mmol /l du témoin. Cette valeur est comparable avec celle du lot traité par le gliclazide 4.10 ± 0.21 mmol /l.

b- Evaluation directe : insulinémie

Les résultats de l’effet d’une dose de 36 mg / rat de la chlorophylle sur l’insulinémie sont représentés dans le tableau XXI.

Tab.XXI :Variation de l’insulinémie après administration d’une dose de 36 mg /rat de la chlorophylle.

Lots	Lot 1=Témoin	Lot 2=Chlorophylle
Insulinémie (μ U/ml)	00 ± 00	0.43 ± 0.408

Chaque valeur correspond à la moyenne \pm l’écart type.

Nous observons que la valeur de l’insulinémie chez le rat traité par la chlorophylle est faible, mais plus élevée que celle du témoin.

V- Discussions

V - Discussion :

1- Extraction et fractionnement des *flavonoïdes* :

Dans notre étude, la phytochimie de la plante *Ranunculus repens L* s'avère révélatrice d'une quantité importante des flavonoïdes. Elle nous a permis d'une part, l'obtention d'une quantité importante des différents types de flavonoïdes à savoir : Les *aglycones*, les *monoglycosides* et les *di* et *triglycosides*, en appliquant la méthode des affrontements par les solvants.

En effet, le rendement en extrait final de chaque flavonoïde est encourageant puisque nous avons obtenu à partir de 62 g de poudre sèche, les quantités en extrait sec de 0.6 g des *aglycones*, 0.7 g des *monoglycosides* et 1.2 g des *di* et *triglycosides*. D'autre part, le fractionnement par chromatographie monodimensionnelle nous a montré une diversité moléculaire inattendue de ces mêmes types de flavonoïdes puisque le chromatogramme sous UV nous a révélé un nombre de 33 spots, répartis comme suit : 9 *flavonoïdes aglycones*, 10 *monoglycosides* et 14 *di* et *triglycosides*. Ceci montre la grande richesse de la plante en flavonoïdes et la diversité moléculaire de ces principes actifs dans notre extrait, et c'est d'ailleurs la raison qui nous a encouragé pour étudier leurs activités pharmacologiques.

2- Etude pharmacologique :

Cette partie comporte l'étude de quelques activités pharmacologiques des trois types de *flavonoïdes* et de la *chlorophylle*.

■ L'étude de l'activité hypoglycémiant :

- Les résultats de notre étude montrent que nos principes actifs ont un effet hypoglycémiant et que les formes glycosylées donnent un effet mieux que celui des formes non glycosylées, puisque leur effet est comparable à celui de l'hypoglycémiant oral gliclazide. En effet à partir de 30 min après l'administration, les différents *flavonoïdes* et le gliclazide ont empêché l'augmentation de la glycémie pour ne pas atteindre le pic hyperglycémique obtenu avec le témoin hyperglycémique. Encore plus, ces mêmes principes actifs ont provoqué une hypoglycémie plus ou moins sévère à partir de 90 min de l'administration.

- La courbe de la glycémie en fonction du temps nous montre un effet hypoglycémiant semblable chez tous les principes actifs, inclus celui du gliclazide qui est très proche de celui des *di* et *triglycosides*.

- La *chlorophylle* a également un effet hypoglycémiant mieux que celui des *aglycones*, et comparable à celui des formes glycosylées et du gliclazide.

Cette activité hypoglycémiant pourrait être le résultat de plusieurs possibilités d'action des *flavonoïdes* et de la *chlorophylle*. Nous pouvons résumer ces actions par :

- L'effet de complexation du glucose par les *flavonoïdes* confirmé, *in vitro*, par notre étude qui montre que la glycosylation est dose dépendante et que la réduction du taux de glucose augmente avec le degré de glycosylation des molécules flavonoïdiques, c'est à dire que la capacité des *flavonoïdes* de lier les molécules de glucose est plus importante lorsque elles sont liées à un nombre élevé de sucres. En effet, les *flavonoïdes* type *di* et *triglycosides* à la dose de 12 mg /ml réduisent 85.20 % de la quantité du glucose présent dans le milieu, les *monoglycosides* entraînent une réduction de 67.21 % et la *chlorophylle* de 70.49 % et les *aglycones* réduisent 62.29 % de la charge initiale en glucose de la solution glucosée. Cela est dû à :

- la tendance des flavonoïdes type glycosides à l'élongation des chaînes glycosidiques.

- La tendance des aglycones et de la chlorophylle d'acquérir des radicaux sucrés.

Cependant, ce même phénomène de glycosylation se déroule dans le sang, mais cette fois-ci les *flavonoïdes* type *glycosides* ayant perdu leur sucres dans l'intestin par la digestion, conservent la nature de lier les radicaux sucrés (glucose) *in vivo*.

- L'effet des *flavonoïdes* et de la *chlorophylle* sur l'internalisations du glucose sanguin dans les cellules activant leur métabolisme anabolique, lipogénèse, biosynthèse des acides aminés et surtout la glycogénogenèse hépatique, confirmée par notre étude histobiochimique, qui montre que les tissus hépatiques des rats traités par les *flavonoïdes* et la *chlorophylle* renferment le glycogène en abondance par rapport au témoin, notamment chez les traités par les *di* et *triglycosides* et par la chlorophylle. Cette idée est affirmé par le dosage de la quantité du glycogène hépatique stocké sous l'effet des trois types de *flavonoïdes* et de la *chlorophylle*, qui se voit élevée. La concentration du glycogène atteint 6.60 ± 0.715 mg /ml , 5.042 ± 0.115 mg /ml , 4.63 ± 0.107 mg /ml , 4.43 ± 0.503 mg /ml chez les lots traités par les *di* et *triglycosides*, la *chlorophylle*, les *monoglycosides* et les *aglycones* successivement contre 2.72 ± 0.135 mg /ml chez le lot témoin.

Cette augmentation peut être expliquée par la capacité des *flavonoïdes* d'internaliser le glucose sanguin dans le foie ou d'activer l'insulinosécrétion. Dans ce dernier cas l'augmentation de la quantité du glycogène hépatique pourrait être l'un des effets de l'insulinosécrétion activée par nos principes actifs ainsi induisant une glycogénogénèse importante chez les animaux traités.

- L'effet des *flavonoïdes* sur l'insulinosécrétion, puisque l'évaluation indirecte de l'insulinémie par l'étude des variations de la kaliémie montre que les *aglycones* n'influencent pas de façon significative sur la kaliémie, par contre, les formes glycosylées et la *chlorophylle* provoquent une hypokaliémie très hautement significative et comparable à celle de l'hypoglycémiant orale DIAMICRON (gliclazide), qui entraîne une baisse de la glycémie par action sur la libération d'insuline par le pancréas et par une augmentation de la sensibilité des cellules à l'insuline. (26)

L'hypokaliémie peut être due à certains états pathologiques tel que l'élimination rénale augmentée, problèmes digestifs comme les diarrhées et les vomissements, troubles neuromusculaires et cardiaques, etc... (4)

Mais comme ce n'est pas notre cas, cette hypokaliémie peut être expliquée par le fait que les *flavonoïdes* glycosidiques et la *chlorophylle* activent l'insulinosécrétion, qui en augmentant la captation cellulaire du potassium plasmatique, provoque une hypokaliémie, sachant que l'hypokaliémie est l'une des effets secondaires de l'insulinothérapie. (39)

L'évaluation directe de l'insulinémie nous a fourni de très faibles valeurs par rapport au valeurs normales de l'insulinémie chez l'homme (entre 5 et 30 μ U /ml), en absence d'une bibliographie concernant l'insulinémie chez le rat.

Ces faibles valeurs sont dues à la différence structurale existant entre l'insuline du rat et celle de l'homme alors que nous avons dosé l'insuline par le test ELISA qui utilise des anticorps spécifiques de l'insuline humaine. Ces faibles valeurs peuvent être également dues aux conditions de transport, (congélation et décongélation, temps de conservation...etc.), puisque nous avons réalisé le dosage à Constantine.

Sans oublier que nous avons effectué le prélèvement à jeun, où l'insuline existe sous forme liée aux protéines plasmatiques à 75 %. (4)

Néanmoins, l'évaluation de la kaliémie a montré que les *flavonoïdes* augmentent l'insulinémie. Cette augmentation peut être le résultat de l'effet de ces principes actifs sur :

- L'activation de la synthèse d'insuline par les îlots de Langerhans.
 - La libération d'insuline déjà synthétisée et stockée dans les cellules Bêta des îlots de Langerhans.
 - La libération de l'insuline par scission des complexes plasmatiques inactifs insulino-protéiques.
- L'activité hypoglycémiant des *flavonoïdes* et de la chlorophylle pourrait être également expliquée par l'effet de ces principes actifs sur la diminution de l'absorption intestinale du glucose.

Puisque elle diminue la glycémie juste autour des valeur normales, selon notre étude, la dose de 12 mg /rat soit 46.15 mg /kg des trois types de *flavonoïdes* (*aglycones*, *mono-*, *di* et *triglycosides*) nous semble la dose la plus efficace des trois doses que nous avons utilisé. Toute foi, une étude pharmacocinétique est plus qu'indispensable pour déterminer l'efficacité réelle de cette dose.

La détermination des taux du cholestérol et des Triglycérides est très importante en cas des maladies hyperlipidémiques en générale, et chez les diabétiques en particulier, où elles aggravent et menacent les complications vasculaires tel l'athérosclérose.

Notre étude montre l'effet hypocholestérolémiant des *flavonoïdes* surtout les *mono-* et les *di* et *Triglycosides* et de la *chlorophylle*. En effet, à la dose de 12 mg nous avons obtenu 0.66 ± 0.005 , 0.43 ± 0.094 , 0.32 ± 0.04 g /l , 0.35 ± 0.074 g /l *respectivement* chez les traités par les *aglycones*, *mono-*, *di* et *triglycosides* et la *chlorophylle* contre 1.05 ± 0.3 g /l chez le lot témoin. Cet effet peut être expliqué par le fait que ces *flavonoïdes* :

- augmentent la captation du cholestérol par les cellules.
- inhibition de la biosynthèse du cholestérol.
- diminution de la réabsorption intestinale des sels biliaires diminuant par conséquent le taux du cholestérol sanguin.

Les résultats de l'effet dose des *flavonoïdes* et de la *chlophylle* sur la triglycéridémie montrent que les *flavonoïdes monoglycosidiques* et *di* et *triglycosidiques* entraînent consécutivement une diminution hautement significative et significative de la triglycéridémie, soit 0.38 ± 0.063 g /l pour les *monoglycosides* à la dose de 12 mg, 0.55 ± 0.328 g /l pour les *di* et *triglycosides* à la dose de 36 mg contre 0.89 ± 0.178 g /l chez le témoin.

La *chlorophylle* entraîne une chute significative du taux des triglycérides. Par contre les *aglycones* n'entraînent pas une diminution significative du taux des triglycérides.

La diminution de la triglycéridémie peut être le résultat de plusieurs possibilités d'action , on peut citer :

- L'effet de ces principes actifs sur les triglycérides plasmatiques en augmentant leur captations par les cellules, ou
- Leurs effets sur les lipoprotéines lipases existants sur la membrane des adipocytes, par l'augmentation de leur activité ou de leur quantité, ces enzymes hydrolysent les triglycérides circulants, ou bien
- Ces principes actifs activent l'insulinosécrétion et donc la diminution du taux des triglycérides est l'un des effets de l'insuline.

VI- Conclusion

VI - CONCLUSION :

La recherche dans le monde végétal des molécules utilisables en thérapeutique et pouvant servir de point de départ à la synthèse de nouveaux médicaments, reste un domaine de recherche très fructueux.

En effet notre étude phytopharmacologique nous a permis de conclure les points suivants :

- La plante *Ranunculus repens L* est un modèle de richesse et de biodiversité en molécules flavonoïdiques. En effet, l'extraction et le fractionnement de ses *flavonoïdes* donnent 33 molécules différentes : 9 *aglycones*, 10 *monoglycosides* et 14 *di* et *triglycosides*.

- Ces trois types de *flavonoïdes* ont un effet hypoglycémiant évident, et notamment les formes glycosylées où l'activité hypoglycémiante est proportionnelle avec le degré de glycosylation de la molécule flavonoïdique, et comparable avec celle de l'hypoglycémiant oral gliclazide (DIAMICRON).

Ces trois types de *flavonoïdes* commencent leur effet après 60 mn . Leur activité hypoglycémiante est due selon notre étude à :

- La complexation du glucose par les *flavonoïdes* qui jouent le rôle de "Glucophage " *in vitro*. Cette complexation est plus importante chez les formes glycosylées : *mono-*, *di* et *triglycosides*.

- L'augmentation de la captation et de l'internalisation du glucose sanguin dans le foie, essentiellement par les *di* et *triglycosides* provoquant l'activation de la glycogénogénèse.

- L'augmentation du taux d'insuline sanguin. Les *flavonoïdes* type *glycosides* augmentent le taux d'insuline sanguin.

- Les *flavonoïdes* ont également un effet hypocholestérolémiant et hypotriglycéridémiant significatif. Par contre, l'étude statistique montre que les *aglycones* n'ont pas ces effets.

- La chlorophylle qui a été longtemps dénuée d'effet, joue aujourd'hui, selon notre étude, un rôle hypoglycémiant dose dépendant et comparable à celui de l'hypoglycémiant oral gliclazide (DIAMICRON).

Cette activité hypoglycémiante est, selon notre étude, le résultat des mêmes actions citées en haut pour les flavonoïdes.

- La chlorophylle provoque également une chute très hautement significative du cholestérol et des triglycérides sanguins, d'où une hypocholestérolémie et une hypotriglycéridémie.

Donc les flavonoïdes et la chlorophylle peuvent être utilisés contre les hyperlipidémies (hypercholestérolémie et hypertriglycéridémie), c'est pourquoi les animaux sont exempts de ces maladies .

- La chlorophylle donne un effet mieux que celui des *aglycones* sur la glycémie, la cholestérolémie, la triglycéridémie, ainsi une importante complexation du glucose *in vitro* et un stockage hépatique élevé du glycogène.

Cette étude reste insuffisante pour mieux explorer et investir d'une manière plus approfondie certaines zones d'ombre dégagées lors de notre étude, parmi lesquelles nous pouvons citer :

- L'étude des mécanismes par lesquels ces principes actifs augmentent l'insulinémie.
- l'étude des mécanismes par lesquels ces principes actifs diminuent la cholestérolémie et la triglycéridémie.
- La purification de ces principes actifs et la caractérisation de ces molécules et voir la variante pourvue de ces activités pharmacologiques.
- Le rôle de " Glucophage " joué par les *flavonoïdes in vitro* doit être affirmé (ou infirmé) *in vivo*.
- La chlorophylle, molécule très connue mais négligée doit être étudiée soigneusement, car elle pourrait être douée d'une activité pharmacologique pouvant sauver l'humanité des maladies devant lesquelles la science est jusqu'à présent impuissante.

VII- Bibliographie

Références :

Livres :

- (1) ALAIS. C..LINDEN, G. 1997. Abrégés de biochimie alimentaire. Masson, Pris. 4^e éd. P.119-125.
- (2) ANTON. R. 1999. Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Tec & Doc.éd. 3^{ème} éd.P.25.
- (3) BOREL. J. et collaborateurs. 1994. Comment prescrire et interpréter un examen biologique. Maloin, Paris. 2^e éd.P.44-172.
- (4) BOULANGER, P. et collaborateurs. 1971. Biochimie médicale. MASSON & CIE .éd. Paris. 8^{ème} éd. Fassicule III.P.200-201, 234-237.
- (5) BRUNETON, J.1993. Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Lavoisier Tec & Doc, Paris. 2^e éd. P.266-299.
- (6) BRUNETON, J.1997. Plantes toxiques : végétaux dangereux pour l'homme et l'animal.P. 395-406.
- (7) FREMY, M. Le quid 2002. Robert Laffont, Paris. P.148-175.
- (8) GAUSSEN, H., LEROY, J. et OZENDA, P. 1982. Précis de botanique, végétaux supérieurs. Masson, Paris. 2^e éd. P.239.
- (9) GERHARD. R. 1993. Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie. Lavoisier Tec & Doc.P.333-339.
- (10) JABOT, G. 1981. Le rat de laboratoire un réactif biologique. MASSON éd. Paris.P. 83.
- (11) KHALFA, S. 2002. Le diabète sucré. Office des Publications Universitaires, Alger.
- (12) KHIATI, M. 1993. Le diabète sucré chez l'enfant. Office des Publications Universitaires, Alger.
- (13) KRUIJ, J.1989. Biochimie : études médicales et biochimiques. Herman, Paris. Tome 2.P.121.
- (14) MACCLLUAN et HUNTER-MONTEAL. 1999. Biochimie pour les cliniciens : mécanismes moléculaires et cliniques à l'origine des maladies. Frison-Roche éd, Paris. P.187-193.
- (15) MAZOYER, M. et collaborateurs. 2002. Larousse agricole. Larousse éd. P.543.

(16) SCHORDERET, M. et collaborateurs. 1992. Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Office des Publications Universitaires, Alger Vol1. p.481-494.

(17) SEVENET, T.1994. Plantes, molécules et médicaments. Nathan, Paris. P.23-73.

(18) أ. الحسيني. 1994. أعشاب و نباتات من الطب الشعبي في خدمة مريض السكري. دار الهدى للطباعة و النشر و التوزيع. الجزائر.

(19) أ. الحسيني. 1991. عزيزي مريض السكري، كيف تنتصر على مرضك و تحي حياة طبيعية. دار الهدى للطباعة و النشر و التوزيع. الجزائر.

(20) س. عطية و م. رعقوق. 2000. الغذاء و الأعشاب و صحة الإنسان. مطابع الأهرام التجزئية. مصر. الطبعة الأولى.

(21) ع. الدجوي. 1996. موسوعة النباتات الطبية و العطرية. دار النشر مكتبة مد بولي.

(22) ع. الدنشاري و ع. البكري. 1994. مرض السكر: دراسات الحاضر و آفاق المستقبل. التمريخ للنشر. المملكة العربية السعودية. الطبعة الأولى.

CD :

(23) CD Encyclopédie Encarta 2002.

(24) CD Encyclopédie médicale pour la famille : le guide pratique et permanent de la santé 1998.

(25) CD le Providal 1997.

(26) CD Média VIDAL 19999.

Sites d'internet :

(27) [http : // www.lysator.liu.se/runeberg/nordelfor/160.htm](http://www.lysator.liu.se/runeberg/nordelfor/160.htm).

(28) [http : // www.pharmacorama.com/liorc/commander.php](http://www.pharmacorama.com/liorc/commander.php)

(29) [http : // www.multimania.com/_ourad/flavinoïdes/htm](http://www.multimania.com/_ourad/flavinoïdes/htm)

(30) [http : // www.ville-clermenferrand.fr/devel/recherche/prix/2002/V-crespy](http://www.ville-clermenferrand.fr/devel/recherche/prix/2002/V-crespy)

(31) [http : // www.members.aol.com/dr_fatalis/pages/diabetes.html](http://www.members.aol.com/dr_fatalis/pages/diabetes.html).

(32) [http : // www.plants.usda.gov/cgi-bin/plant-plant profil.cgi? Symbol=PAR](http://www.plants.usda.gov/cgi-bin/plant-plant profil.cgi? Symbol=PAR).

(33) [http : // www.Fortunecity.com/melting_pot/champion/627/dias-htm x](http://www.Fortunecity.com/melting_pot/champion/627/dias-htm x)

(34) [http : // .com/fic/fichiers/F242.htwww.fleurs des champs m](http://.com/fic/fichiers/F242.htwww.fleurs des champs m)

- (35) [http : // www.inra.fr-Dijou/malherbo/hypa/ranre-Fh-htm/](http://www.inra.fr-Dijou/malherbo/hypa/ranre-Fh-htm/)
- (36) [http : // www.perso.wana.doc](http://www.perso.wana.doc)
- (37) [http : // www.wapifor.com/information.asp/action=affiche.page ID=10](http://www.wapifor.com/information.asp/action=affiche.page ID=10)
- (38) [http : // www.reseau.protéus.net/1001_solution/a/allium_cepa.htm](http://www.reseau.protéus.net/1001_solution/a/allium_cepa.htm)
- (39) [http : // www.pharmacorama.com/livre/commandes](http://www.pharmacorama.com/livre/commandes)
- (40) [http : // www.google.fr/flavonoïdes.htm](http://www.google.fr/flavonoïdes.htm)
- (41) [http : // www.membres.lycos.fr/jjww/flavonoïdes.htm](http://www.membres.lycos.fr/jjww/flavonoïdes.htm)
- (42) [http : // www.perso.xanadov.fr/Francis_George/plante-méd.htm](http://www.perso.xanadov.fr/Francis_George/plante-méd.htm)
- (43) [http : // www.ville-clermont Ferrand.fr/devel/recherche/prix/2002/2002.htm](http://www.ville-clermontFerrand.fr/devel/recherche/prix/2002/2002.htm)
- (44) [http : // www.méd.uviv-rennes1.fr/etude/pediatrie/métabolisme-glucidique.htm](http://www.méd.uviv-rennes1.fr/etude/pediatrie/métabolisme-glucidique.htm)
- (45) [http : //www.spiritsoleil.com / spirit-presse-bien-être-jus-pousse.htm](http://www.spiritsoleil.com / spirit-presse-bien-être-jus-pousse.htm)



Présenté par : KEBSA Wided
CHERBAL Asma
LABRECHE Leila

Dirigé par : Mr. KEBIECHE Mohamed
Date de soutenance : 24 Septembre 2003

Etude de l'effet des différents types de flavonoïdes : aglycones, mono-, di et triglycosides, extraits de la plante *Ranunculus repens L*, sur quelques paramètres biochimiques liés au diabète.

Nature du diplôme : **Diplôme des études supérieures en Biologie option Biochimie**

Résumé :

Le diabète est la première des maladies métaboliques par sa fréquence comme par sa gravité, et qui n'a pas encore de traitement malgré le développement de la chimie thérapeutique.

Notre étude phytopharmacologique sur la plante *Ranunculus repens L* nous a permis de conclure que cette plante est très riche en flavonoïdes car, le fractionnement chromatographique donne 33 fractions: 9 flavonoïdes aglycones, 10 monoglycosides et 14 di et triglycosides, et que ces trois types de flavonoïdes ont un effet hypoglycémiant dose dépendant notamment des formes glycosylées qui présentent un effet comparable à celui de l'hypoglycémiant oral gliclazide. Ces trois types de flavonoïdes commencent leur effet après 60 mn par activation de l'internalisation du glucose dans le foie, l'augmentation du taux d'insuline et par la complexation du glucose in vitro. Les flavonoïdes type glycosides ont un effet hypocholestérolémiant et hypotriglycéridémiant. Par contre, l'étude statistique montre que les aglycones n'ont pas ces effets.

La chlorophylle qui a été longtemps dénuée d'effet joue aujourd'hui, selon notre étude, un rôle comparable à celui des flavonoïdes glycosidiques avec tous les paramètres étudiés.

Sammary :

Diabetes is the first metabolic disease by its frequency and its gravity, and which hasn't a treatment yet in spite of the development of therapeutic chemistry.

Our phytopharmacological study on *Ranunculus repens L* plant shows that this plant has a high flavonoïdes content, because chromatographic fractionation give 33 fractions : 9 aglycone flavonoïdes, 10 monoglycosides and 14 di and triglycosides, also, these three sorts of flavonoïdes have a hypoglycemic effect which is dose dependent, especially glycosides which present a comparable effect with the oral hypoglycemic drug, gliclazide.

These three kinds of flavonoïdes begin their effect after 60 mn by activation of internalization of glucose in the liver, increasing the insulin rate and by the complexation of glucose in vitro.

Glycoside flavonoïdes have also a hypocholesterolemic and hypotriglyceridemic effect, contrary to the aglycone flavonoïdes which haven't these effects according to the statistic study.

Chlorophyll that was for a long time considered without any effect, has today according to our study, the same effect as glycoside flavonoïdes.

الملخص :

يعتبر داء السكري أولى الاختلالات الأيضية من حيث شيوعها وكذا خطورتها، والتي ليس لها علاج بعد رغم تطور الكيمياء العلاجية. ودراستنا التي تخص الصيدلة النباتية لنباتة الحوذان الزاحفة *Ranunculus repens L* بيّنت أن هذه النبتة جديّة غنيّة بالفلافونويدات، إذ أن الفصل بطريقة التسجيل اللوني أعطى 33 فصماً : 9 فلافونويدات لا سكريّة، 10 أحفوية السكر، 14 ثلاثية و ثلاثية السكر، وأن هذه العناصر الفعّلة الثلاثة لها تأثير مخفض لنسبة الغلوكوز في الدم، هذا التأثير مرتبط بالجرعة و خصوصاً بالنسبة للفلافونويدات السكرية التي أعطت نتائج مماثلة لتلك التي أعطتها النواء المخفض لنسبة الغلوكوز في الدم gliclazide.

وتبدأ هذه الأنواع الثلاثة من الفلافونويدات تأثيرها بعد 60 د و ذلك عن طريق تنشيط إدخال الغلوكوز إلى الكبد، رفع معدل الأنسولين، و ربط الغلوكوز خارج العضوية (in vitro).

أيضاً، فإن الفلافونويدات السكرية تملك خاصيّة تخفيض نسبة الكوليسترول و الغليسيريدات الثلاثية في الدم، و على النقيض من ذلك فإن الفلافونويدات اللاسكّرية لا تملك هاتين الخاصيّتين حسب ما أثبتت الدراسة الإحصائية. ودراستنا شملت أيضاً مادة اليخضور التي لطالما اعتبرت عديمة التّفع، و ها هي اليوم حسب دراستنا، تلعب دوراً مماثلاً لدور الفلافونويدات السكرية.

Mots Clés

Diabète, Flavonoïdes, *Ranunculus repens L*, Aglycones, Mono-, Di -, Triglycosides, Hypoglycémie, Chlorophylle