

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCCEN
Faculté des Sciences
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

MEMOIRE DE MAGISTER

Substances Naturelles Activités Biologiques et Synthèse

Présenté par

ZERRIOUH MERIEM

Contribution à l'étude de l'activité antidiabétique
de la globularine, un iridoïde isolé des feuilles
de *Globularia alypum L.* chez le rat Wistar

Soutenu devant le jury d'examen

Président	K. Boucherit	Maître de conférence Université de Tlemcen
Examinatrices	F. Atik	Professeur Université de Tlemcen
	N. Sebbagh	Maître assistante Université de Tlemcen
Promoteur	R. Djaziri	Maître de conférence Université de Tlemcen
Co- promoteur	F. Lahfa	Maître assistant Université de Tlemcen

Année universitaire 2007-2008

Je dédicace ce modeste travail à mes très chers
parents et à mes chères sœurs.

Remerciements

Je tiens à exprimer ma gratitude envers Mr Kebir Boucherit qui m'a fait l'honneur de m'accueillir dans son laboratoire et d'avoir accepté de juger ce travail.

Que Mme Fouzia Atik trouve ici l'expression de ma plus haute considération et de ma sincère reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail.

Egalement je tiens à remercier Melle Nabahat Sebbagh, d'avoir accepter d'être un membre de ce jury et d'examiner ce travail.

Mes sincères remerciements à vous Mr Farid Lahfa, qui en agissant à titre de co-encadreur avait fortement enrichi ma formation.

Je voudrais remercier également Mr Rabah Djaziri pour la confiance qu'il a voulu m'accorder en réalisant ce modeste travail. Egalement pour ces conseils et commentaires qui m'ont été très utiles.

Je tiens à souligner l'implication de Mme Salima Meriah, une personne si précieuse pour sa qualité d'encadrement, je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude.

Mes remerciements vont également à Melle Nabila Benariba d'être toujours présente et pour ces précieux conseils.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	1
INTRODUCTION GENERALE	3
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Le diabète sucré	5
1-Concept du diabète sucré.....	5
2-Le Diabète de type1.....	6
3-Le diabète de type2.....	7
II. Le diabète sucré et les produits naturels dérivés de plantes médicinales	12
1-Les produits naturels dérivés de plantes : aspect chimique.....	12
1-1-Définition.....	12
1-2-L'origine biosynthétique.....	12
1-3-Les principaux groupements chimiques.....	12
2-Traitement du diabète sucré par les produits naturels dérivés de plantes.....	17
3- <i>Globularia alypum</i> L : description botanique, utilisation thérapeutique et composition chimique.....	20
PARTIE EXPERIMENTALE	
I. Matériels et méthodes	22
1-Etude de la composition chimique de <i>Globularia alypum</i> L.....	22
1-1- Tests phytochimiques.....	22
1-2- Extractions sélectives.....	24
1-2-1-Extraction de la globularine.....	24
1-2-2- Extraction des flavonoïdes aglycones.....	25
1-2-3-Extraction des saponosides.....	25
2-Tests biologiques; évaluation de la toxicité et de l'effet antidiabétique de la globularine chez les rats.....	28
2-1- Evaluation de la toxicité de la globularine chez des rattes.....	28
2-2- Induction du diabète expérimental.....	29
2-3-Etude aiguë de l'activité antidiabétique de la globularine chez des rats normaux et diabétiques.....	29
2-4- Test de tolérance au glucose chez des rats normaux.....	29
2-5- Etude sub -chronique de l'activité antidiabétique de la globularine et du glibenclamide chez des rats diabétiques.....	30

II. Résultats	32
1. la composition chimique de <i>Globularia alypum</i> L.....	32
1-1- Tests phytochimiques.....	32
1-2- Extractions sélectives.....	33
1-2-1-Fractionnement de la phase d'acétate d'éthyle sur colonne ouverte de gel de silice et purification de la globularine.....	33
1-2-2-CCM des flavonoïdes aglycones	35
1-2-3-Quantification et solubilité des saponosides.....	35
2. Tests biologiques; évaluation de la toxicité et de l'effet antidiabétique de la globularine chez les rats.....	36
2-1- la toxicité de la globularine chez des rattes.....	36
2-2- Effet de la streptozotocine sur la glycémie et le poids corporel des rats.....	36
2-3- Evolution de la glycémie chez des rats normaux et diabétiques en 480min	39
2-4- Test de tolérance au glucose chez des rats normaux.....	40
2-5- Evolution de la glycémie des rats diabétiques non à jeûne.....	41
2-6- Evolution du poids corporel des rats et mesure de la quantité d'eau et d'aliment consommées en parallèle	42
2-7- La glycémie à jeûne et effet du traitement sur la triglycéridémie et la cholestérolémie.....	45
III. Discussion	47
CONCLUSION GENERALE	52
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Valeurs de la glycémie utilisées pour le diagnostic du diabète sucré et d'autres catégories d'hyperglycémie.

Figure 2 : La structure de l'insuline.

Figure 3 : Structures chimiques des principaux antidiabétiques oraux utilisés dans le traitement du diabète sucré de type 2.

Figure 4: Structures chimiques des différents métabolites secondaires.

Figure 5 : *Globularia alypum*L.

Figure 6: Structure de quelques composés isolés des feuilles de *G. alypum*.

Figure 7 : Extraction de la globularine.

Figure 8: Extraction des flavonoïdes aglycones.

Figure 9 : Extraction des saponosides.

Figure 10 : Chromatogramme des différentes fractions(F) isolées et purifiées à partir de l'extrait d'acétate d'éthyle, comparés à la globularine (G).

Figure 11 : Structure de la globularine

Figure 12: Effet de l'injection intrapéritonéale du tampon citrate (0.1M, pH=4.5), 5ml/kg ,p.c (A) et de la STZ 60mg/kg,p.c (B) sur la glycémie à jeun des rats.

Figure 13: Effet de l'injection intrapéritonéale du tampon citrate (0.1M, pH=4.5), 5ml/kg ,p.c (A) et de la STZ 60mg/kg,p.c (B) sur le poids corporel des rats à jeun.

Figure 14 : Effet de la globularine et du glibenclamide sur la glycémie à jeun chez des rats normaux après injection intra- péritonéale à t=0min.

Figure 15 : Effet de la globularine et du glibenclamide sur la glycémie à jeun chez des rats diabétiques après injection intra- péritonéale à t=0min.

Figure 16 : Effet de la globularine et du glibenclamide sur la glycémie chez des rats normaux après une charge en glucose (2.5g/kg) à t=0min.

Figure 17 : Effet de la globularine et du glibenclamide sur la glycémie chez des rats diabétiques (D) traités pendant 7 jours.

Figure 18 : Effet de la globularine et du glibenclamide sur le poids corporel chez des rats diabétiques (D) traités pendant 7 jours.

Figure 19 : Quantité d'aliment consommée par les rats durant les 7 jours de l'expérience.

Figure 20 : Quantité d'eau consommée par les rats durant les 7 jours de l'expérience.

Figure 21: Glycémie à jeun des rats après 7 jours de traitement.

Figure 22 : Paramètres lipidiques dosés en fin de l'expérience ; Triglycérides (A) et cholestérol total (B).

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Agents antidiabétiques oraux utilisés pour le traitement du diabète sucré de type 2.

Tableau 2 : L'effet de quelques métabolites secondaires, purifié à partir de plantes, sur l'hyperglycémie provoquée chez des rats.

Tableau 3: Groupements chimiques présents et absents dans les feuilles de *G AlypumL*.

Tableau 4 : Différentes fractions isolées de la phase d'acétate d'éthyle par chromatographie sur colonne ouverte.

Tableau 5 : Les caractéristiques des flavonoïdes aglycones, obtenus par CCM.

LISTE DES TABLEAUX EN ANNEXE

Tableau 6 : Données expérimentales et théoriques du ^1H , du Cosy pour la globularine.

Tableau7 : Données expérimentales et théoriques du ^{13}C , du DEPT et du spectre 2D, HMBC pour la globularine.

Tableau8 : L'effet de la streptozotocine sur la glycémie et le poids corporel des rats males et femelles.

Tableau 9: L'effet de la globularine et l'effet du glibenclamide sur la glycémie à jeûne (g/l) des rats normaux et diabétiques.

Tableau10: Test de tolérance au glucose chez des rats normaux.

Tableau11: L'effet de la globularine et l'effet du glibenclamide sur la glycémie non à jeûne des rats diabétiques.

Tableau12 : Evolution du poids corporel des rats traités par la globularine et le glibenclamide en 7 jours de l'expérience.

Tableau 13 : Quantités d'aliment et d'eau consommés par les rats durant les 7 jours de l'expérience.

Tableau 14: Paramètres lipidiques dosés en fin de l'expérience (le 8^{ème} jour).

LISTE DES ABREVIATIONS

μm : micromètre

ADA : association américaine du diabète

ADN : acide désoxyribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

BB: bio breeding

C: carbon

C°: degré Celsius

CCM : chromatographie sur couche mince

CCPA : Conseil Canadien de Protection des Animaux

CD: Cluster of differentiation

COSY: correlated spectroscopy

DEPT : distortionless enhancement by polarisation transfer

DT₁ : diabète de type 1

DT₂ : diabète de type 2

ES: erreur standard

F : fraction

FeCl₃: trichlorure ferrique

g : gramme

GK: glycerol kinase

GOD: glucose oxydase

GPO: glycerol phosphate oxydase

h: heure

H: hydrogène

H₂O: eau

H₂O₂: peroxide d'hydrogène

H₂SO₄: acide sulfurique

HbA1C : hémoglobine A1 glucosylée

HCl : acide chlorhydrique concentré

HgCl₂ : chlorure de mercure

HLA: human leucocyte antigen

HMBC: Homonuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy

I₂ : iode

IP : intra peritonéale

J : constante de couplage

kg : kilogramme
KI : iodure de potassium
l : litre
M : molaire
m/z: masse/charge électrique
mg: milligramme
MIDD: maternally inherited diabetes and deafness
Min: minute
ml: millilitre
MODY: maturity onset diabetes of the young
N : normal
NaCl : chlorure de sodium
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
NaOH : la soude
NH₄OH:hydroxyde d'ammonium
nm :nanomètre
NOD : non obèse diabétique
O₂ : dioxygène
OMS : organisation mondiale de la santé
p.c: poids corporel
pH: potentiel d'hydrogène
PO: per os
POD: peroxydase
ppm : partie par million
Rf : rapport frontal
RMN : résonance magnétique nucléaire
SM : spectrométrie de masse
STZ : streptozotocine
UV : ultra- violet
v : volume
% : pourcentage
↑ : augmentation
↓ : diminution

INTRODUCTION GENERALE

Le diabète sucré est le désordre endocrine le plus fréquent dans le monde entier, représentant un problème majeur de santé publique par la gravité de ses complications aiguës et chroniques. La prévalence mondiale du diabète sucré est en importante augmentation au cours de ces dernières années. En 2000, le nombre de personnes atteintes de diabète était estimé à 171 millions. Au rythme où progresse la maladie ,366 millions de diabétiques sont « attendus » en 2030 (Wild et al.,2004).A l'origine de cette augmentation sont incriminés plusieurs facteurs génétiques et environnementaux ; virus, alimentation riche en graisses et en sucres ,diminution de l'activité physique, obésité, âge ...

Plusieurs types de diabète sucré existent, d'étiologie et de pathophysiologie différentes, caractérisés par un degré d'hyperglycémie chronique soutenu dû à une altération de la sécrétion de l'insuline et/ou de l'action de l'insuline. Selon le degré de l'hyperglycémie et l'origine des altérations métaboliques, plusieurs traitement sont disponibles ; l'activité physique et le régime alimentaire (diminution de l'apport glucidique et lipidique avec diminution pondérale) ; médication orale (stimulation de la sécrétion de l'insuline, augmentation de la sensibilité des tissus à l'insuline, diminution de l'absorption intestinale du glucose...) et l'insuline exogène qui le régulateur le plus important de l'homéostasie du glucose (Emilien et al.,1999).

Le principal but dans le traitement du diabète sucré est de maintenir la glycémie dans son intervalle normale le plus longtemps possible, à fin de prévenir ou de retarder l'apparition des complications dégénératives micro- et macrovasculaires du diabète. Ce but est parfois difficile à réaliser surtout avec la médication orale, et plusieurs inconvénients apparaissent au court du traitement ; efficacité partielle (nécessité de plusieurs agents antidiabétique à la fois), effets secondaires (hypoglycémie, acidose lactique ...), désensibilisation des cellules cibles (action prolongée du traitement)...

Actuellement la compréhension des mécanismes moléculaires de l'insulinosécrétion et de l'insulinosensibilité, ouvre la possibilité pour de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement du diabète sucré (Nourparvar et al.,2004). Vingt trois molécules sont aujourd'hui considérées à activité antidiabétique et sont commercialisées et utilisées pour le traitement du diabète sucré (Newman et al.,2003). L'origine de ces médicaments est différente : douze sont

d'origine biologique ; des peptides isolés d'organismes vivants ou des produits de biotechnologie, un est un produit naturel, deux sont des dérivés de produits naturels avec des modifications semi- synthétiques, sept sont des produits de synthèse trouvés par hasard ou par modification de molécules déjà existantes et un est issu de synthèse totale dont le pharmacophore est un produit naturel (Newman et al., 2003).

Devant la complexité de la maladie que soit sur le plan génétique ou métabolique et devant son importante prévalence mondiale, la découverte de nouvelles molécules antidiabétiques plus efficaces et moins onéreuses est aujourd'hui un domaine de recherche très intéressant, la valorisation de plantes médicinales utilisées pour le traitement du diabète sucré et de leurs dérivés est une partie importante de ce domaine (Vulksan et Sievenpiper, 2005).

Notre étude a pour but principal, l'évaluation de l'activité antidiabétique (dans un **modèle animal de diabète expérimental**) d'un composé majoritaire, la **globularine**, un iridoïde isolé et purifié à partir de *Globularia alypum L.*, plante utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement du diabète sucré et dont l'activité antidiabétique a été prouvée expérimentalement. Ce travail comporte deux parties, une **synthèse bibliographique** ; dans laquelle le diabète sucré et le traitement par les produits naturels dérivés de plantes médicinales ont été discutés, et une **étude expérimentale** dans laquelle nous avons réalisé les expériences suivantes :

Etude de la composition chimique de *G. alypum L.* ;

Extraction et purification de la **globularine** ;

Etude des flavonoïdes aglycones et des saponosides.

Etude de la **toxicité aigue** de la globularine ;

Evaluation de l'**activité antidiabétique** de la globularine.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le diabète sucré :

1-Concept du diabète sucré :

Le diabète sucré est une maladie métabolique, touchant le métabolisme glucidique, lipidique et protéique, caractérisée par une hyperglycémie chronique résultant d'un défaut de la sécrétion de l'insuline et/ou de l'action de l'insuline (kuzuya et al.,2002).

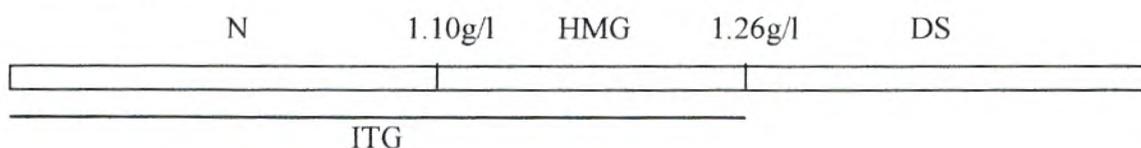
Plusieurs facteurs génétiques et environnementaux, souvent réactant en même temps, jouent un rôle dans l'étiologie et la physiopathologie de la maladie (Ekoé et Zimmet ,2001).

Le diabète sucré se manifeste par des symptômes caractéristiques : soif, polyurie, polydipsie, troubles de vision, perte de poids et infections, dans le cas où le traitement est absent ou inadéquat, l'état diabétique se développe rapidement vers une acidocétose ou coma hyperosmolaire, ce sont les complications aiguës du diabète sucré, cette situation peut mener à la mort si aucun traitement n'est administré (Ekoé et Zimmet,2001 ;Hennen,1996). Dans certains cas, les symptômes caractéristiques du diabète ne sont pas sévères ou même absents, le degré d'hyperglycémie présent d'une façon chronique agit progressivement sur les vaisseaux capillaires causant en conséquence la rétinopathie, la néphropathie, et la neuropathie.

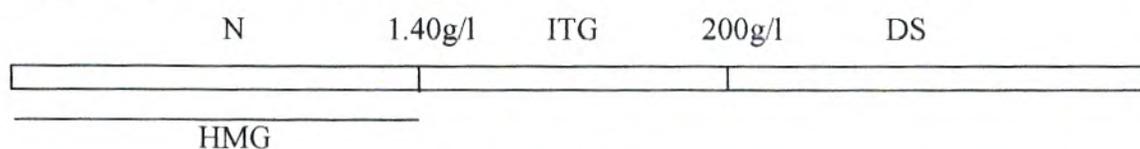
La situation s'aggrave au cours du temps par l'apparition de maladies touchant le rein, l'œil, les systèmes nerveux et cardiovasculaire, ceux-ci représentent les complications à long terme du diabète sucré (Ekoé et Zimmet, 2001).

En 1998, l'organisation mondiale de la santé (OMS), a accepté le diagnostic du diabète sucré proposé en 1997 par l'association américaine du diabète (ADA), et a confirmé que indépendamment de l'âge , un état diabétique est caractérisé par une glycémie à jeun supérieure ou égale à 1.26 g/l. D'autres catégories du trouble du métabolisme glucidique ont été également revisitées ; **Figure 1** (Peters et Schriger, 1998 ; Motta et al.,2006).

Glycémie à jeun :



Glycémie 2 h après une charge en glucose :



N ; Sujets normaux .DS ; Sujets diabétiques. HMG; Hyperglycémie modérée à jeun. ITG ; Intolérance au glucose.

Figure 1 : Valeurs de la glycémie utilisées pour le diagnostic du diabète sucré et d'autres catégories d'hyperglycémie.

En 1999, l'OMS a adopté avec l'ADA une nouvelle classification du diabète sucré, en se basant sur l'étiologie de la maladie et le degré du déficit en insuline (les stades pathophysiologiques). On a distingué ; le diabète de type1 (A, auto-immun et B, idiopathique), le diabète de type2, autres types spécifiques de diabète et le diabète gestationnelle (Ekoé et Zimmet, 2001 ;kuzuya et al.,2002).

2-Le Diabète de type1 :

Le diabète de type 1(DT₁) est une maladie auto-immune, caractérisée par une destruction sélective des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas (Baxter et Duckworth, 2004). L'aspect immunologique de la maladie a été établi en 1974 par Bottazzo (Humbel et Gilson, 1999). L'étude de sérum de malades a montré la présence d'autoanticorps dirigés contre les îlots de Langerhans. Par la suite des antigènes cibles ont été identifiés ; antigènes cytoplasmiques des îlots pancréatiques, glutamate-décarboxylase et protéine-tyrosine-phosphatase (Schmidt et al., 2005 ;Ananieva-Jordanova et al.,2005).

Le rôle de l'immunité cellulaire dans le processus autoimmune du DT₁ a également été prouvé. Des études sur des modèles d'animaux de diabète spontané, la souris NOD et le rat BB, ont montré une infiltration des cellules β des îlots de Langerhans par des macrophages et des lymphocytes notamment les CD8⁺ et CD4⁺ (Tisch,1996).

Le DT₁ est caractérisé par une phase préclinique, asymptomatique durant laquelle les autoanticorps sont décelables dans le sérum de malades, ceux-ci peuvent être un outil valable pour le diagnostic et la prédiction de la maladie (Verge et al., 1998).

Le DT₁est une maladie multifactorielle polygénique. L'étude des populations de malades a montré que le risque chez les germains de malades est de 6%, alors qu'il est de 0.4% chez la population générale. De plus, le taux de concordance chez les jumeaux monozygotes est de 30à50% (Hyttinen et al.,2003).Ces observations ont été évidentes pour démontrer la susceptibilité génétique au DT₁, depuis les travaux se sont dirigés vers la révélation des gènes responsables du DT₁.Plusieurs gènes ont été trouvés ; de la région HLA (classe II) notamment les gènes DR₃, DR₄etDQ₈ qui représentent le risque le plus élevé (Serrano-Rios et al., 1996). Des gènes de la région non HLA sont également incriminés (Gombos et al., 2006 ;Stech et al.,2005).

Le seul moyen disponible et efficace pour le traitement du DT₁ est un apport exogène strictement contrôlé de l'insuline (**Figure 2**), qui joue le même rôle que l'insuline propre à

l'organisme (totalement absente à cause de la destruction des cellules β pancréatiques : phénomène caractéristique du DT₁).

Les principaux effets de l'insuline dans la régulation de l'homéostasie du métabolisme sont (Kelley et al., 1990 ; Bailey, 1999) :

► La stimulation de :

- l'utilisation périphérique du glucose (\uparrow transporteurs du glucose) ;
- la glycogénèse (\uparrow glycogène synthase) ;
- la glycolyse (\uparrow glucokinase, \uparrow pyruvate kinase, \uparrow pyruvate déshydrogénase) ;
- la lipogénèse (\uparrow acétyle CoA carboxylase) ;
- la synthèse protéique (\uparrow synthèse de l'ARN).

► L'inhibition de :

- la gluconéogenèse (\downarrow phosphoénolpyruvate carboxykinase) ;
- la lipolyse (\downarrow triacylglycérol lipase).

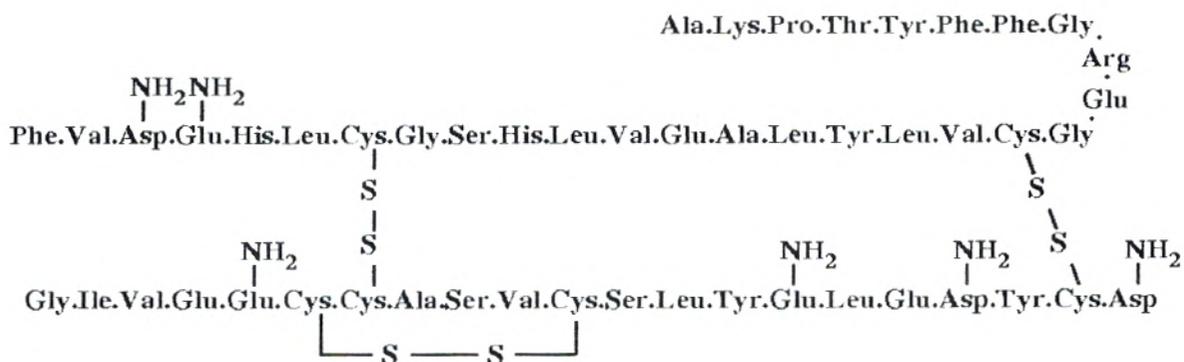


Figure 2 : La structure de l'insuline.

3- Le diabète de type 2 :

Le diabète de type 2 (DT₂) est caractérisé par une hyperglycémie, résultant d'une diminution de l'utilisation du glucose par les tissus périphériques notamment le muscle, et une diminution de la freinabilité de la production du glucose par le foie. Le DT₂ est également défini par un taux élevé des acides gras à cause d'une lipolyse exagérée (Guillausseau et Michelin, 2003).

Deux composantes sont à l'origine de ses altérations métaboliques l'insulinorésistance (Fujimoto, 2000) et un déficit de la sécrétion de l'insuline par les cellules β pancréatiques (Kahn, 2001). La présence simultanée de ces deux troubles est obligatoire pour définir un état de DT₂.

► L'insulinorésistance est définie par une diminution de l'activité de l'insuline sur les tissus cibles, le muscle, le foie et le tissu adipeux :

Le muscle est le site majeur de l'insulinorésistance, des études mesurant le taux de métabolites intracellulaires et utilisant la technique du clamp euglycémique-hyperinsulinique, ont montré que chez des sujets normaux dans des conditions post-prandiales, le muscle utilise 75% du glucose alors que cette utilisation chez des patients diabétiques est réduite de 50% (Shulman et al., 1990 ; Shulman, 2000). L'excès des acides gras libres est considéré comme responsable de cette anomalie (Roden et al., 1996 ; Kovacs, 2005). Le défaut réside en aval du récepteur de l'insuline, la cascade d'événements qui s'ensuit après fixation de l'insuline sur son récepteur est modifiée, le transport du glucose et la voie non oxydative du glucose ; la synthèse du glycogène sont donc altérés.

L'augmentation de la production hépatique du glucose par le foie est due à l'activation de la néoglucogenèse (Virally et al., 2007) deux facteurs peuvent être la cause :

-Une hyperglucagonémie chronique qui stimule les gènes codants les enzymes clés de la néoglucogenèse, la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et la glucose-6-phosphatase (G6-Pase) (Virally et al., 2007).

-Une augmentation du taux des acides gras au niveau du foie accompagnée d'une augmentation du taux ; d'ATP, d'acétyl-coA, de NADH, produits d'oxydations nécessaires pour la néoglucogenèse (Boden et al., 2001 ; Kovacs, 2005).

► Le dysfonctionnement de la cellule β -pancréatiques est caractérisé par (Guillausseau et Michelin, 2003 ; Virally et al., 2007) :

- La diminution ou la disparition de la sécrétion oscillatoire rapide de l'insuline.
- La disparition de la phase précoce de l'insulinosécrétion après administration intraveineuse du glucose.
- La présence d'une insulinopénie franche à l'état basal et après une charge en glucose.
- L'hypersécrétion de pro-insuline et de peptides immatures.
- La réduction progressive de la sécrétion de l'insuline au cours du temps. (Jusqu'à disparition totale).

Des facteurs génétiques et environnementaux sont à l'origine du DT₂, l'importance des facteurs génétiques est attestée par le degré élevé de concordance des jumeaux monozygotes de l'ordre de 90% (Barroso, 2005). La recherche de mutation en cause est fondée sur la méthode des gènes candidats et le criblage du génome, plusieurs régions du génome ont été incriminées. Selon l'étiologie génétique, on distingue deux formes de DT₂ ;

-La forme monogénique, minoritaire (5à10% des cas de DT₂), résultant de l'altération d'un seul gène ; on différencie les diabètes de type MODY , le MODY2 par exemple correspond à une mutation au niveau du gène 7p de la glucokinase (Froguel et Velho,1999) et les diabètes mitochondriaux MIDD qui sont habituellement dus a une mutation ponctuelle de l'ADN mitochondrial en position 3243 (Lostanlen et al.,2000).

-La forme polygénique, commune (90à95% des cas), résultant de l'altération à degré variable de plusieurs gènes liés à la synthèse, la sécrétion et l'action de l'insuline et également à la production hépatique du glucose (Tusié Luna, 2005).

Le régime alimentaire, l'activité physique, la médication orale et l'insuline sont les principaux agents pour le traitement du diabète de type 2. Les agents oraux sont utilisés lorsque la glycémie normale n'est pas obtenue par une nutrition équilibrée et une activité physique. L'insuline n'est prescrite que lorsque le traitement avec les agents oraux devient inefficace (Koski, 2006).

Actuellement, les agents oraux disponibles pour le traitement du DT₂, peuvent être classés en cinq classes pharmacologiques (**Figure3**): les sulfonylurées, les dérivés de l'acide benzoïque (des agents hypoglycémiques) et les biguanides, les inhibiteurs de α -glucosidases, les thiazolidinediones (des agents antihyperglycémiques). Le mécanisme d'action, la toxicité et les effets secondaires sont les principaux points de différence entre ces classes pharmacologique **tableau1** (Harrigan et al.,2001).

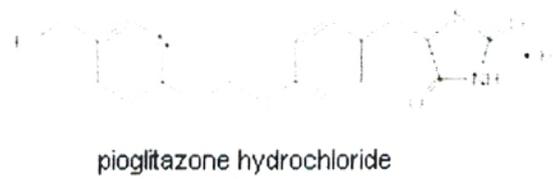
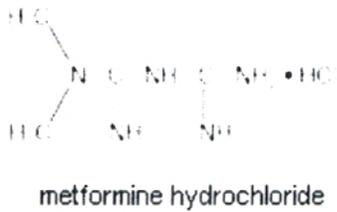


Figure3 : Structures chimiques des principaux antidiabétiques oraux utilisés dans le traitement du diabète sucré de type 2.

Agents antidiabétiques	Mode d'action	Diminution de la glycémie à jeun en mg/ dl	Diminution de HbA1C en%	Effets secondaires	Références
Les sulfonylurées (gliburide, glimepiride)	Augmentation de la sécrétion de l'insuline.	60 à 70	1.5 à 2	Hypoglycémie Prise de poids	Vicent et al., 1995 DeFronzo, 1999 Porzio et al., 1999
Les biguanides (metformine) DeFronzo, 1999	Inhibition de la production hépatique du glucose. Inhibition de l'absorption intestinale du glucose. Effet possible sur le métabolisme lipidique.	60 à 70	1.5 à 2	Acidose lactique	Stumvoll et al., 1995 Tiikkainen et al., 2004 Orban et al., 2006
Les inhibiteurs de α-glucosidases (acarbose)	Diminution de l'absorption intestinale du glucose.	20 à 30	0.7 à 1	Gastro-intestinaux	Baron, 1998 Josse, 1995
Les thiazolidinediones (pioglitazone)	Augmentation de la sensibilité du muscle et du tissu adipeux à l'action de l'insuline.	35 à 40	1 à 1.5	?	Elte et Blicklé, 2007

Tableau 1 : Agents antidiabétiques oraux utilisés pour le traitement du diabète sucré de type 2.

II. Le diabète sucré et les produits naturels dérivés de plantes médicinales :

1-Les produits naturels dérivés de plantes : aspect chimique :

1-1-Définition :

Les produits naturels sont des molécules à occurrence restreinte dans les groupes taxonomiques, ne sont pas nécessaires à la vie de la cellule (organisme), mais jouent un rôle dans l'interaction de la cellule (organisme), avec son environnement, assurant ainsi la survie de l'organisme dans son écosystème (Verpoorte, 2000).

Les plantes produisent un nombre très important de métabolites secondaires, chaque année 4000 nouvelles structures sont reportées (Verpoorte, 2000). Les produits naturels issus de plantes, ont une importance économique indiscutable, ils sont utilisés comme drogues, arômes, parfums, insecticides et colorants. 25 % des médicaments utilisés en médecine occidentale sont des dérivés de plantes, la morphine, la codéine, l'atropine, la metformine sont des exemples (Verpoorte, 2000).

1-2- L'origine biosynthétique :

Trois voies principales sont à l'origine de la plupart des métabolites secondaires : la voie du shikimate (source des composés aromatiques), la voie de l'isoprène (source des terpénoïdes) et la voie de l'acétate ; après la formation de la structure de base, des modifications ultérieures permettent la formation de substances nouvelles et différentes selon l'espèce, ces modifications concernent les groupements hydroxyle, méthoxyle, aldéhydique, carboxylique

Des réactions d'addition d'atomes de carbones, comme des groupements prényle, malonyle, ou des résidus glucidiques, des réactions d'oxydation avec perte de partie de la molécule ou des réarrangements participent à la formation de nouveau squelette (Dewick, 2002).

1-3-Les principaux groupements chimiques (Figure4) :

Les flavonoïdes : Les flavonoïdes sont des pigments quasi-universelles des végétaux : on les trouve sous forme hydrosoluble (hétérosides), ou sous forme libre (aglycones). L'élément structural de base de la synthèse des flavonoïdes est le 2-phénylchromane, selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central, on distingue plusieurs classes : flavonol, flavone et flavanone.

Les stilbènes : Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, formant un système conjugué. Cette particularité leur confère une grande réactivité due à la résonance des électrons sur la totalité de la molécule.

Les coumarines : Les coumarines sont des dérivés des phénylpropanoïdes, résultant de la cyclisation de l'acide o- hydroxycinnamique. Les structures les plus rencontrées dans la nature sont : l'ambelliférone et l'aesculetin.

Les tanins : Les tanins sont des polymères hydrosolubles ayant la capacité de précipiter les protéines, on distingue les tanins hydrolysables ; polymères de l'acide gallique et les tanins non hydrolysables ; polymères flavaniques.

Les quinones : Les quinones sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques, caractérisés par un motif 1-4 dicéto- cyclohexa- diénique. Les quinones peuvent être classées en quatre groupes : benzoquinones, naphthoquinones, anthraquinones et isoprénoids quinones.

les terpenoïdes : Les terpenoïdes sont des composés synthétisés par l'assemblage d'un nombre entier d'unité pentacarbonée ramifiée ; le 2-méthyl- butadiène (isoprène), selon le nombre d'unité isopréniques qui les constituent on distingue : les monoterpènes en C_{10} , les sesquiterpènes en C_{15} , les diterpènes en C_{20} , les triterpènes en C_{30} ...

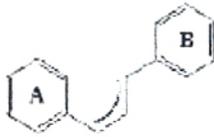
Les iridoïdes : Plus que 300 structures d'iridoïdes sont connues appartenant à quatre principales classes ; les iridoïdes simples, les iridoïdes glycosylés, les séco-iridoïdes et les bisiridoïdes . De nombreux iridoïdes sont des β -glycosides, l'aglycone étant un hémiacétal de squelette cyclopenta[c]pyrane. La globularine, l'aucubine , le catalpol et la loganine sont des représentants de cette famille de composés.

Les saponosides : Les saponosides sont des substances hétérosidiques à propriétés tensioactives ; selon la nature de la génine, on distingue deux groupes ; saponosides à génine stéroïdique et les saponosides à génine triterpénique.

Les alcaloïdes : les alcaloïdes sont des substances basiques, contenant un atome ou plus d'azote généralement inclus dans un système hétérocyclique. On distingue les alcaloïdes sels et les alcaloïdes bases.

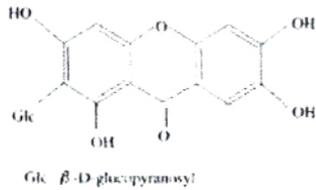
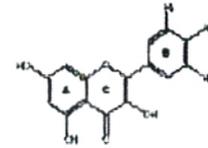
Ces différents composés chimiques ont été décrits selon ; Guignard et Henry, 1995 ; Harbone, 1998 et Bruneton, 1999.

A- Les flavonoïdes :

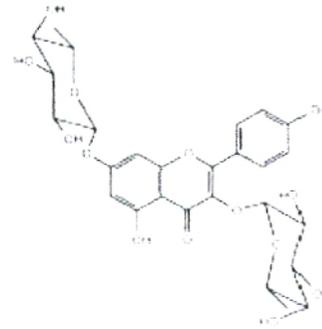


Structure de base des flavonoïde

flavonol	R1	R2	R3
myricétine	OH	OH	OH
quercétine	OH	OH	H
kampferol	H	OH	H

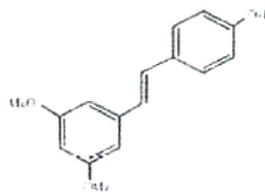


Mangiferin dérivé du flavanone



kampféritrine (kaempférol-3,7-O-(α)-L - dirhamnosid)

B- Les stilbènes :

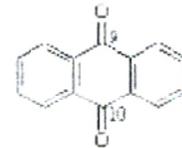


Les ptérostilbenes

C-les quinones:

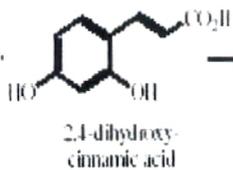


Quinone

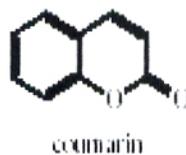


Anthraquinone

D- Les coumarines :



2,4-dihydroxy-cinnamic acid



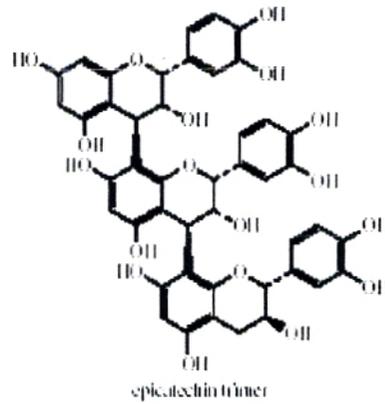
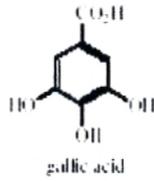
coumarin



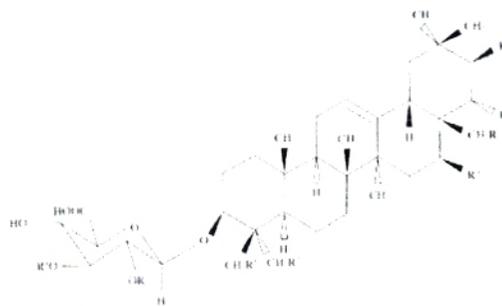
umbelliferone

Figure 4: Structures chimiques des différents métabolites secondaires.

E- Les tanins :

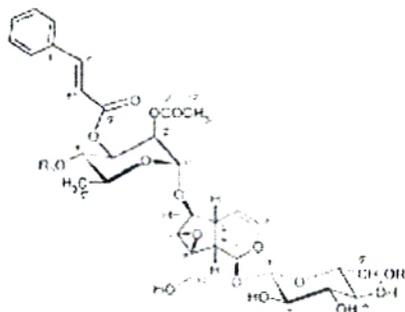
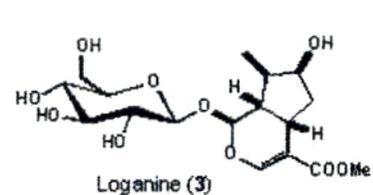
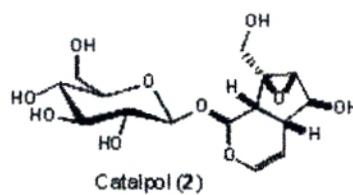
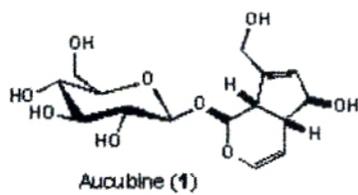
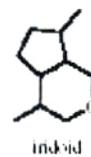
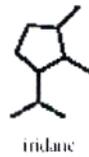


F- Les terpénoïdes :

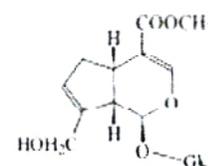


Triterpénoïde(β -Glu: - β -glucopyranosyl; O - NMA: - O - N-methylantraniloxy)

G- Les iridoïdes :



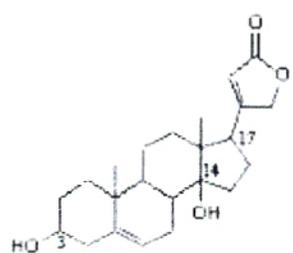
Scopolioside-D₂, R₁=R₂=COCH₃



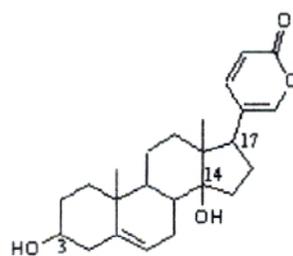
Geniposide

Figure 4 (la suite).

H- Les saponosides :

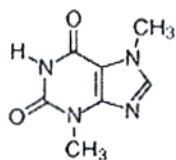


Digitoxigénine (Digitales)
cardénolides

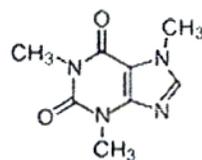


Scillarénine
bufadiénolide

I- Les alcaloïdes



Theobromine



Caffeine

Figure 4 (la suite).

2-Traitement du diabète sucré par les produits naturels dérivés de plantes:

L'utilisation de plantes médicinales participe d'une façon importante dans le traitement du diabète sucré, plusieurs populations croient énormément à l'efficacité de ces plantes. Des études ethnopharmacologiques et expérimentaux ont confirmé cette propriété relative aux plantes de pouvoir contrôler la glycémie des personnes diabétiques. En effet près de 1123 plantes dans le monde entier sont connues pour leur activité antidiabétique. Ces plantes se classent comme suit : 1123 espèces → 725 genres → 183 familles ; dont les familles les plus citées sont : Fabaceae, asteraceae, lamiaceae, liliaceae, poaceae et euphorbiaceae (Marles et Norman,1994).

La région du grand Maghreb a également sa part de cette source thérapeutique naturelle. En Algérie 32 plantes sont classées antidiabétiques dans la région de Tlemcen (Benmehdi, 2000), le Maroc est également riche en plantes antidiabétiques, 54 plantes dans la région Fez-Boulemane (Jouad et al.,2001), les plus citées dans ces études ethnopharmacologiques sont ; *Artemesia herba alba*, *Trigonella foenum-graecum*, *Zygophyllum gaetulum*, *Marrubium vulgare*, *Centaurium erythraea*, *Allium sativum*, *Allium cepa*, *Olea europaea*, *Nigella sativa*, *Globularia alypum*, *C.itrullus colocynthis*...

Parmi ces plantes, plusieurs ont été expérimentalement étudiées et leur effet hypoglycémiant a été prouvé. Différents extraits ont été testés dans des modèles expérimentaux de diabète. Les paramètres suivants ont été envisagés ; le(s) produit(s) naturel(s) le(s) plus actif(s), la dose la plus efficace, la durée du traitement, la toxicité et les mécanismes d'action, évoquant quelques exemples :

L'extrait aqueux de *Globularia alypum*L. (0.7g/kg), administré à des rats diabétiques (alloxan ;150mg/kg) et normaux a montré un effet hypoglycémiant remarquable, résultant d'un taux élevé d'insuline à partir de 20 minutes de l'administration de l'extrait (Skim et al.,1999).L'effet de l'extrait aqueux (300 mg/kg) de épicarpe de *citrullus colocynthis*L.,sur le taux de glucose a été recherché chez des lapins normaux , une diminution très significative de la glycémie a été mentionnée après 2 à 3 h de l'administration de l'extrait. Cet effet a été attribué à la présence de saponosides (Abdel-Hassan et al., 2000).Un épuisement des racines de *Morus alba*L. par l'éthanol à 70°C°, produit un extrait très riche en flavonoïdes, le traitement des rats diabétiques (STZ ;60mg/kg) par cet extrait alcoolique pendant 10 jours (600mg/kg/jour) diminue l'hyperglycémie de 3.79±0.09g/l jusqu'à 1.55±0.08g/l(Singa et al.,2005).L'extrait éthérique (100mg/kg)des feuilles de *Cogniauxia podoleana*L.,administré à des rats diabétiques (alloxan,125 mg/kg) a montré une diminution de la glycémie de 44.5% après 4h de l'administration(Diatewa et al.,2004) . L'extrait butanolique (80 mg/kg) des feuilles de *Malmea depressa* L., diminue

significativement la glycémie des rats diabétiques (STZ ; 65 mg/kg) dans 3 heures du traitement (Andrade-Cetto et al.,2005).

Autre part, plus que 200 molécules à l'état pur, appartenant à différentes familles de métabolites secondaires, ont montré la capacité de diminuer la glycémie. Les plus citées sont ; les alcaloïdes, les coumarines, les flavonoïdes, les glycosides cyanogéniques, les iridoïdes, les phenylpropanoïdes, les stéroïdes, les stilbènes, les terpenoïdes, les xanthones et les amines (Marles et Norman,1994).

Le tableau 2 cite quelques exemples de ces produits naturels purs testés expérimentalement pour l'activité antidiabétique.

Le seul exemple disponible d'un médicament à propriétés antidiabétiques approuvées et développées à partir d'une source végétale est le biguanide metformine issue de *Galega officinalis* (Witters ,2001). La recherche d'autres substances actives a propriétés antidiabétiques à partir de plantes est aujourd'hui un domaine de grande importance vu que le traitement du diabète sucré reste d'une façon générale insatisfaisant.

Métabolites secondaires	Dose/kg/h (Voie d'administration)	Durée du traitement (Jours)	Pourcentage de diminution de la glycémie (traitement des rats)	Mécanisme d'action	Références
Myricetine	3mg/kg/12h (IP)	5	50% après 2 jours ^(a)	↑ transport du glucose ↑ lipogénèse	Ong et al., 2000
Quercetine	10 mg/kg/24h (IP)	10	100% après 10 jours ^(a)	↑ nombre des îlots ↑ sécrétion de l'insuline	Vessal et al. , 2003
Mangiferine (xanthone glucoside)	20mg/kg/24h (IP)	28	48% après 14 jours ^(b)	?	Muruganandan et al., 2005
Ptérostilbene	40 mg/kg/24h (PO)	42	56% après 42 jours ^(a)	↑ glycolyse ↑ gluconéogenèse	Pari et Amarnath satheesh ,2006
Triterpénoïde	30mg/kg/24h (PO)	1	32% après 30 min ^(c)	↓ absorption intestinale du glucose	Shimizu et al., 2001
Kaempferitrine	100mg/kg/24h (PO)	1	21% après 3h ^(d)	↑ transport du glucose	Jorge et al., 2004
Scropolioside-D	10mg/kg/24h (PO)	1	34% après 2h ^(d)	?	Ahmed et al., 2003

^a streptozotocine .

^b KK-ay mice .

^c hyperglycémie provoquée par voie orale.

^d alloxan

Tableau 2 : L'effet de quelques métabolites secondaires, purifiés à partir de plantes, sur l'hyperglycémie provoquée chez des rats.

3-*Globularia alypum* L : description botanique, utilisation thérapeutique

et composition chimique :

Globularia alypum L. (Globulariaceés) « *Ain Larneb* », **Figure 5** est un arbuste d'environ 60cm de haut, pérenne, de feuilles coriaces, glauques de forme ovale, ses fleurs sont réunies en capitules au sommet des tiges, de couleur bleue violacée, ses fruits sont akènes. C'est une plante très répandue dans le territoire méditerranéen (Algérie, Maroc, Grèce...).

La plante est connue en pharmacopées traditionnelle pour ses propriétés curatives ; antidiabétique, laxative, cholagogue, stomachique, sudorifique et purgative (Ziyyat et al.,1997)



Figure 5 : *Globularia alypum*L.

L'étude de la composition chimique de la plante a été réalisée dans un but de découvrir les principaux produits naturels responsables de ces différentes activités thérapeutiques. Plusieurs métabolites secondaires ont été mis en évidence (**Figure6**) :

-**Des acides phénols** : acide p-hydroxybenzoïque, acide vanillique, acide syringique, acide caféique, acide β -résorcylique, acide sinapique, acide p-coumarique et acide férulique (Ben Hassine et al., 1982a).

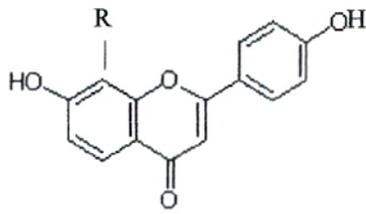
-**Des flavonoïdes** : La 4',7-dihydroxyflavone , l'apigénine-7-glucoside, le quercétol, le lutéoline-7-glucoside, la bayine et le rutoside (Ben Hassine et al.,1982b).

-**Des iridoïdes** : la globularine (Maio et Panizzi, 1966), catalpol (Bernard et al.,1974), la globularimine , la globularinine (Chaudhuri et Sticher ,1979), la globularicisine, la globularidine (Chaudhuri et Sticher ,1981),le globularioside (Es-Safi et al.,2006).

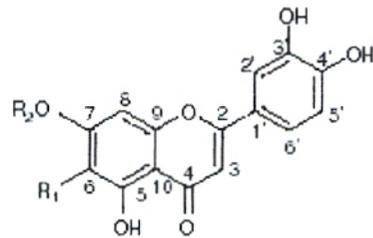
-Un aryle glucoside : la Syringine,**un lignane diglucoside** :liriodendrine (Chaudhuri et Sticher, 1981).

-Des anthocyanes : la cyanidine et la paéonidine. (Ben Hassine et al., 1982b).

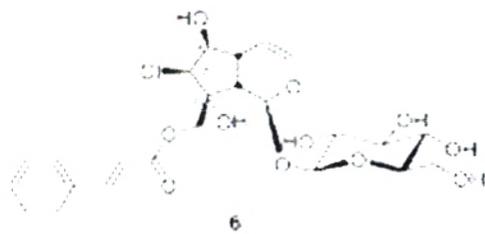
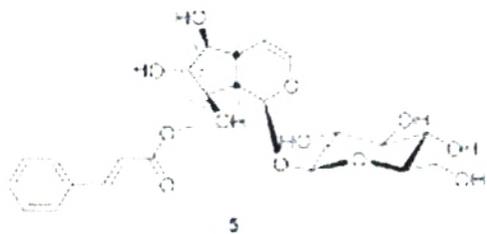
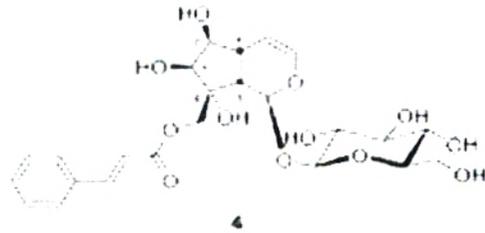
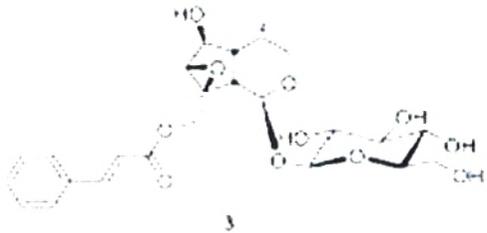
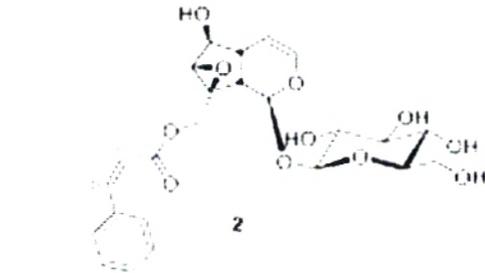
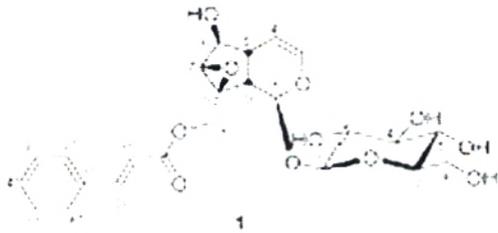
-Des phenylethanoïdes (Es-Safi et al., 2007).



F₁ ; 4',7-dihydroxyacetone : R=H
F₂ ; Lutéoline-7-glucoside R₁=H, R₂=Glucose

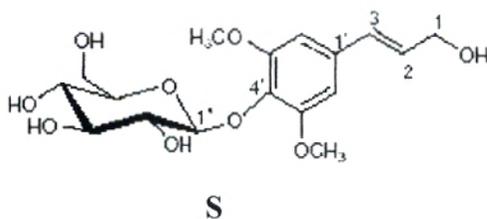


F₃ ; Quercétol : R₁=R₂=H
F₄ ; Bayine : R=glucose

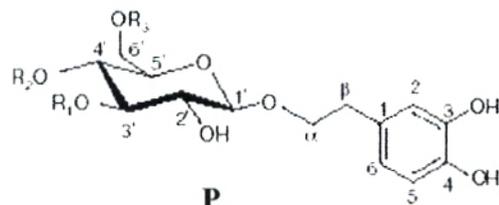


I

1 la globularine, 2 la globularicisine, 3 la globularidine, 4 la globularinine, 5 la globularimine et 6 la globularioside (chlorinated iridoid glucoside).



S



P

P₁: R₁=H, R₂=Rhamnosyl, R₃=*E*-Caffeoyl
P₂: R₁=Rhamnosyl, R₂=H, R₃=*E*-Caffeoyl
P₃: R₁=Rhamnosyl, R₂=H, R₃=*E*-Caffeoyl
P₄: R₁=R₂=H, R₃=*E*-*p*-Coumaroyl

Figure 6: Structure de quelques composés isolés des feuilles de *G. alypum* L. (F=flavonoïdes, I iridoïdes, S=syringine, P=Phényléthanoides).

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Matériels et méthodes

1. Etude de la composition chimique de *Globularia alypum* L :

Matériel végétal : Les feuilles de *G. alypum* ont été récoltées dans la région d'Oum el Alou (Tlemcen) durant le mois de février 2006. Les feuilles séchées à l'ombre et à l'abri de l'humidité ont été broyées en fine poudre à l'aide d'un broyeur électrique et stockées soigneusement jusqu'à utilisation.

1-1-Tests phytochimiques :

Les propriétés chimiques des substances naturelles sont utilisées pour leur mise en évidence dans différents extraits de plantes. Le développement de coloration et/ou la formation de trouble (voire un précipité) témoigne d'une réaction spécifique entre les groupements chimiques et les réactifs utilisés.

Dans cette partie, nous allons exposer les différents tests utilisés pour détecter qualitativement les principales familles de métabolites secondaires dans les feuilles de *G. alypum*.

Les flavonoïdes ; test de Shinoda : 2 millilitres de l'extrait aqueux (ou alcoolique) sont additionnés de quelques tournures de magnésium et quelques gouttes d'HCl concentré.

Le développement de coloration rouge, orange ou jaune indique la présence des flavonoïdes (Malec et Pomilio, 2003).

Les coumarines : 5 ml d'un filtrat éthanolique, obtenu après extraction à 70c°, sont évaporés à sec. Le résidu ainsi obtenu est repris dans de l'eau chaude. Un volume de cette phase aqueuse est additionné d'une solution NH₄OH à 10%, un autre volume est gardé comme témoin. L'apparition de fluorescence après observation sous UV, indique la présence des coumarines (Bruneton, 1999).

Les tanins: Un volume d'extrait aqueux (ou alcoolique) est d'additionné de quelques gouttes de FeCl₃ à 1 %. Le développement de coloration bleu, bleu noir ou vert indique la présence des tanins (Karumi, 2004).

Les quinones libres ; réaction de Bonträger : Un extrait d'éther de pétrole est concentré, quelques gouttes de NaOH à 1/10 sont ajoutées, la présence des quinones libres est confirmée lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet (Dohou et al., 2003 ; Oloyede, 2005).

Les anthraquinones : 10 ml d'extrait benzénique sont additionnés de 5 ml d'une solution de NH_4OH à 10 %. Après agitation des deux phases, la présence d'une coloration violette dans la phase ammoniacale indique la présence des anthraquinones (Oloyede, 2005).

Les terpénoïdes ; test de Salkowski : 5 ml d'un extrait aqueux sont délicatement mélangés avec 2 ml de chloroforme et 3ml H_2SO_4 concentré. Le développement d'une coloration marron à l'interface indique la présence des terpénoïdes (Edeoga et al.,2005).

Les saponosides : L'extrait aqueux refroidi et agité énergétiquement (sens horizontal) dans un tube bien fermé pendant 30 secondes, développe ou non une mousse selon la présence ou l'absence des saponosides (Pinkas). La lecture du tube est réalisée après mesure de la hauteur de la mousse :

Pas de mousse ; test négatif

< 1 cm ; faiblement positif

1 à 2 cm ; test positif

>2cm ; test très positif.

Identification de la nature de la génine ; réaction de Libermann –Burchard :

Quelques milligrammes de plante en poudre sont dissous à chaud dans un 1 ml d'anhydride acétique, et additionnés d'une goutte de H_2SO_4 concentré. Un dérivé stéroïdique développe une coloration verte, plus ou moins immédiate, alors que le dérivé triterpénique développe une coloration rouge (Pinkas).

Les alcaloïdes : Un volume d'extrait alcoolique est évaporé à sec. Le résidu ainsi obtenu est repris par 5 ml d' HCl à 5N, et est chauffé dans un bain Marie. Après refroidissement et filtration, le filtrat est divisé en deux volumes égaux. Un volume est traité par le réactif de Wagner¹ l'autre par le réactif de Mayer². La formation de turbidité ou précipité indique la présence des alcaloïdes (Mojab, 2003).

¹**Réactif de Wagner :** 2 g de KI et 1,27g d' I_2 solubilisé dans 100 ml d'eau distillée.

²**Réactif de Mayer :** 5 g de KI et 1,358 g de HgCl_2 solubilisés dans 100 ml d'eau distillée.

1-2-Extractions sélectives :

Après étude qualitative de la composition chimique des feuilles de *G.alypum*, il est intéressant d'étudier des groupements chimiques particuliers et essayer de les isoler, les purifier et les identifier, ce qui représente le but de cette partie.

1-2-1-Extraction de la globularine:

L'extraction de la globularine a été réalisée en deux temps :

Extraction sélective à partir du matériel végétal (solide-liquide et liquide-liquide).

Fractionnement de l'extrait obtenu, dans la première étape, sur colonne ouverte de chromatographie liquide.

► Extraction sélective à partir du matériel végétal: nous avons réalisé les étapes suivantes :

- Epuisement du matériel végétal par un mélange eau : acétone (4 :6 /v : v).
- Filtration et concentration du filtrat. (Élimination de l'acétone).
- Extraction de la phase aqueuse par l'éther de pétrole. (Écartement de la phase organique susceptible de contenir les lipides, les graisses et les résines).
- Extraction de la phase aqueuse par éther diéthylique. (Écartement de la phase éthérée susceptible de contenir les chlorophylles).
- Extraction de la phase aqueuse par l'acétate d'éthyle.
- Evaporation à sec de la phase organique acétate d'éthyle. (L'obtention d'un résidu sec de couleur Jaune foncé sous forme de poudre).

► Fractionnement du résidu sec issu de la phase d'acétate d'éthyle par chromatographie liquide sur colonne ouverte (chromatographie d'adsorption) :

Principe : la chromatographie d'adsorption utilise une phase stationnaire qui adsorbe des groupements chimiques, le degré d'adsorption est lié à la nature chimique des groupements à séparer. L'élution réalisée par des solvants de polarité différente libère les molécules selon leur degré d'adsorption et leur affinité différentielle vis-à-vis du solvant.

Technique : L'extrait sec obtenu à partir de la phase d'acétate d'éthyle a été fractionné sur colonne ouverte de silice (**Kieselgel 60,70-230mesh, Merck**). La phase mobile utilisée pour l'élution a été un mélange de deux solvants ; l'acétate d'éthyle et le méthanol dans les proportions suivantes : **200:0/ 98:2/ 180 :20 / 85 :15(v/v)**.

La collection des différentes fractions a été réalisée dans une série de tubes à essais. Le débit de la phase mobile et la taille des fractions ont été ajustés durant toute l'expérience.

L'identification du contenu de chaque tube a été réalisée par chromatographie sur couche mince [gel silice F₂₅₄ 250µm/20/20, Whatman Backing].

Les tubes qui ont montré les mêmes taches (les mêmes composés) sont réunis et évaporés à sec.

Un échantillon authentique, la globularine fournie par M^{me} Meriah Salima, Laboratoire COSNA, faculté des sciences Tlemcen, a été utilisé comme témoin positif.

La détermination de la structure de la globularine a été réalisée par des analyses spectrales¹ de : RMN¹H, COSY, ¹³C, DEPT et HMBC et spectrométrie de masse.

¹ Réalisés à Université Bordeaux 1 sciences technologies ; Laboratoire de Chimie des Substances Végétales.

1-2-2- Extraction des flavonoïdes aglycones :

Cette étude a été réalisée selon les étapes suivantes (Harbone, 1998) :

- Hydrolyse acide de 2 g de plante en poudre en présence de 160 ml d'HCl 2 N. (chauffage à 100°C pendant 30 à 40 min).
- Refroidissement et filtration plusieurs fois de la solution obtenue.
- Extraction du filtrat par acétate d'éthyle.
- Evaporation à sec de la phase d'acétate d'éthyle.
- Reprise du résidu ainsi obtenu par du méthanol, et analyse par CCM.

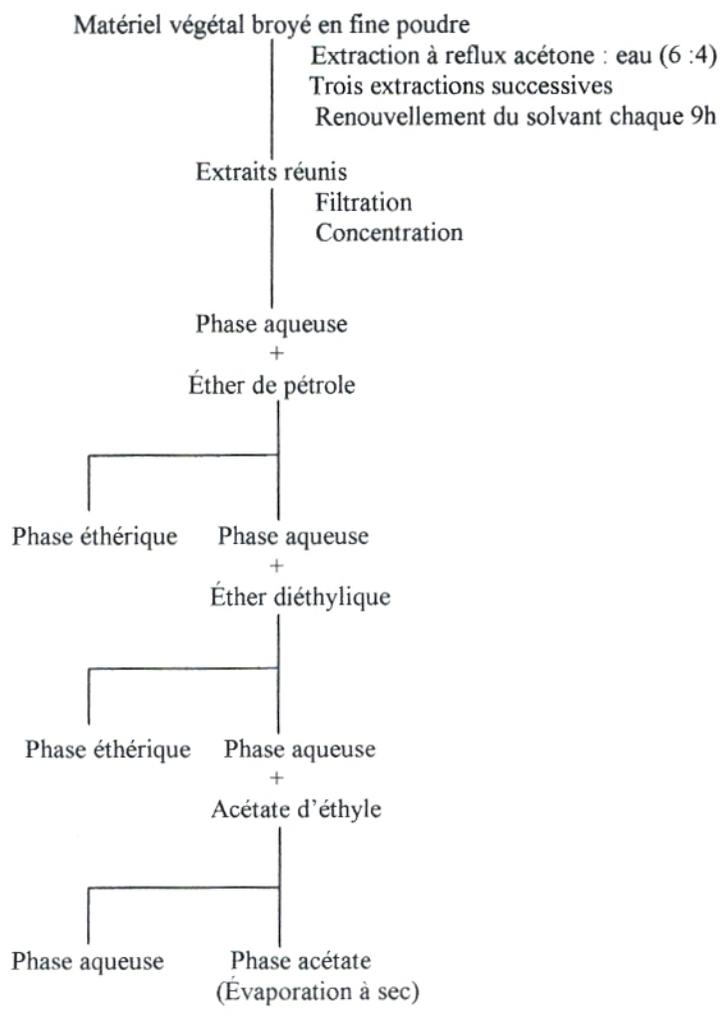
Après étude de plusieurs systèmes de solvants, La phase suivante a montré la meilleur séparation, et a été donc sélectionnée ; toluène : acétate d'éthyle : acide formique : méthanol (3 :3 :0.8 :0.2).

Après développement du chromatogramme, les R_f des taches et la fluorescence ont été pris en considération.

1-2-3- Extraction des saponosides:

L'extraction des saponosides a été réalisée selon les étapes suivantes (Edeoga, 2005):

- Epuisement à reflux du matériel végétal par l'éthanol aqueux (2 :8 v : v). Le montage a été réalisé dans un bain Marie (55°C).
- Filtration et concentration du filtrat. (Elimination de l'alcool).
- Extraction de la phase aqueuse par éther diéthylique.
- Extraction de la phase aqueuse par le butanol normal.
- Lavage de la phase butanolique par une solution de NaCl à 5%.
- Evaporation de la phase butanolique.
- Séchage du résidu ainsi obtenu à poids constant et mesure de la masse.
- Un test de solubilisation a été réalisé dans différents solvants de polarité différente: eau, méthanol, éthanol, , acétone et chloroforme



-Fractionnement sur colonne ouverte de chromatographie liquide ;
 Acétate d'éthyle (ml) 200 98 180 95
 Méthanol (ml) 0 2 20 15
-Collection des fractions
-Identification par CCM (comparaison à un témoin identifié par analyse spectrale)

Figure 7 : Extraction de la globularine.

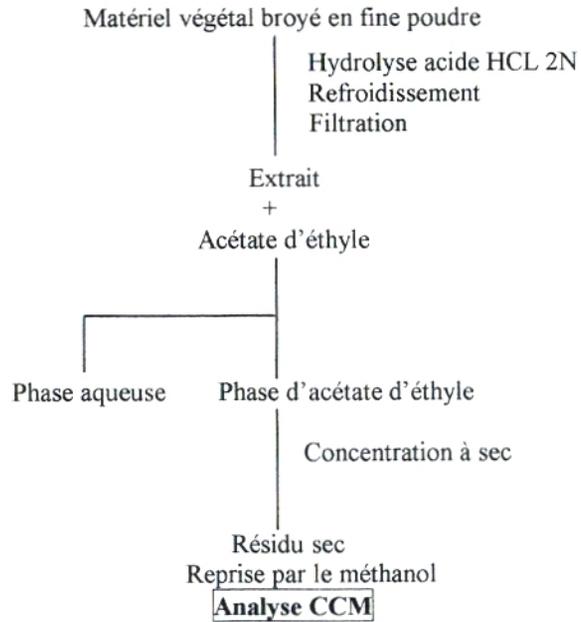


Figure 8: Extraction des flavonoïdes aglycones.

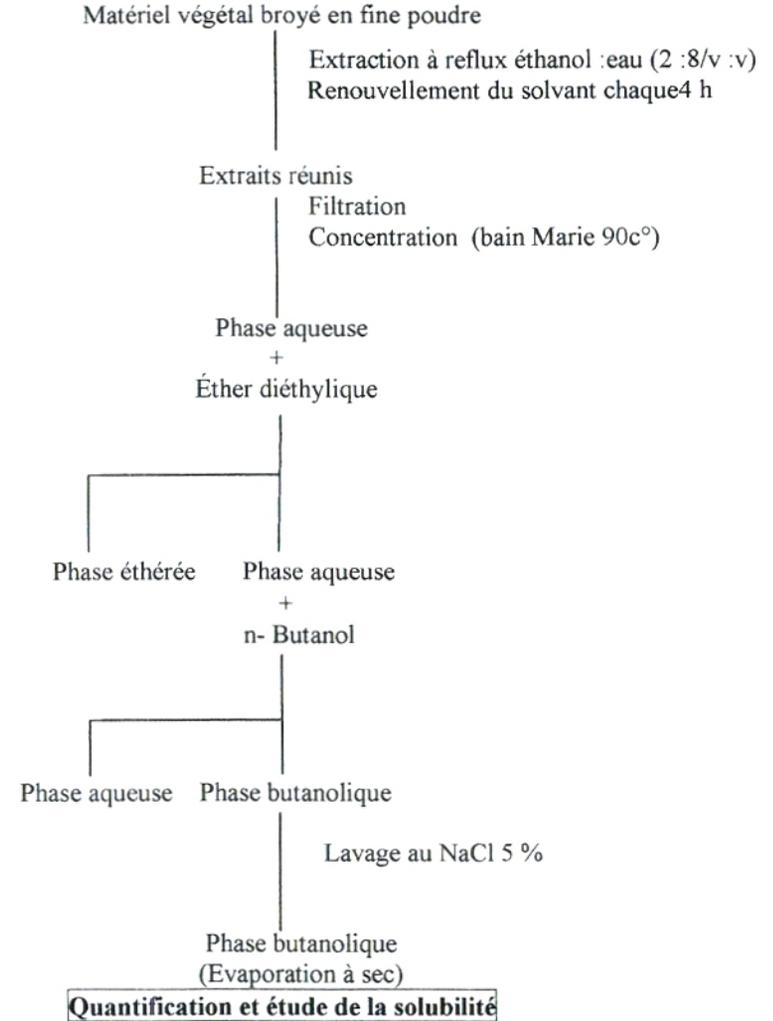


Figure 9 : Extraction des saponosides.

2. Tests biologiques; évaluation de la toxicité et de l'effet antidiabétique de la globularine chez les rats.

La globularine, iridoïde extrait des feuilles de *G. alypum* a été utilisé pour tester son activité antidiabétique dans des rats normaux et dans un modèle animal expérimental de diabète. Le glibenclamide une substance connue pour son activité antidiabétique a été utilisée comme référence.

Dans ce chapitre nous allons examiner les expériences suivantes réalisées sur les rats;

- Evaluation de la toxicité relative à la globularine.
- Induction du diabète expérimental.
- Etude aigue de l'activité antidiabétique de la globularine.
- Test de tolérance au glucose de la globularine.
- Etude sub-chronique de l'activité antidiabétique de la globularine.

Les animaux : Des rats Wistar (*Rattus norvegicus*) de l'animalerie du département de biologie ont été disponibles pour nos tests. Des mâles et des femelles ont été utilisés.

Le poids des rats a été compris entre 150 et 300 g. (Les poids inférieurs à 200g ont été utilisés pour les tests de toxicité). L'aliment [ONAB] contenant des glucides, des protéines, des lipides et des sels minéraux, et l'eau de robinet ont été fournis ad libitum.

Les animaux ont été maintenus dans des cages propres sous des conditions standards de laboratoire et ont été traités et manipulés selon les normes dictées dans le manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation (CCPA, 1984).

La répartition des lots a été en fonction de l'expérience.

2-1- Evaluation de la toxicité de la globularine chez des rattes :

La globularine a été testée pour sa toxicité aigue chez la ratte.

Des femelles à jeûne pendant 16 heures, de poids corporel compris entre 150 et 200 g ont été utilisées. Différentes doses, 300, 600, 800 et 1000mg/kg de la globularine ont été administrées par injection intra péritonéale unique à différents lots de rattes (2 rattes par lot), le lot témoin reçoit du sérum physiologique à 0.9%, 5ml/kg de poids corporel.

Le comportement général et la mortalité des animaux ont été observés périodiquement pendant 48 heures ; d'une façon continue pendant les premières 4 heures, d'une façon discontinue durant les 6 heures qui s'ensuivent et encore à 24 heures et à 48 heures après les injections. L'observation des animaux est poursuivie une fois par jour pendant 14 jours.

A la fin de l'expérience les animaux ont été pesés et sacrifiés.

2-2- Induction du diabète expérimental :

Un diabète expérimental a été provoqué chez des rats à jeun (16 heures) males et femelles, par unique injection intra péritonéale de la streptozotocine (Fluka, ≥98.0%) à 60mg/kg,p.c préparée, juste avant administration, dans un tampon citrate (0.01M, pH4.5). Des rats témoins ont été injectés par le tampon citrate (5ml/kg,p.c).

Après 72h de l'injection de la STZ., les rats qui ont une glycémie supérieure ou égale à 3g/l sont considérés comme diabétiques et ont été utilisés dans l'expérience.

2-3- Etude aiguë de l'activité antidiabétique de la globularine:

Des rats males diabétiques et normaux ont été soumis à un jeûne de 16heures.Le poids des rats a été déterminé le jour même de l'expérience, avant l'administration des substances à tester. Les substances à tester ont été administrées par voie intra péritonéale (injection unique).

Six groupes de rats (5 rats par groupe) ,3 normoglycémiques et 3 diabétiques ont été traités comme suit :

Groupe1 : Normoglycémique control ; recevant du sérum physiologique à 0.9%, (5ml/kg,p.c).

Groupe 2 : Normoglycémique control positif ; recevant du glibenclamide à 0.6mg/kg,p.c.

Groupe 3 : Normoglycémique ; recevant de la globularine 100mg/kg, p.c.

Groupe4:Diabétique control ;recevant une solution du sérum physiologique à0.9%(5ml/kg, p.c).

Groupe 5 : Diabétique control positif ; recevant du glibenclamide 0.6mg/kg,p.c.

Groupe 6 : Diabétique ; recevant de la globularine 100mg/kg,p.c.

Le sang a été collecté à partir de l'extrémité de la queue à 0h (avant l'injection) et à 60, 120, 180, 240,360et480min (après injection).

La glycémie a été mesurée directement après prélèvement par des bandelettes Accu Chek active et lecteur glycémie Accu Chek.

2-4- Test de tolérance au glucose chez des rats normaux :

Un test de tolérance au glucose a été réalisé sur 3 groupes de rats males. Après un jeûne de 16 heures, les rats ont été chargés d'une solution de glucose (2.5g/kg) ,90 min après administrations des molécules suivantes ; le NaCl (0.9% ; 5ml/kg), le glibenclamide (0.6 mg/kg) et la globularine (100 mg/kg).

Un échantillon de sang a été collecté de l'extrémité de la queue à 0 min (avant gavage) et à 30, 60, 90, 120,180 min après gavage. La glycémie est mesurée directement par lecteur glycémie Accu Chek

2-5- Etude sub - chronique de l'activité antidiabétique de la globularine :

Des rats males et femelles diabétiques et normaux ont été utilisés, le nombre total est de 28 rats repartis de la manière suivante :

Groupe 1(3 males+3 femelles) : Normoglycémique control traités par du sérum physiologique à 0.9% 5ml/kg, p.c (injection intra péritonéal, 2 fois/jour).

Groupe 2(3 males+3 femelles) : Diabétique control traité par du sérum physiologique à 0.9% 5ml/kg, p.c (2 fois/jour).

Groupe 3 (4 males+4 femelles) : Diabétique control positif traité par du glibenclamide 0.6mg/kg,p.c (2 fois/jour).

Groupe 4(4 males+4 femelles) : Diabétique traité par la globularine 100mg/kg, p.c (2 fois/jour).

Les rats des différents lots ont été traités de la même manière. Les rats ont été injectés par les solution à tester deux fois par jour durant une période de 7 jours. La glycémie des rats non à jeun, journalière a été déterminée après la première injection, à partir du sang prélevé de l'extrémité de la queue à l'aide d'un glucomètre (Accu Chek). Le poids des rats, les quantités d'aliment et de l'eau consommées ont été également mesurées quotidiennement et à la même heure.

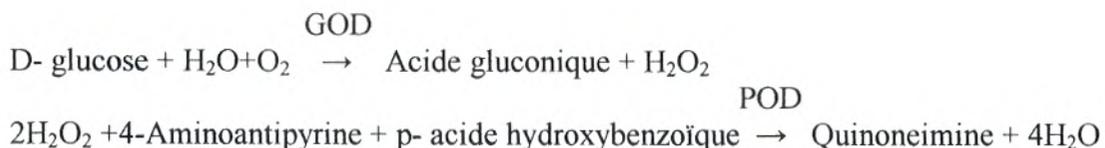
Le pourcentage de diminution de la glycémie a été calculé selon la formule suivante :

$G\% = \frac{G_t - G_0}{G_0} \times 100$; avec G_t =glycémie au temps t, G_0 =glycémie au temps t=0.

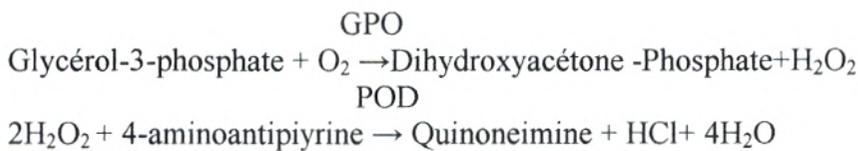
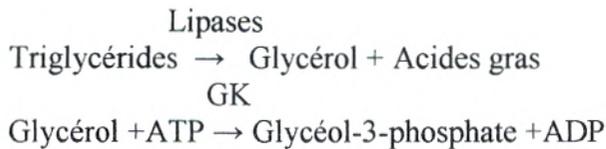
Après la dernière injection les rats des 4 lots ont été privés d'aliment pendant toute la nuit. Un prélèvement du sang a été effectué le matin à partir du sinus rétro orbital, les paramètres lipidiques ont été dosés sur sérum sanguin; les triglycérides et le cholestérol total, de plus la glycémie à jeun a été mesurée.

► Les dosages sériques ont été réalisés comme suit :

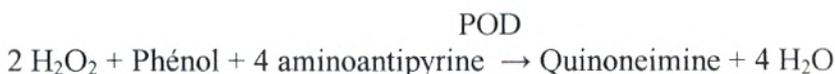
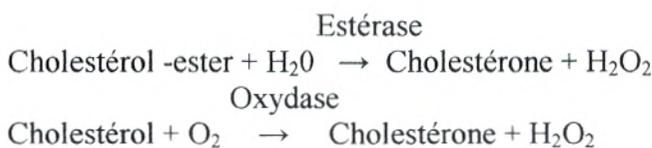
Le dosage du glucose sérique a été réalisé par un test enzymatique colorimétrique (Kit Quimica Clinica Aplicada S.A) basée sur la méthode de Trinder (1969) dont le principe est le suivant :



Le dosage des triglycérides sérique a été réalisé par un test enzymatique colorimétrique (Kit Quimica Clinica Aplicada S.A) basée sur la méthode de Fassati et Prencipe (1982), dont le principe est le suivant :



Le dosage du cholestérol total sérique a été réalisé par un test enzymatique colorimétrique (Kit SARL Prochima,) basée sur la méthode de Fasce (1982), dont le principe est le suivant :



-Pour les trois dosage, la lecture a été réalisée contre un blanc et en comparaison à un étalon par un spectrophotomètre (Jenway).L'intensité de la coloration mesurée à 505 nm est proportionnelle à la concentration en produit coloré.

Pour chaque expérience décrite en dessus une étude statistique a été réalisée à fin de pouvoir comparer les différents résultats : Le test de Student de distribution bilatérale et de type hétéroscédastique (type 3) a été choisit, l'interprétation de la **différence en fonction de P** ; le degré de signification est la suivante :

P < 0,05 (*) : Peu significative.

P < 0,01 (**) : Significative.

P < 0,001 (***) : Très significative.

P < 0,0005 (****) : Hautement significative.

Les résultats sont représentés sous la formule : Moyenne ± Erreur standard.

II. Résultats :

1. la composition chimique de *Globularia alypum* L :

1-1- Tests phytochimiques :

L'étude phytochimique effectuée sur les feuilles de *G. alypum* a donné les résultats reportés dans le **tableau 3**. Les réactifs de caractérisation classiques ont permis de mettre en évidence les groupements chimiques suivants : les flavonoïdes, les coumarines, les tannins, les terpénoïdes et les saponosides.

Les tests de recherche des quinones, des anthraquinones et des alcaloïdes ont été négatifs sur notre échantillon.

Tableau 3: Groupements chimiques présents et absents dans les feuilles de *G. alypum*.

Groupements chimiques	Principe du test	Résultat des réactions en tube
Les flavonoïdes	Réduction en présence d'acide concentré et de magnésium	+
Les coumarines	Fluorescence UV à 336nm	+
Les tannins	Formation de complexe d'oxydation en présence des chlorures ferriques dilué	+
Les quinones / anthraquinones	Dissolution des quinones en milieu alcalin aqueux	-
Les terpénoïdes	Elimination d'eau et formation d'insaturations supplémentaires	+
Les saponosides	Pouvoir moussant en solution aqueuse	+
Réaction de Libermann-Burchard	Isomérisation ou transposition moléculaire	dérivé stéroïdique
Les alcaloïdes	Précipitation des hydrates des métaux lourds (Iode, mercure)	-

1-2- Extractions sélectives :

1-2-1-Fractionnement de la phase d'acétate d'éthyle sur colonne ouverte de gel de silice et purification de la globularine:

La phase d'acétate d'éthyle a donné, après évaporation a sec, un résidu en poudre de couleur jaune foncé, à 10% (g/g), masse calculée par rapport à la matière sèche.

Après fractionnement de ce résidu sur chromatographie sur colonne ouverte, sept fractions différentes ont été isolées (**Tableau 4**).

La comparaison avec la globularine (échantillon authentique) a permis d'identifier un composé des fractions 4, 5, 6 et 7 qui correspond à la globularine. La fraction 5 est la plus pure (uniquement de la globularine) et sera utilisée par la suite dans les tests biologiques, la fraction 4 va subir une deuxième purification sur colonne en utilisant les mêmes solvants que précédemment, dans une tentative d'obtenir encore de la globularine sous forme pure.

Les fractions 6 et 7 ont été abandonnées vu que la globularine n'existe que sous forme de trace, (**Figure 10**).

Tableau 4 : Différentes fractions isolées de la phase d'acétate d'éthyle par chromatographie sur colonne. ^a pour 100 g de matière sèche.

Fractions	Aspect physique et couleur	Poids (mg)	Rendement % (g/g) ^a	Nombre de composés	Rf	Couleur sous UV 336nm
1	Pâte visqueuse verte	116	0.38	1	0.61	Bleu
2	Poudre blanc cassé	88	0.29	2	0.61 0.44	Bleu clair Bleu foncé
3	Poudre jaune foncé	172	0.57	2	0.61 0.44	Bleu clair Bleu foncé
4	Poudre jaune	623	2.08	2	0.33 0.27	-
5	Poudre jaune	1023	3.41	1	0.27	-
6	Poudre blanche	20	0.07	3	0.27 0.15 0.11	-
7	Poudre marron	143	0.47	2	0.27 0.11	-

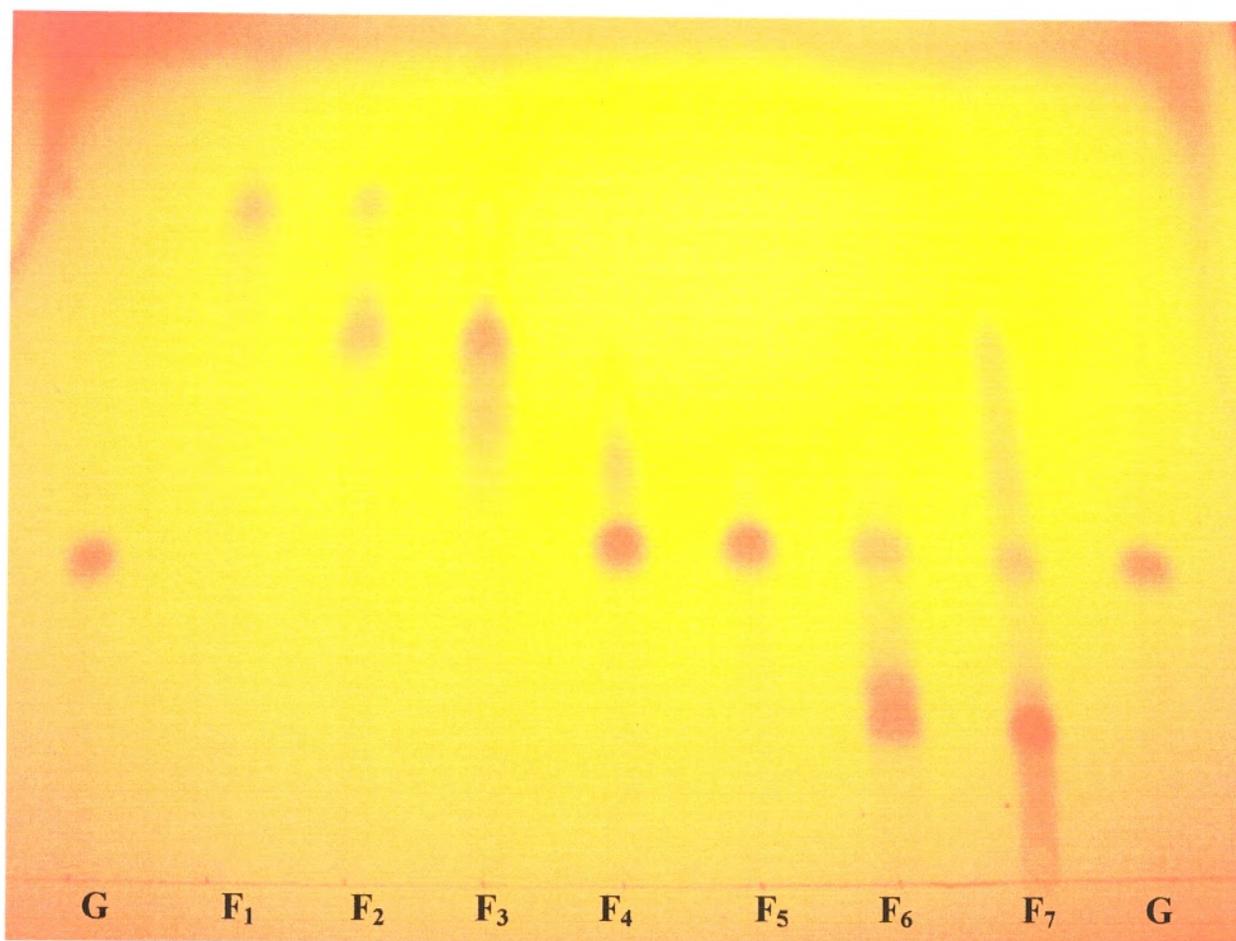


Figure10 : Chromatogramme des différentes fractions (F) isolées et purifiées à partir de l'extrait d'acétate d'éthyle, comparés à la globularine (G).

L'identification de la globularine a été réalisée par analyse spectrale :

► **En RMN ;**

Le **tableau6** dans l'annexe A résume les résultats théoriques et expérimentaux de la RMN¹H et du COSY.

Le **tableau7** dans l'annexe A résume les résultats théoriques et expérimentaux ¹³C (annexe D). DEPT et HMBC .

► **En SM** , les principaux fragments observés

sont : m/z : **131(100.00%),28(40.06%),103(35.8%),148(28.02%),182(7.38%),330(4.48),492(5.8 %)**.Ce qui correspond à une masse molaire de 492.14g/mole(la masse molaire théorique est égale à 492.48g/mole).

Formule chimique : C₂₄H₂₈O₁₁.

Nomenclature : 3-phenyl-acrylicacid6-hydroxy-2-(3,4,5-trihydroxy-6-hydroxymethyl-tetrahydro-pyran-2-yloxy)-1b,5a,6,6a-tetrahydro-2H-1,3-dioxa-cyclopropa<a>inden-1a-ylmethyl ester.

► **En UV** (méthanol) ; $\lambda_{\text{max}}=279.55\text{nm}$.

La structure de la globularine ainsi déterminé est la suivante :

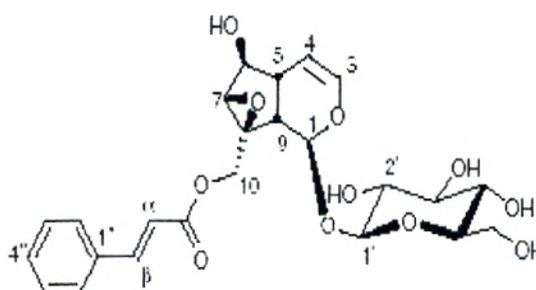


Figure 11 : Structure de la globularine

1-2-2- Chromatographie sur couche mince des flavonoïdes aglycones :

L'analyse qualitative par CCM des produits de l'hydrolyse acide nous a informé sur le nombre possible des flavonoïdes aglycones constitutives des feuilles de *G.alypum* :

5 taches ont été détectées sur chromatogramme, (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Les caractéristiques des flavonoïdes aglycones, obtenus par CCM.

Composés	Rf	Couleur sous UV	
		UV 254 nm	UV336 nm
1	0.33	Marron	Marron
2	0.44	Bleu	Bleu
3	0.55	Bleu	Bleu
4	0.64	Mauve	-
5	0.77	Blanc	-

1-2-3- Quantification et solubilité des saponosides:

Seule une estimation quantitative de l'extrait de saponosides a été possible. L'extrait butanolique a apporté $3.42 \pm 0,48 \%$ (g/g) (2 essais) de saponosides très soluble dans le méthanol, peu soluble dans l'eau et éthanol et insoluble dans l'acétone et le chloroforme. L'analyse de cet extrait par CCM, n'a apporté aucune information, en effet aucun système de solvant utilisé n'a montré une bonne séparation.

2. Tests biologiques; évaluation de la toxicité et de l'effet antidiabétique de la globularine chez les rats.

2-1- la toxicité de la globularine chez des rattes :

L'étude de la toxicité aigüe de la globularine chez des rattes a montré que les différentes doses utilisées n'avaient aucun effet létal. De plus les signes de toxicité observés étaient exceptionnels. La dose 300 mg/kg ne provoque aucune toxicité apparente, en effet les rattes de ce lot avaient le même comportement que les rattes témoins traitées par le sérum physiologique. Avec les doses supérieures 600, 800, 1000 mg/kg, des troubles dans le comportement général des rattes ont été observés durant la première heure, notamment une sédation interrompue de temps en temps par des contractures abdominaux, au-delà de cette durée l'animal se comporte normalement. Au 14^{ème} jour après l'injection de la substance à tester les rattes des différents lots ont montré une croissance pondérale comparable aux rattes du lot témoin.

2-2- Effet de la streptozotocine sur la glycémie et le poids corporel des rats :

Les figures 12 et 13, montrent la variation de la glycémie et l'évolution du poids corporel respectivement, des rats injectés par la STZ et le tampon citrate. L'effet diabétogénique de la STZ est clairement exhibé par une augmentation significative de la glycémie ($p < 0.001$) et une diminution significative du poids corporel ($p < 0.01$) chez les rats males et femelles 72 h après l'injection de la STZ.

A noter que ces deux paramètres ont été accompagnés par une polyphagie, une polydipsie, une polyurie et une glycosurie, symptômes caractéristiques du diabète sucré.

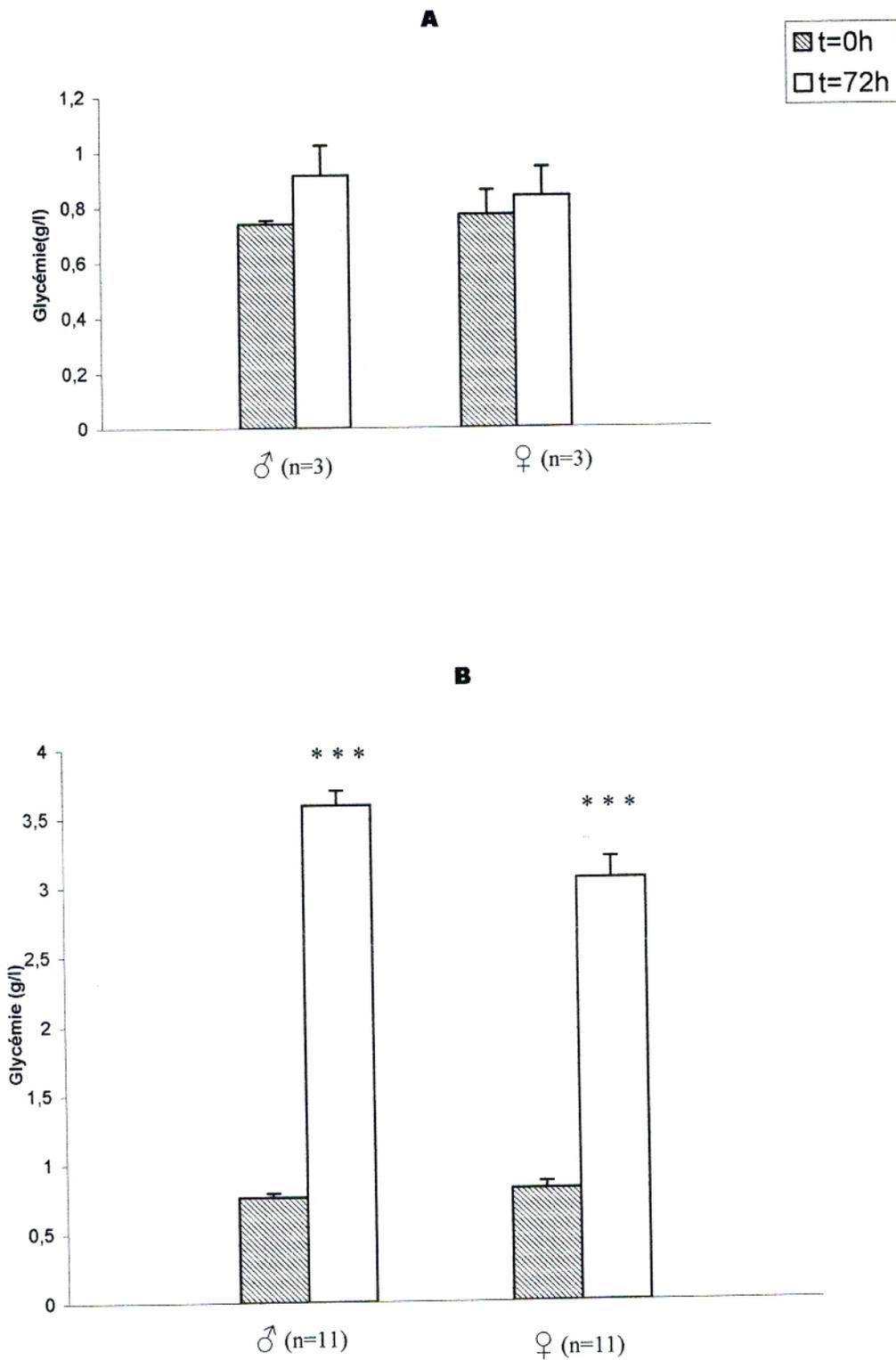


Figure 12: Effet de l'injection intrapéritonéale du tampon citrate (0.1M, pH=4.5), 5ml/kg, p.c (A) et de la STZ 60mg/kg, p.c (B) sur la glycémie à jeun des rats.
 *** (p<0.001) par rapport à t=0. Chaque colonne représente une moyenne ±ES.

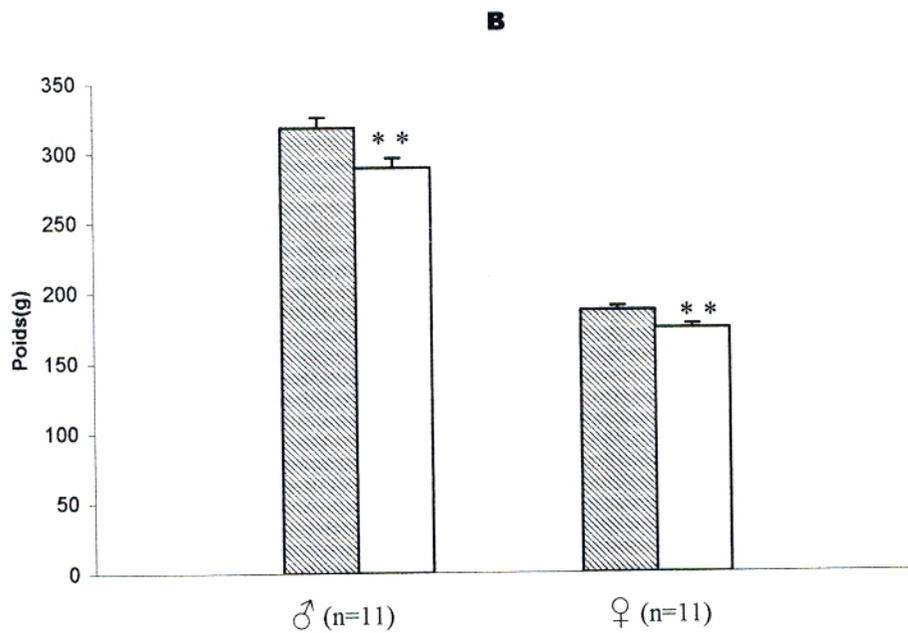
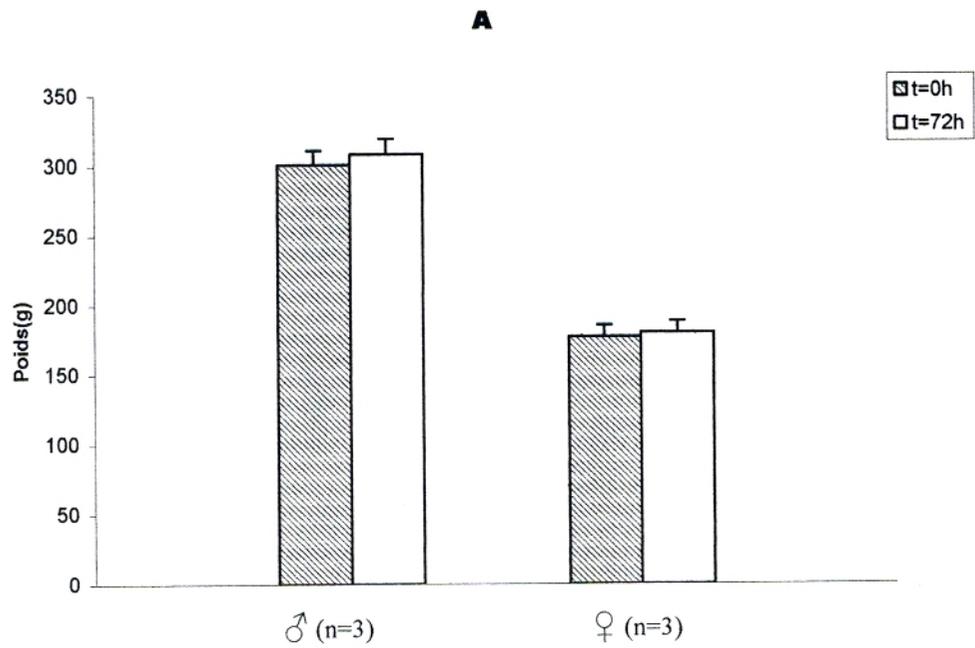


Figure 13: Effet de l'injection intrapéritonéale du tampon citrate (0.1M, pH=4.5), 5ml/kg ,p.c (A) et de la STZ 60mg/kg,p.c (B) sur le poids corporel des rats à jeun.

** ($p < 0.01$) par rapport à t=0. Chaque colonne représente une moyenne \pm ES.

2-3- Evolution de la glycémie chez des rats normaux et diabétiques en 480min :

Les figures 14 et 15 montrent l'effet de la globularine sur la glycémie à jeun des rats normaux et diabétiques respectivement comparés aux témoins. L'évolution de la glycémie a été suivie pendant 480min ; à 0(avant) et60, 120, 180, 240,360 et 480min après une injection unique des molécules à tester.

La glycémie des rats normaux et diabétiques traités par le sérum physiologique n'a pas varié significativement ($p>0.05$) durant les 8 heures de l'expérience.

Chez les rats normaux traités par la globularine, une diminution statistiquement significative de la glycémie a été observé à $t=120\text{min}$ ($p < 0.05$), avec un pourcentage de diminution de 10.4 %, cette effet ce maintient pendant 1h. Par ailleurs, les rats normaux traités par le glibenclamide, l'antidiabétique de référence, des diminutions de la glycémie sont observées à 120 min , à 180 min et à 240 min avec un pourcentage de diminutions de14.13%, 18.47% et 27.17% respectivement.

L'administration de la globularine aux rats diabétiques, a diminué la glycémie de 10 % à $t = 180\text{min}$ ($p < 0.05$), alors qu'aucun effet n'a été observé avec le glibenclamide.

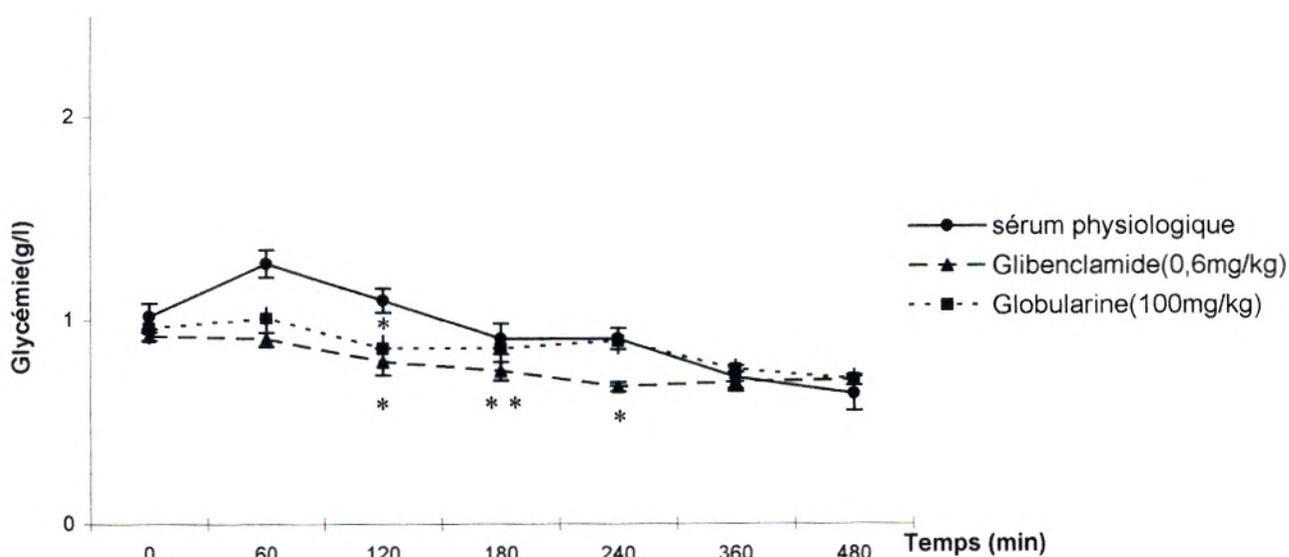


Figure 14: Effet de la globularine et du glibenclamide sur la glycémie à jeun chez des rats normaux après injection intra- péritonéale à $t=0\text{min}$.

* ($p<0.05$), ** ($p<0.01$), par rapport à $t=0$. Chaque valeur représente une moyenne \pm ES.

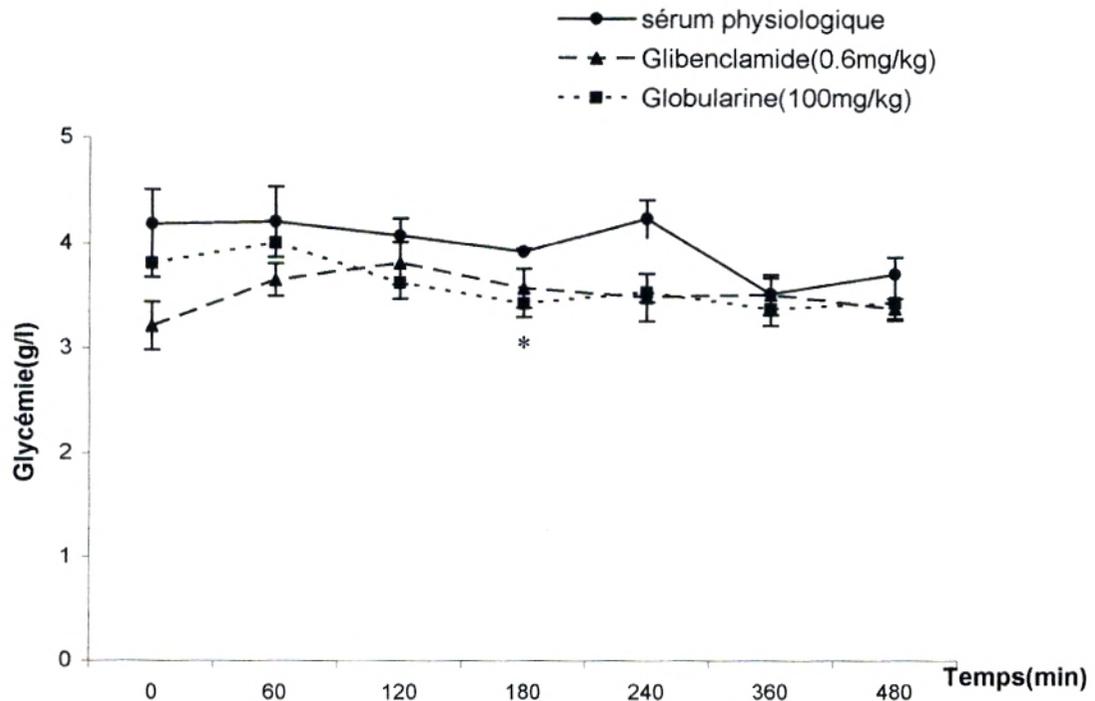


Figure 15 : Effet de la globularine et du glibenclamide sur la glycémie à jeun chez des rats diabétiques après injection intra- péritonéale à t=0min.

* (p<0. 05), ** (p<0. 01), par rapport à t=0. Chaque valeur représente une moyenne ±ES.

2-4- Test de tolérance au glucose chez des rats normaux :

La figure 16 montre les résultats du test de tolérance au glucose effectué chez des rats normaux. Après une charge en glucose, la glycémie des rats normaux traités par le sérum physiologique, atteint un maximum d'augmentation à 30 min, ensuite la glycémie diminue progressivement pour revenir à son taux initial à partir de 120 min. La glycémie des rats normaux traités par la globularine suit le même profil d'évolution que la glycémie des rats traités par la solution saline. Par contre, le glibenclamide montre un effet positif, en prévenant l'augmentation de la glycémie observée chez les rats témoins entre 30 et 60 min, en effet la glycémie des rats traités par le glibenclamide varie très peu après gavage du glucose jusqu'à 120 min.

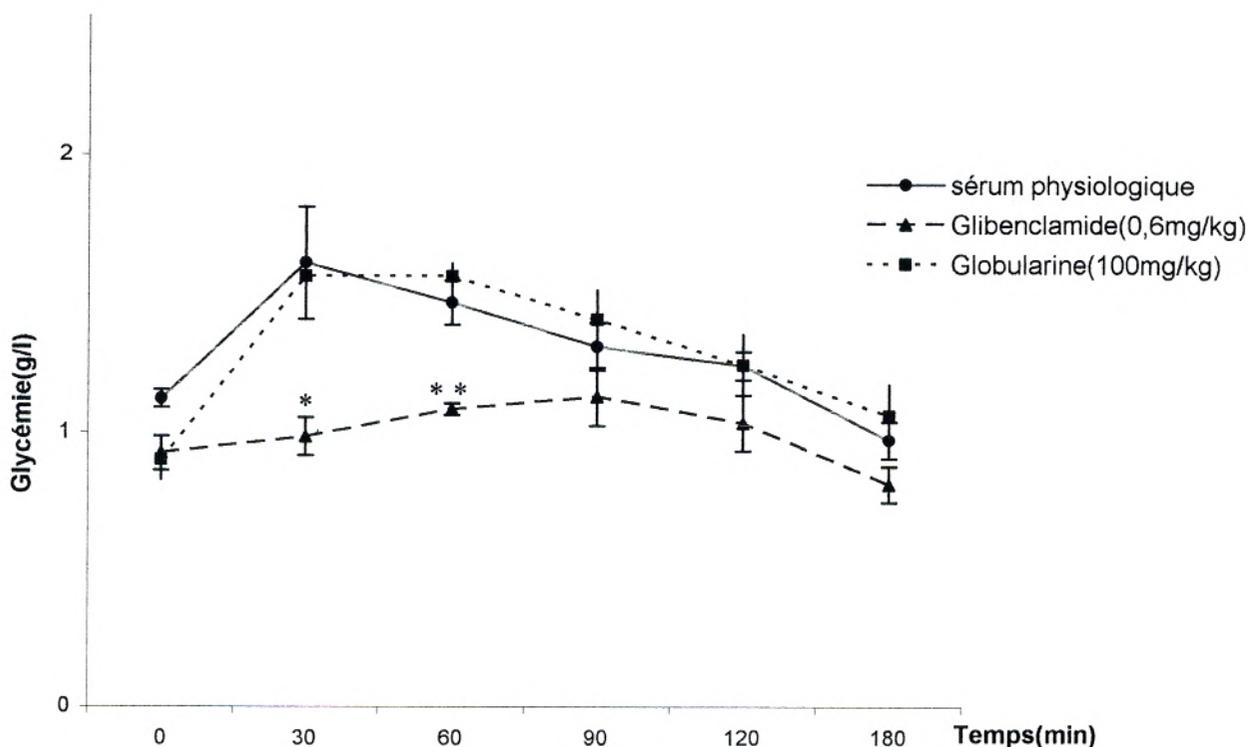


Figure 16 : Effet de la globularine et du glibenclamide sur la glycémie chez des rats normaux après une charge en glucose (2.5g/kg) à t=0min.

L'injection intra-péritonéale de la globularine et du glibenclamide a été réalisée 90 min avant le gavage du glucose.

* p<0. 05, ** p<0. 01, par rapport aux rats traités par le sérum physiologique. Chaque valeur représente une moyenne ±ES.

2-5- Evolution de la glycémie des rats diabétiques non à jeun (traitement sub-chronique):

La figure17 représente les résultats de l'évolution de la glycémie non à jeun chez des rats en 7 jours ; des rats diabétiques traités par le glibenclamide et par la globularine ont été comparés aux rats témoins non traités.

Durant 7 jours, l'hyperglycémie a été maintenue chez les rats diabétiques traités par le sérum physiologique, comparés aux rats normoglycémiques. L'administration de la globularine aux rats diabétiques deux fois par jour, n'a pas montré de réduction de glycémie.

L'administration du glibenclamide aux rats diabétiques deux fois par jour, a été également inefficace sur l'hyperglycémie. Néanmoins, des faibles diminutions ont été notées aux 2^{ème}, 6^{ème} et 7^{ème} jours (p < 0.01), sans aucune amélioration de l'état diabétiques ; les symptômes du diabète persiste.

6^{ème} et 7^{ème} jours ($p < 0.01$), sans aucune amélioration de l'état diabétiques ; les symptômes du diabète persiste.

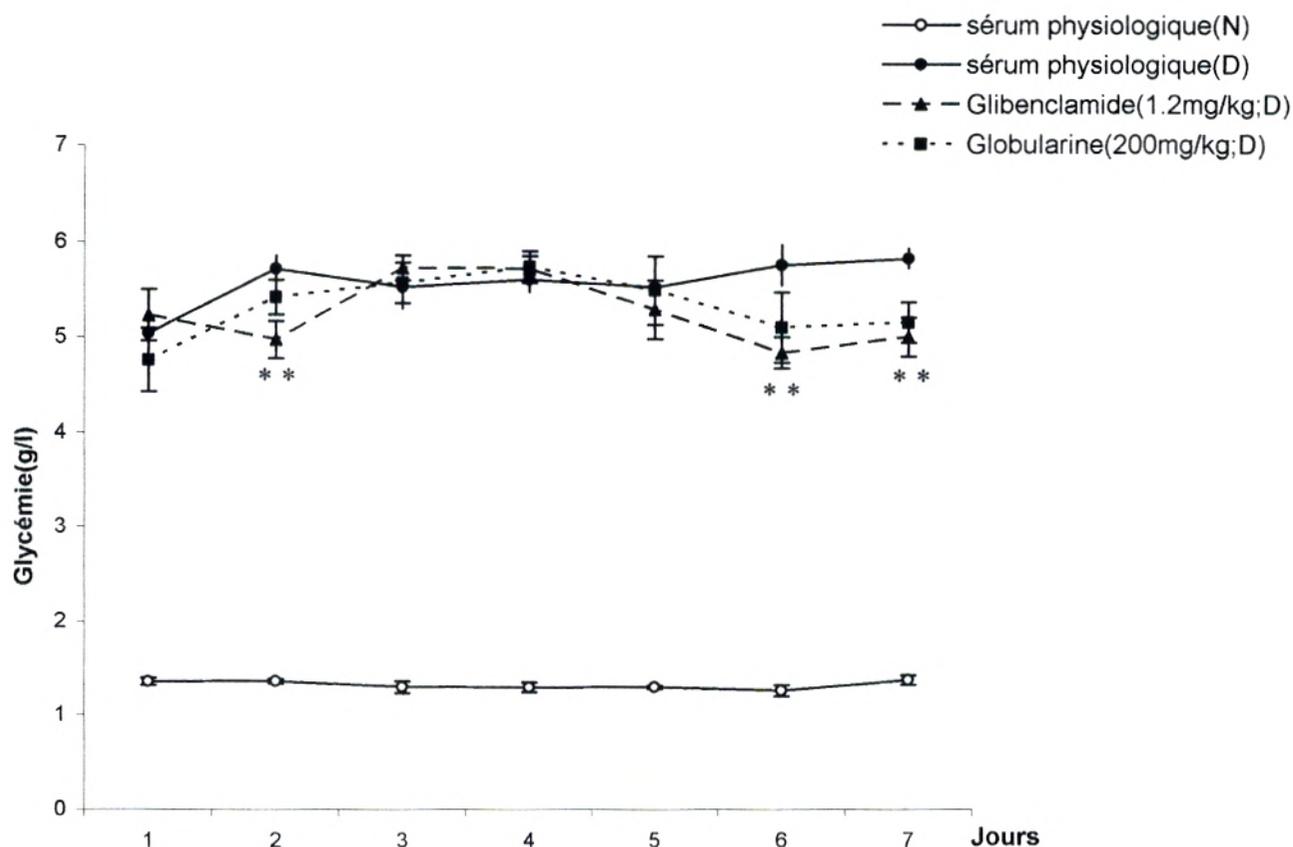


Figure 17 : Effet de la globularine et du glibenclamide sur la glycémie chez des rats diabétiques (D) traités pendant 7 jours.

L'injection intra-péritonéale de la globularine et du glibenclamide a été réalisée 2 fois par jours, la glycémie a été mesurée après la première injection.

** $p < 0.01$, par rapport aux rats traités par le sérum physiologique. Chaque valeur représente une moyenne \pm ES.

2-6- Evolution du poids corporel des rats et mesure de la quantité d'eau et d'aliment consommées en parallèle :

Aucune amélioration dans le poids corporel n'a été observée chez les rats diabétiques traités par la globularine ou le glibenclamides (inefficacité du traitement), de plus le profil d'évolution corporel de ces rats est identique à celui des rats diabétiques traités par le sérum physiologique (absence d'effet toxique), **Figure 18**.

La polyphagie (**Figure19**) et la polydipsie (**Figure 20**) sont deux symptômes caractéristiques du diabète Dans le cas de nos rats diabétiques la quantité d'aliment et d'eau

consommée a été très grande par rapport à celle consommée par les rats normaux. Autre part les rats diabétiques traités par la globularine ou le glibenclamide ont consommées la même quantité d'aliment et d'eau que les rats diabétiques control. .Ce ci affirme l'inefficacité du traitement et la no toxicité de la globularine et le glibenclamide (à la dose utilisée).

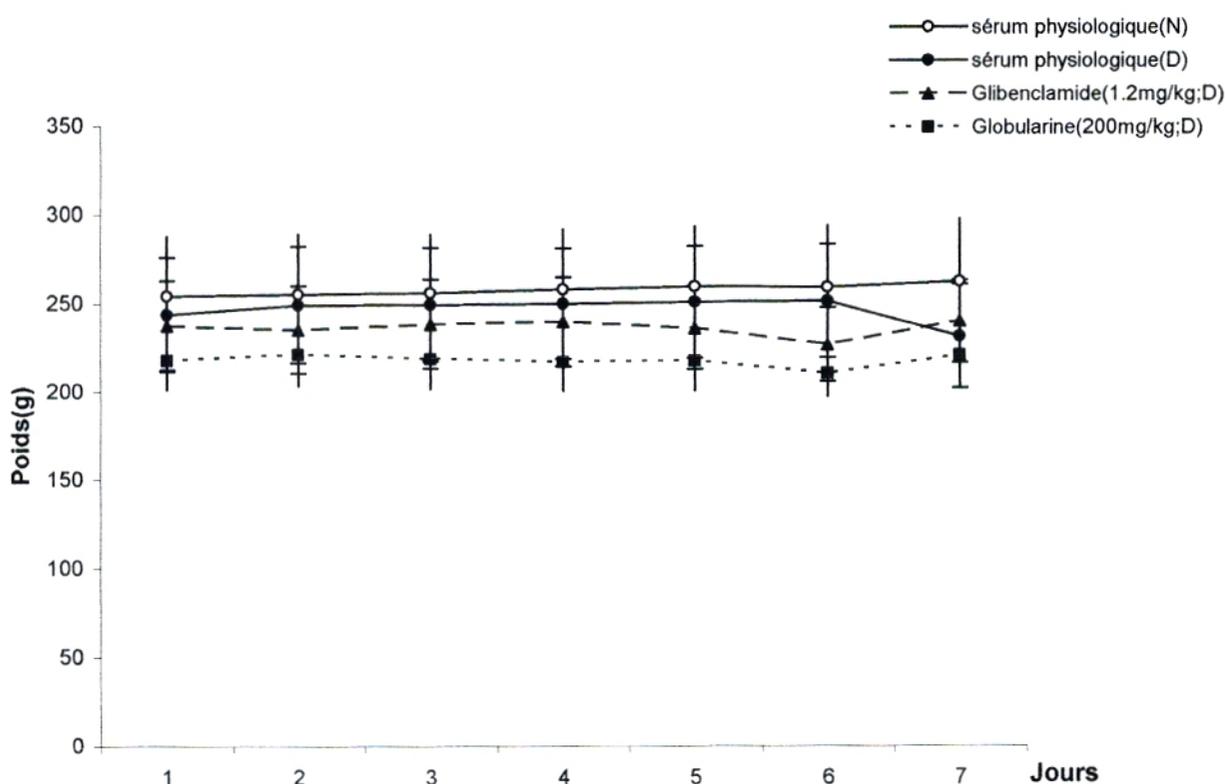


Figure 18 : Effet de la globularine et du glibenclamide sur le poids corporel chez des rats diabétiques (D) traités pendant 7 jours.

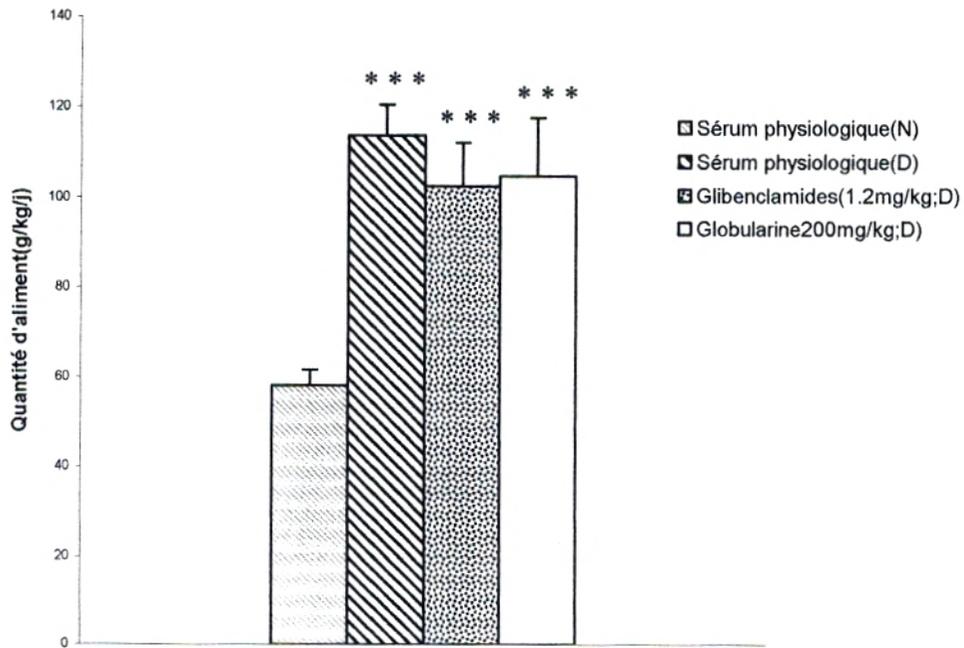


Figure 19 : Quantité d'aliment consommée par les rats durant les 7 jours de l'expérience.

*** $p < 0.001$ par rapport aux rats normaux. Chaque colonne représente une moyenne \pm ES.

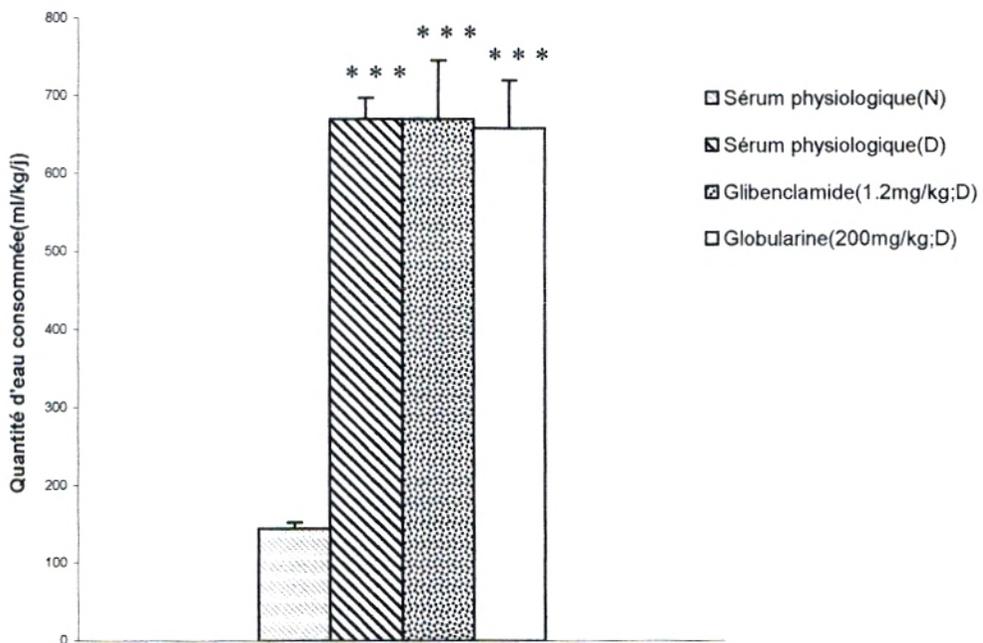


Figure 20 : Quantité d'eau consommée par les rats durant les 7 jours de l'expérience.

*** $p < 0.001$ par rapport aux rats normaux. Chaque colonne représente une moyenne \pm ES.

2-7- La glycémie à jeun et effet du traitement sur la triglycéridémie et la cholestérolémie :

Après 7 jours de traitement, aucune amélioration de la glycémie à jeun n'a été observée ; tous les rats diabétiques des différents lots traités ont une hyperglycémie maintenue. (**Figure21**).

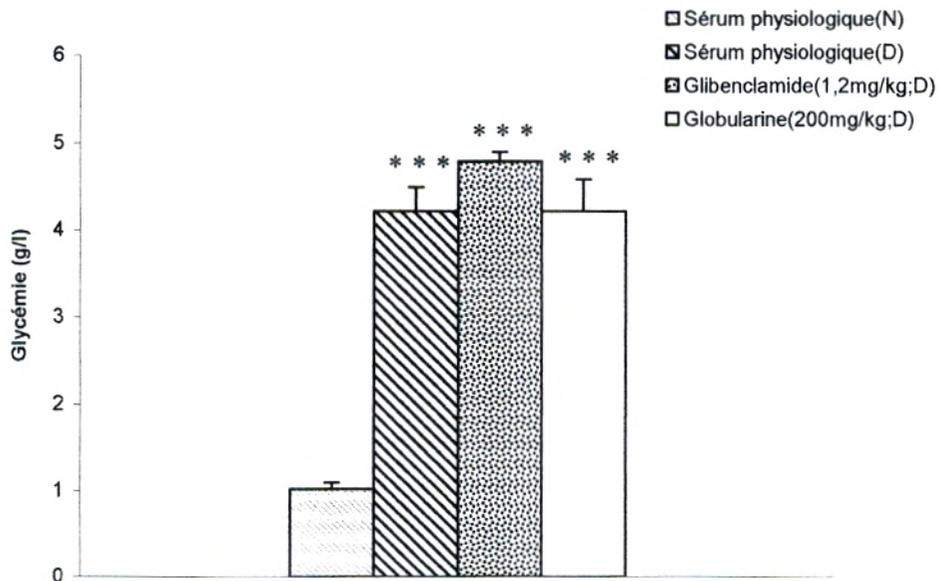


Figure 21: Glycémie à jeun des rats après 7 jours de traitement.

*** $p < 0.001$ par rapport aux rats normaux. Chaque colonne représente une moyenne \pm ES.

Le diabète sucré est associé à des troubles lipidiques caractéristiques : un taux des triglycérides élevé et un taux de cholestérol élevé. Ceux-ci sont clairement montrés dans le sérum de nos rats diabétiques comparés aux rats normaux non diabétiques (**Figure 22**).

Par ailleurs, les améliorations suivantes sont notées :

-Le taux des triglycérides des rats diabétiques traités par la globularine et traités par la glibenclamide a diminué d'une façon significative ; ($p < 0.01$) et ($p < 0.05$) respectivement.

-Le taux du cholestérol total, diminué remarquablement chez les rats diabétiques traités par la globularine ($p < 0.05$).

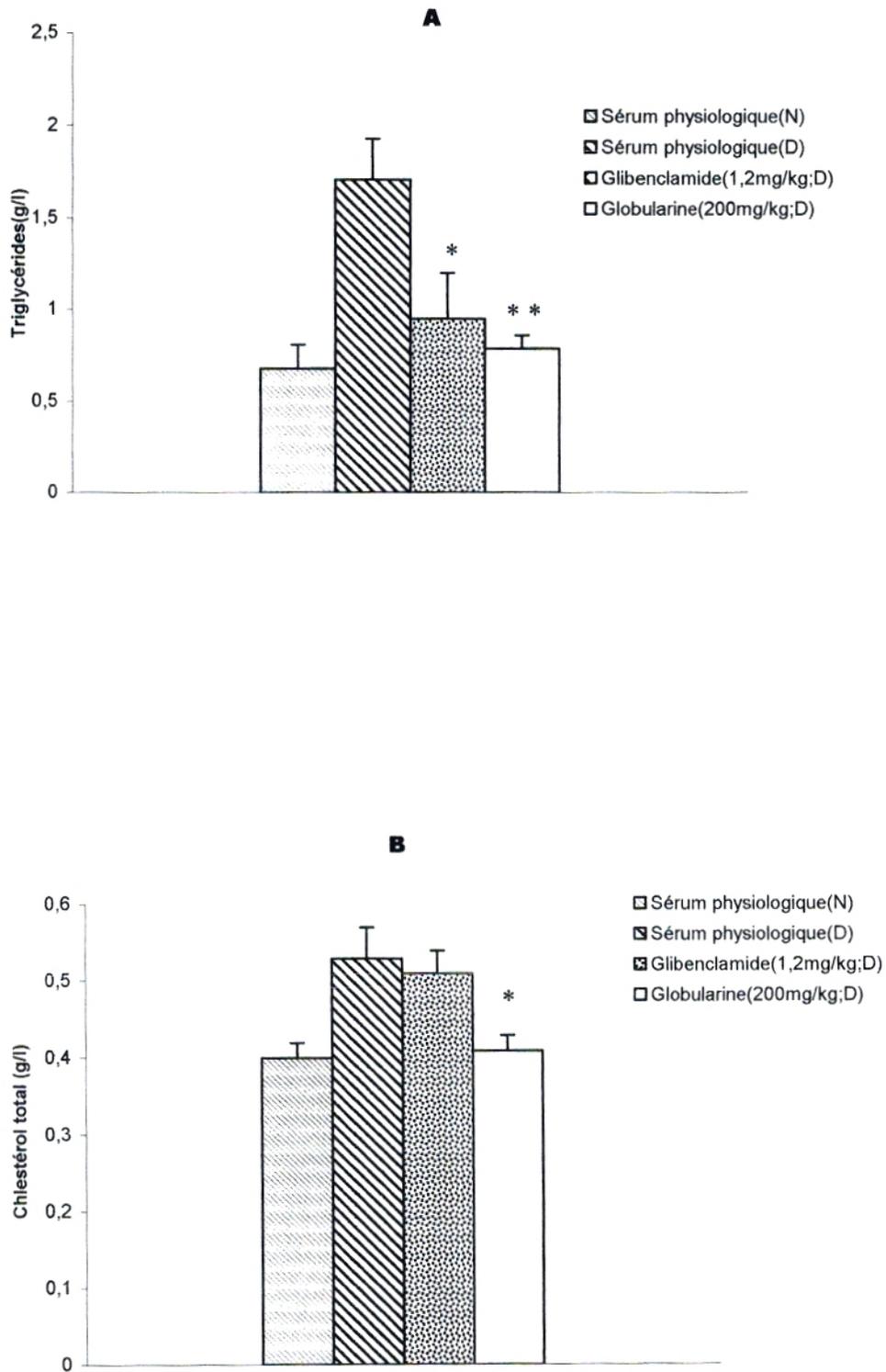


Figure 22 : Paramètres lipidiques dosés en fin de l'expérience ; Triglycérides (A) et cholestérol total (B).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, par rapport aux rats diabétique traité par le sérum physiologique.

Chaque colonne représente une moyenne \pm ES.

III. Discussion :

Globularia alypum L. plante de la région de la méditerranée, connue et utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement du diabète sucré et d'autres pathologies. L'étude de la composition chimique des feuilles de *G. alypum*, a révélé la richesse de cette plante en métabolites secondaires connus par des propriétés thérapeutiques intéressantes. *G. alypum* représente une source prometteuse pour de nouveaux médicaments d'origine végétale.

Le fractionnement de la phase d'acétate d'éthyle sur colonne ouverte de gel de silice a permis de purifier la globularine qui a été identifiée par méthodes chromatographiques et spectrales, ce composé considéré comme majoritaire des feuilles de *G. alypum*, a été isolé pour la première fois en 1966 par l'équipe de Maio, (Maio et Panizzi, 1966). Les feuilles de *G. alypum* contiennent d'autres iridoïdes glucosides, qui ont été identifiés à côté de la globularine : la globularimine, la globularinine (Chaudhuri et Sticher, 1979) la globularicisine, la globularidine (Chaudhuri et Sticher, 1981), le globularioside (Es-Safi et al., 2006).

L'identification des flavonoïdes aglycones a été impossible en absence de témoins. Par ailleurs d'autres auteurs ont réussi à isoler (Chromatographie sur couche épaisse) et à identifier (Examen des spectres UV/comparaison à des échantillons authentiques), six composés flavoniques à partir des feuilles de *G. alypum*, ces composés sont : La 4',7-dihydroxyflavone, l'apigénine-7-glucoside, le quercétol, le lutéoline-7-glucoside, la bayine et le rutoside (Ben Hassine et al., 1982.b). Une estimation du contenu en flavonoïdes a été également réalisée ; *G. Alypum* contient $4,54 \pm 0,09$ mg équivalent en rutine /g (Djeridane et al., 2006).

Aucune donnée de littérature n'a apporté des informations sur les saponosides de *G. alypum*. Selon la technique d'extraction utilisée, notre étude a permis d'estimer la quantité des saponosides [$3,42 \pm 0,48\%$ (g/g)] et d'étudier leur solubilité (Très soluble dans le méthanol).

Des études expérimentales réalisées in vivo ont confirmées la capacité de la plante à contrôler la glycémie des diabétiques. L'administration orale (ou intrapéritonéale) d'une infusion (0,7g/kg) de *G. alypum* à des rats normaux et diabétiques a été efficace ; la glycémie a remarquablement diminué, de plus cette diminution a été accompagnée d'un taux élevé de l'insuline, la comparaison des résultats obtenus avec les témoins utilisés a donné la suggestion que l'activité hypoglycémiant de la plante pourrait être attribuée à une stimulation de la sécrétion d'insuline au niveau des cellules β pancréatique et une augmentation du métabolisme

périphérique du glucose (Skim et al.,1999). Une autre étude portant toujours sur la même plante mais au lieu d'utiliser une infusion on utilise une décoction (20 mg/kg), dans cette expérience l'extrait n'a été efficace que chez les rats diabétiques, ce qui permet de constater que l'effet de la plante pourrait être extra-pancréatique (Jouad et al.,2002). La différence entre les deux expériences pourrait être la conséquence d'une différence dans la préparation de l'extrait et/ou dans la dose utilisée.

Le principal but de notre étude est de rechercher le(s) composé(s) responsable(s) de cette activité antidiabétique remarquable. La purification de la globularine, un iridoïde (famille des monoterpènes), à partir des feuilles de *G. alypum* a été fructueuse, le composé a été purifié et identifié ,de plus la plante est très riche en cet iridoïde, la globularine est considérée comme composé majoritaire (Chaudhuri et Sticher ,1981), on sait également que dans certains cas l'activité biologique d'une plante pourrait être due au composé majoritaire .A partir de la, l'hypothèse suivante à été émise : **l'activité antidiabétique de *G. alypum* pourrait être attribuée a son composé majoritaire, la globularine.**

Selon nos connaissances la seule activité pharmacologique étudiée sur la globularine est le pouvoir antioxydant qui a été trouvé modéré (El-Safi et al., 2007). En revanche les iridoïdes d'une manière générales ont montré différentes activités biologiques ; activité antidiabétique ,scropolosideD₂ et hapagoside B (Ahmed et al.,2003) ; activité antioxydante, blumeosides A et b (Cuendet et al.,2004) ;activité antistaphylococcale, ajugoside et scropoloside (Stavri et al.,2006) et activité anti-inflammatoires ,catalpol,verproside et catalposide (Kupeli et al ;2005). Notre expérience représente le **premier travail** qui tend à investiguer **l'activité antidiabétique** de la globularine.

La toxicité aigue de la globularine a été testée jusqu'à la dose de 1000 mg/kg chez des rattes. Même à cette dose élevée, la globularine n'a montré aucune toxicité notable. Cette étude a permis une évaluation préliminaire de la toxicité possible de la globularine en utilisant peu d'animaux à fin de connaître la dose la plus faible et qui montre les signes de toxicité les plus remarquables. Une fois cette dose est déterminée d'autre tests de la toxicité seront envisagés notamment la dose létale médiane. Dans notre cas cette dose serait supérieure à 1000mg/kg. De plus cette étude nous a permis de déterminer la dose thérapeutique susceptible d'être testée. Les seules études de toxicité que nous possédant comme référence ont été réalisées sur l'extrait aqueux de *G. alypum*, la plante est considérée non toxique (DL₅₀ > 500mg/kg), des doses élevées administrées aux rats, d'une façon aiguë (Jaouhari et al., 1999) et chroniques

durant 8 semaines (Skim et al.,1998) n'ont montré aucune toxicité ni mort des rats. Ce résultat bien qu'il ne concerne pas la globularine mais concerne *G.alypum*, nous permet de s'assurer (dans certaines limites), de nos résultats.

La streptozotocine est une glucosamine **nitrosurée** isolée pour la première fois à partir de *streptomyces achromognèse* (herr et al., 1967). La STZ est une molécule cytotoxique spécifique des cellules β -pancréatiques utilisée depuis longtemps pour l'induction du diabète expérimental chez l'animal. Nombreux sont les mécanismes de l'action diabétogénique de la streptozotocine proposés, alkylation de l'ADN (Murata et al., 1999 ;Bolzán et Bianchi 2002) , augmentation du taux des protéines O-glycosylées dans les cellules β -pancréatiques (Konrad et al.,2001). Toutes ces réactions mènent à la mort cellulaire .Les altérations métaboliques résultantes de l'action de la streptozotocine sont liées en premier lieu au déficit de l'insuline (destruction sélective des cellules β -pancréatiques),le degré et la sévérité du diabète dépend surtout de la dose injectée.

La dose utilisée dans notre expérience a été efficace pour créer un état diabétique caractérisé par une hyperglycémie de 3.59 ± 0.10 g/l (n=11) et de 3.06 ± 0.16 g/l (n=11), après 72h de l'injection de la SZT . Des expériences réalisées par la même dose ont montré les mêmes résultats ; l'injection de la STZ à 60 mg/kg par voie intra péritonéale à des rats provoque un diabète après 24 à48 heures de l'injection ,avec une glycémie de 4.40 ± 0.10 g/l(n=12) (Rossini et al.,1977), l'injection de la STZ à 55 et 65 mg/kg par voie intraveineuse à des rats provoque une hyperglycémie de 3.40 ± 0.79 g/l (n=6) et de 3.30 ± 0.37 g/l (n=8) respectivement après 24 heures de l'injection (Junod et al.,1969).A noter que des doses supérieures (100mg/kg) de la SZT, sont responsables d'un diabète sévère chez des rats, plus que 90% des cellules sont détruites,le seul traitement possible pour ces rats est l'insuline, ils meurent dans 2 à3 jours de l'injection en absence du traitement (Junod et al.,1969).

L'activité antidiabétique d'une substance dépend de ses propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques, les principales cibles thérapeutiques possibles pour le control de l'hyperglycémie sont ;

-La stimulation de la sécrétion de l'insuline au niveau des cellules β -pancréatiques. Cet effet pourrait être réalisé par les sulphonylurées, comme le glibenclamide et le tolbutamide.

-l'amélioration de la sensibilité des tissus à l'action de l'insuline ; les thiazolidines ont la capacité de stimuler le transport du glucose au niveau du muscle et le tissu adipeux.

-l'inhibition de la production hépatique du glucose, comme en présence du biguanide, la metformine

Dans notre étude nous avons choisit de travailler avec le glibenclamide. Le glibenclamide agit sur le pancréas et stimule la sécrétion de l'insuline, qui à son tour tend à diminuer l'hyperglycémie, par suppression de la production hépatique basale du glucose (diminution de la glycémie à jeûne) et amélioration de l'utilisation du glucose notamment par le muscle (diminution de la glycémie post-prandiale). L'activité antidiabétique du glibenclamide a été largement étudiée, plusieurs facteurs peuvent influencer l'efficacité de cet antidiabétique notamment l'hyperglycémie et la dose utilisée (Nguyen et al.,2002, Melander, 2004).

La glycémie à jeun est maintenue dans un intervalle trop étroit, en effet l'utilisation périphérique du glucose est compensée par la production hépatique du glucose, l'insuline est à son taux basale. L'administration du glibenclamide aux rats normaux à *jeun* stimule la sécrétion de l'insuline, hormone responsable de la diminution de la glycémie notée chez ces rats. Par contre la globularine n'a pas été efficace dans cette expérience, **ce la laisse à suggérer que la globularine n'a aucun effet sur le pancréas.**

Après une charge en glucose, la glycémie atteint un seuil maximal dans 30 à 60 min. La sécrétion de l'insuline ainsi déclenchée tente à diminuer cette hyperglycémie, notamment par stimulation de l'utilisation périphérique du glucose et inhibition de sa production hépatique. La glycémie revient à son taux initial dans 120 min, le traitement préalable des rats normaux par le glibenclamide, induit une sécrétion précoce d'insuline ce qui prévient l'hyperglycémie chez ces rats. La globularine également dans cette expérience n'a montré aucun effet hypoglycémiant, **ce qui laisse à suggérer que la globularine n'a encore pas d'effet sur le pancréas ou sur l'amélioration de l'effet de l'insuline sécrétée.**

L'inefficacité du glibenclamide chez nos rats diabétiques explique bien que dans notre cas, il s'agit bien d'un diabète sévère, résultant d'une destruction importante des cellules β -pancréatiques. Faire diminuer l'hyperglycémie chez ces rats, ne peut être vraiment réalisé qu'en présence de l'insuline ou d'une substance a activité insulino- mimétique. **L'absence de l'effet hypoglycémiant de la globularine chez les rats normaux, explique bien que cet iridoïde serait sans effet chez les rats diabétiques, même après administration quotidienne.**

Le diabète expérimental provoqué par la STZ, est accompagné par des anomalies lipidiques, en rapport avec le déficit en insuline, hormone importante dans la régulation du métabolisme des lipides. Ces anomalies comportent une hypertriglycémie et hypercholestérolémie. La diminution de l'hyperglycémie chez ces rats diabétiques, s'accompagne normalement par une correction de ces troubles lipidiques. Dans le cas contraire, l'apport de médicaments hypolipémiants (fibrate et statine) sera plus efficace sur cette hyperlipidémie. Un effet notable sur les paramètres lipidiques ; diminution des taux des triglycérides et du cholestérol, a été noté chez les rats diabétiques traités par la globularine en dehors de toute diminution de l'hyperglycémie, **ce résultat nous permet de suggérer que la globularine pourrait avoir un effet sur le métabolisme des lipides.**

CONCLUSION GENERALE

Plusieurs traitements ont été trouvés pour le diabète sucré, les antidiabétiques oraux et l'insuline sont les principaux représentants. La complexité de la maladie rend son contrôle difficile ; Les recherches sont accentuées pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la maladie et pour trouver d'autres cibles thérapeutiques et d'autres traitements plus efficaces. Le diabète reste toujours un sujet d'actualité.

Dans notre étude, nous avons travaillé avec une molécule pure et identifiée, extrêmement soluble dans l'eau, très peu toxique, et nous avons examiné pour la première fois son activité antidiabétique possible, dans une tentative de trouver une substance qui pourrait concurrencer le biguanide, la metformine, le seul antidiabétique utilisé d'origine végétale.

La globularine n'a montré aucun effet intéressant sur la glycémie, ce la pourrait être dû à des propriétés intrinsèques de la substance ou aux conditions dans lesquelles l'activité antidiabétique a été opérée, notamment le degré de l'hyperglycémie créée par la streptozotocine. Tester la globularine dans un model de diabète modéré, sera nécessaire pour confirmer ou non nos résultats.

L'effet sur le métabolisme lipidique de la globularine observé chez les rats traités confère à la molécule une activité biologique potentielle ; l'effet hypolipémiant, qui mérite d'être mieux explorer à l'avenir.

- Bruneton, J., **Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales**. 3^e éd Paris : Tec & Doc Lavoisier, 1999. 1120p
- Chaudhuri, R.K., Sticher, O., 1979. **Structure of two highly oxygenated iridoid glucosides from *Globularia alypum***, Tetrahedron Letters 54, 3149-3152.
- Chaudhuri, R.K., Sticher, O., 1981. **New iridoid glucosides and a lignan diglucoside from *Globularia alypum***, Helvetica Chimica Acta 64,3-15
- Conseil Canadien de Protection des Animaux. Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation, 1984. http://www.ccac.ca/fr/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GUIDES/ENGLISH/TOC_V2.HTM#top.
- Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O., Dyatmiko, W., 2004. **Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei***, Helvetica Chimica Acta 80,1144-1152.
- DeFronzo, R.A., 1999. **Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus**, Ann. Intern. Med. 131,281-303.
- Dewick, P.M., Secondary metabolism: the building blocks and construction mechanisms. In, **Medicinal Natural Products**. 2^e éd University of Nottingham: Paul M Dewick John & Sons, 2002, 520p.
- Diatewa, M., Samba, C.B., Coffi, T., Assah, H., Abena, A.A., 2004. **Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of diethyl ether fraction isolated from the aqueous extract of the leaves of *Cogniauxia podoleana* Baillon in normal and alloxan-induced diabetic rats**, J Ethnopharmacol 92,229-232.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006. **Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds**, Food Chemistry 97,654-660.
- Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., Idrissi Hassani, L.M., Badoc, A., Gmira, N., 2003. **Screening phytochimique d'une endémique ibéro-Marocaine, *Thymelaea lythroides***, Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 142,61-78.
- Edeoga, H.O., Okwu, D.E., Mbaebie, B.O., 2005. **Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants**, African Journal of Biotechnology 4,685-688.
- Ekoé, J.M., Zimmet, P., Williams, R., **The epidemiology of diabetes mellitus**: John Wiley & Sons, 2001. 454p.
- Elte, J.W.F., Blicklé, J.F., 2007. **Thiazolidinediones for the treatment of type 2 diabetes**, European Journal of Internal Medicine 18,18-25.
- Emilien, G., Maloteaux, J.M., Ponchon, M., 1999. **Pharmacological management of diabetes: Recent progress and future perspective in daily drug treatment**, Pharmacological. Ther. 81, 37-51.
- Es-Safi, N.E., Kollmanna, A., Khlifi, S., Ducrota, P.H., 2007. **Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L structure-activity relationship**, L.W.T. 40 1246-1252.

Es-Safi, N.E., Khelifi, S., Kollmann, A., Kerhoas, L., El Abbouyi, A., Ducrot, P.H., 2006. **Iridoid glucosides from the aerial parts of *Globularia alypum* L. (Globulariaceae)**. Chem.Pharm.Bull. 54,85-88.

Froguel, R.P., Velho, G., 1999. **Molecular genetics of maturity-onset diabetes of the young**, TEM 10,142-146.

Fujimoto, W.Y., 2000. **The importance of insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus**, Am J Med 108, 9S-14S.

Gombos, Z., Wachowicz, J., Veijola, R., Åkerblom, H.K., Simell, O., et al., 2006. **Human leukocyte antigen non-class II determinants for type 1 diabetes in Finnish population**, Hum Immunol 67,714-721.

Guignard, J.L., Cosson, L., Henry, M., **Abrégé de phytochimie**, . Masson. 1985.224p

Guillausseau, P.-J., Michelin, M.L., 2003. **Physiopathologie du diabète de type 2**, La revue de médecine interne 24,730-737.

Harbone, J.B., **Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis**. 3^e éd: Chapman & Hall. 1998.303p

Harrigan, R.A., Nathan, M.S., Beattie, P., 2001. **Oral agents for treatment of type 2 diabetes mellitus: pharmacology, toxicity, and treatment**, Ann Emerg Med 38,68-78.

Hennen, G., **Biochimie Humaine : Introduction biochimique à la médecine interne**, :DE BOECK, 1996.784.

Herr, R.R., Jahnke, H.K., Argoudelis, A.D., 1967. **Structure of streptozotocin**, J.Am.Chem.Soc. 89,4808-4809.

Humbel, R.L., Gilson, G., 1999. **Les marqueurs immunologiques du diabète Insulinodépendant I**, Immunoanal.Biol.Spéc. 14,159-165. J.M.Chem.Soc. 89, 4808-4809.

Hyttinen, V., Kaprio, J., Kinnunen, L., Koskenvuo, M., Tuomilehto, J., 2003. **Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs**, Diabetes 52,1052-1055.

Jouad, H., Haloui, M., Rhiouani, H., El Hilaly, J., Eddouks, M., 2001. **Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane)**, Journal of Ethnopharmacology 77, 175-182

Jaouhari, J.T., Lazrek, H.B., Jana, M., 1999. **Etude de la toxicité aiguë de dix plantes marocaines réputées hypoglycémiantes**, Thérapie 54,701-706.

Jorge, A.P., Horst, H., De Sousa, E., Pizzolatti, M.G., Regina, F., Silva, M.B., 2004. **Insulinomimetic effects of Kaempferitrin on glycaemia and on ¹⁴C-glucose uptake in rat soleus muscle**, Chemico-Biological Interactions 149,89-96.

Josse, R.G. 1995. **Acarbose for the treatment of type II diabetes : the results of a Canadian multi-centre trial**, Diabetes Res Clin Pract 28, S167-S172.

Jouad, H., Haloui, M., Rhiouani, H., El Hilaly, J., Eddouks, M., 2001. **Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez–Boulemane)**, J Ethnopharmacol 77,175–182

Jouad, H., Maghrani, M., Eddouks, M., 2002. **Hypoglycaemic effect of *Rubus fruticosus* L. And *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats**, J Ethnopharmacol 81,351-356.

Junod, A., Lambert, A.E., Stauffacher, W., Renold, A.E., 1969. **Diabetogenic action of streptozotocin :Relationship of dose to metabolic response** , J Clin Invest 48,2129-2139.

Kahn, S.E., 2001. **The importance of β -cell failure in the development and progression of type 2 diabetes**, The Journal of clinical endocrinology & Metabolism 86,4047-4058.

Karumi, Y., Onyeyili, P.A., Ogugbuaja, V.O., 2004. **Identification of active principles of *M.balsamina* (Balsam apple) leaf extract**, J.Med.Sci.4,179-182.

Kelley, D.E., Rely, J.P., Veneman, T., Mandarino, L.J., 1990. **Effects of insulin on skeletal muscle glucose storage, oxidation, and glycolysis in human**, The American Physiological Society E923-E929.

Konrad, R.J., Mikolaenko, I., Tolar, J.F., Liu, K., Kudlow, J.E., 2001. **The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic β -cell O-GlcNAc-selective N-acetyl- β -D-glucosaminidase**, Biochem.J.356, 31-41.

Koski, R.R., 2006. **Practical review of antihyperglycemic agents for type 2 diabetes mellitus**, The Diabetes Educator 32,869-876.

Kovacs, P., 2005. **Fatty acid and insulin resistance in muscle and liver**, Best Practice & Research clinical Endocrinology & Metabolism 19,625-635.

Kupeli, E., Harput, U.S., Varel, M., Yesilada, E., Saracoglu, I., 2005. **Bioassay-guided isolation of iridoid glucosides with antinociceptive and anti-inflammatory activities from *Veronica anagallis-aquatica* L.**, J Ethnopharmacol 102,170-176.

Kuzuya, T., Nakagawa, S., Satoh, J., Kanazawa, Y., Iwamoto, Y., Kobayashi, M., et al., 2002. **Report of the Committee on the Classification and Diagnostic Criteria of Diabetes Mellitus**, Diabetes Res Clin Pract 55,65-85.

Lostanlen, D.P., Narbonne, H., Hernandez, J.B., Staccini, P., Saunieres, A., 2000. **Mitochondrial DNA variations in Patients with maternally inherited diabetes and deafness syndrome**, Biochemical and Biophysical Research Communications 277,771-775.

Maio, G.D., panizzi, L., 1966. **Struttura della globularina**, La Ricerca Scientifica 36,845-850.

Malec, L.S., Pomilio, A.B., 2003. **Herbivory effects on the chemical constituents of *Bromus pictus***, Molecular Medicinal Chemistry 1, 30-38.

Marles, R.J., Norman, R.F., Plants as source of antidiabetic agents. **In, Economic and medicinal plants research. London: H. Wagner and N.R. Farwoth, 1994.**

Melander, A., **2004. Kinetics-Effect Relations of Insulin-Releasing Drugs in Patients With Type 2 Diabetes**, DIABETES 53, S151-S155.

Mojab, F., Kamalinejab, M., Ghaderi, N., Vahidipour, H. R., **2003. Phytochemical screening of some species of Iranian plants**, Iranian Journal of Pharmaceutical Research 77-82.

Motta, M., Bennati, E., Ferlito, L., Passamonte, M., Malaguarnera, M., **2006. Value and significance of new diagnostic criteria of diabetes mellitus in older people**, Arch. Gerontol. Geriatr 1.632 N° of Pages 6.

Murata, M., Takahashi, A., Saito, I., Kawanishi, S.K., **1999. Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin**, Biochem Pharmacol 57,881-887.

Muruganandan, S., Srinivasan, K., Gupta, S., Gupta, P.K., Lal, J., **2005. Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats**, J Ethnopharmacol 97, 497-501.

Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., **2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002**, J. Nat. Prod. 66, 1022-1037.

Nguyen, Q.A., Antoine, M.H., Oudraogo, R., Hermann, M., Sergooris, J., et al., **2002. In vitro and in vivo effects of new insulin releasing agents** Biochem Pharmacol 63,515-521.

Nourparvar, A., Bulotta, A., Di.Mario, U., Perfetti, R., **2004. Novel strategies for the pharmacological management of type 2 diabetes**, Trends Pharmacol Sci 25, 86-91.

Oloyede, O.I., **2005. Chemical Profile of Unripe Pulp of Carica papaya**, Pakistan journal of nutrition 4,379-381.

Ong, K.C., Khoo, H.E., **2000. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats**, Life Sci 67, 1695-1705.

Orban, J.-C., Ghaddab, A., Chatti, O., Ichai, C., **2006. Metformin-associated lactic acidosis**, Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation 25,1046-1052.

Pari, L., satheesh, M.A., **2006. Effect of pterostilbene on hepatic key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin- and nicotinamide-induced diabetic rats**, Life Sci 79,641-645.

Peters, A.L., Schriger, D.L., **1998. The new diagnostic criteria for diabetes: The impact on management of diabetes and macrovascular risk factors**, Am J Med 105,15S-19S.

Pinkas, M., Trotin, F., Bézanger-Beauquesne, L., **Les saponosides**, Produits et Problèmes Pharmaceutiques 187-198.

Porzio, O., Marlier, L.N.J.L., Federici, M., Hribal, M.L., Magnaterra, R., et al., **1999. GLUT2 and glucokinase expression is coordinately regulated by sulfonylurea**, Mol Cell Endocrinol 153,155-161.

Roden, M., Price, T.B., Perseghin, G., Petersen, K.F., Rothman, D.L., et al., **1996. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans**, J Clin Invest 97,2859-2865.

- Rossini, A.A., Like, A.A., Chick, W.L., Appel, M.C., 1977. **Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes**, Cell Biology 74, 2485-2489.
- Schmidt, K.D., Valeri, C., Leslie, R.D.G., 2005. **Autoantibodies in type 1 diabetes**, Clinica Chimica Acta 354,35-40.
- Serrano-Rios, M., Gutierrez-Lopez, M.D., Pérez-Bravo, F., Martinez, M.T., Antona, J., et al., 1996. **HLA-DR,DQ and anti-GAD antibodies in first degree relatives of type 1 diabetes mellitus**, Diabetes Res Clin Pract34,S133-S139.
- Shimizu, K., Ozeki, M., Iino, A., Nakajyo, S., Urakawa, N., et al., 2001. **Structure-activity relationships of triterpenoid derivatives extracted from *Gymnema inodorum* leaves on glucose absorption**, Jpn.J.pharmacol. 86,223-229.
- Shulman G.I., 2000. **Cellular mechanisms of insulin resistance**, J Clin Invest 106,171-176.
- Shulman, G.I., Rothman, D.L., Shulman, R.G., 1990. **¹³ C NMR studies of glucose disposal in normal and non-insulin-dependent diabetic humans**, Phil.Trans.R.Soc.Lond.333,525-529.
- Singa, A.N.B., El-Beshbishy, H.A., Yonekawa, M., Nomura, T., Fukai, T., 2005. **Hypoglycemic effects of Egyptian *Morus alba* root bark extract: effect on diabetes and lipid peroxidation of streptozotocin- induced diabetics rats**, J Ethnopharmacol 100,333-338.
- Skim, F., Kaaya, A., Jaouhari, J.T., Lazrek, H.B., Jana, M., El Amri, H., 1999. **Hypoglycaemic activity of *Globularia alypum* leaves in rats**, Fitoterapia 70,382-389.
- Skim, F., Lazrek, B.H., El Amri, H., Kaaya, A., Jana, M., 1998. **Toxicological studies on *Globularia alypum* and *Zygophyllum gaetulum* in rats**, Phytother Res12,592-594.
- Stavri, M., Mathew, K.T., Gibbons, S., 2006. **Antimicrobial constituents of *Scrophularia deserti***, Phytochemistry 67,1530-1533.
- Stech, A.k., Bugawan, T.L., Valdes, A., Emery, L.M., et al., 2005. **Association of non-HLA genes with type 1 diabetes autoimmunity**, Diabetes 54,2482-2486.
- Stumvoll, M., Nurjhan, N., Perriello, G., Dailey, G., Gerich, J.E., 1995. **Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus**, N Engl J Med333,550-554.
- Tiikkainen, M., Häkkinen, A.M., Korshennikova, E., Nyman, T., Mäkimattila, S., et al., 2004. **Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes**, Diabetes 53,2169-2176.
- Tisch, R., 1996. **Le diabète sucré insulino-dépendant : une maladie auto-immune à laquelle participent des cellules T**, Annales de L'Institut Pasteur /actualités 7,73-80.
- Tusié Luna, M.T., 2005. **Genes and type 2 diabetes mellitus**, Arch Med Res36,210-222.
- Verge, C. F., Stenger, D., Bonifacio, E., Colman, P.G., Pilcher, C., Bingley, P.J., Eisenbarth, G.S., 1998. **Combined Use of autoantibodies (IA-2 autoantibody, GAD autoantibody, Insulin autoantibody, Cytoplasmic islet cell antibodies) in type 1 diabetes**, Diabetes 47,1857-1866.

Verpoorte,R., Secondary metabolism. **In, Metabolic engineering of plant secondary metabolism** : Springer,2000.300p.

Vessal, M., Hemmati, M., Vasei, M.,2003. **Antidiabetic effects of quercetin in streptozotocin-induced diabetic rats**, Comp Biochem Physiol C 135,357-364.

Vicent, D., Garcia-Martinez, J.A., Peñacarrillo, M.L.V., Valverde, I., Malaisse, W.J., 1995. **Stimulation of insulin secretion and potentiation of glibenclamide-induced insulin release by the dimethyl ester of glutamic acid in anaesthetized rats** , Diabetes Res Clin Pract27,27-30.

Virally, M., Blicklé, J.-F., Gerald, J., Halimi, S., Simon, D., Guillausseau, P.-J.,2007. **Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives**, Diabetes Metab33,231-244.

Vulksan, V., Sievenpiper, J.L.,2005. **Herbal remedies in the management of diabetes: Lessons learned from the study of ginseng**, Nutrition ,Metabolism & Cardiovascular Diseases 15,149-160.

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H., 2004. **Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030**.Diabète Care 27,1047-1053.

Witters, L.A.,2001. **The blooming of the French lilac**. J Clin Invet108,1105-1107.

Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M., benjelloun, W., 1997. **Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco**, J Ethnopharmacol 58,45-54.

ANNEXE A

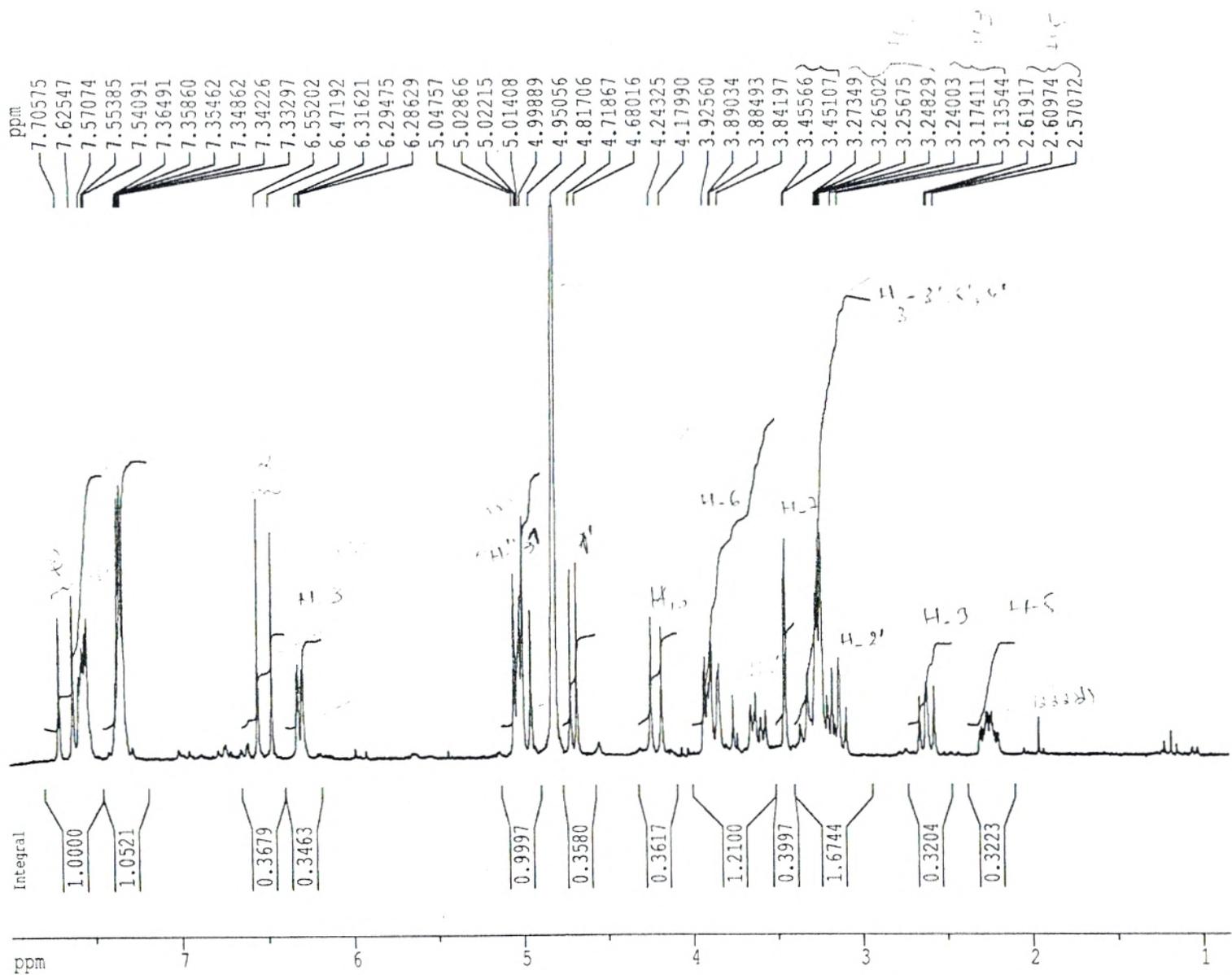
Tableau 6: Données expérimentales et théoriques du ^1H , du Cosy pour la globularine.

N° du proton	δ théorique (ppm)	δ expérimentale (ppm)	COSY Corrélation $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$	Constantes de couplage J(Hz)
H-5	2.29	2.29	H-9, 6,4	7.7 ; 7.9 ; 4.4
H-3',4',5'	3.20	3.27		
H-2'	3.17	3.24	H-1' ; 3'	7.7 ; 8.8
H-6	3.50	3.92	H-5 ; 7	7.9 ; 1.2
H-7	3.50	3.45	H-6	1.2
H-9	2.66	2.66	H-5,1	7.7 ; 9.8
H-1'	4.99	4.95	H-2'	7.7
H-6'a, H-6'b	3.92 ; 3.65	3.89		
H-10a	4.29	4.17	H-10b	-12.7
H-10b	5.09	4.24	H-10a	-12.7
H-4	5.07	5.04	H-5,3	4.4 ; 6.0
H-3	6.35	6.31	H-4,5	6.0 ; 1.9
H- α	6.57	6.55	H- β	16.0
H- β	7.72	7.70	H- α	16
H-2'',4'',3''	7.50	7.35		

Tableau 7: Données expérimentales et théoriques du ^{13}C , du DEPT et du spectre 2D, HMBC pour la globularine.

N° du C	DEPT	δ théorique (ppm)	δ expérimentale (ppm)	HMBC corrélations $^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$
Co	Cq	168.39	166.89	
C β	CH	146.68	145.16	
C3	CH	141.75	140.32	
C1''	Cq	135.72	134.21	H-3
C4''	CH	131.49	130.06	
C2'',C6''	CH,CH	129.96	128.50	
C3'',C5''	CH,CH	129.28	127.87	H- β
C α	CH	118.67	117.11	
C-4	CH	103.82	102.20	
C-1'	CH	100.43	98.76	
C-1	CH	95.74	94.07	H-1';9
C-6	CH	79.48	77.95	H-7;9
C-5'	CH	78.34	76.95	H-4';3';2'
C-3'	CH	77.88	76.30	
C-2'	CH	74.83	73.28	
C-4'	CH	71.48	69.95	H-3';5';2'
C-10	CH ₂	64.28	63.01	H-9
C-8	Cq	63.64	62.02	H-10;9
C-7	CH	63.01	61.51	
C-6'	CH ₂	62.83	61.28	
C-9	CH	43.74	42.07	H-1 ; 1' ; 4 ; 10 ; 6
C-5	CH	39.04	37.51	H-3 ; 7

1H/MS 3-5/CD3OD



Current Data Parameters
 NAME SE06-GRIGNON
 EXPNO 1
 PROCNO 1

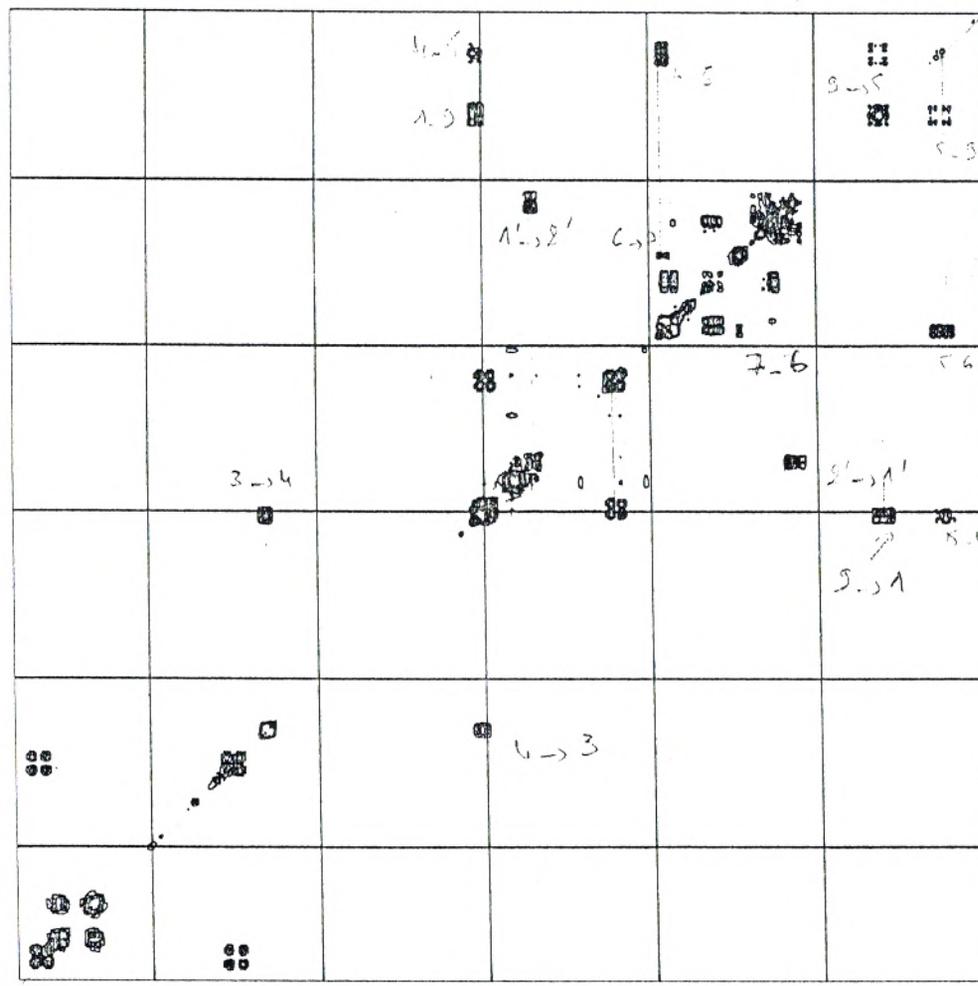
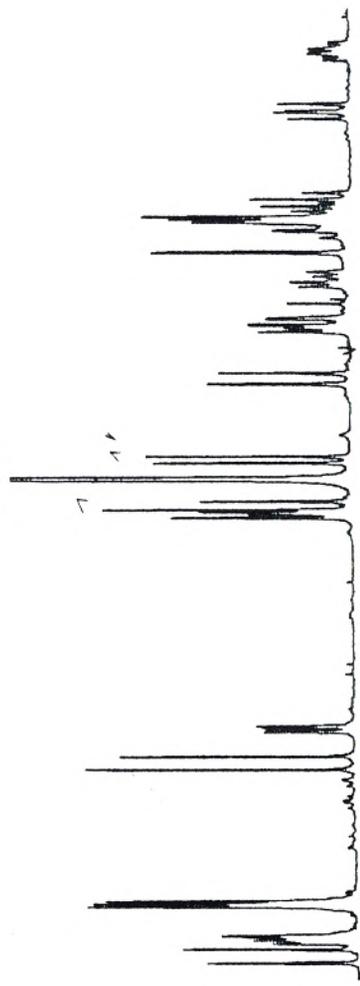
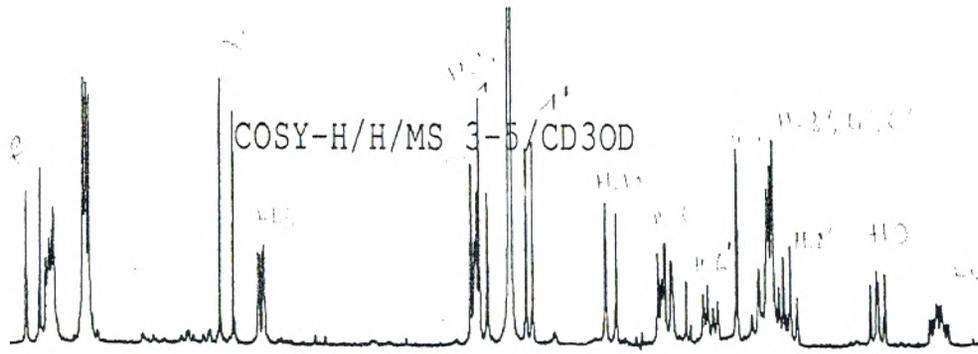
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20000906
 Time 14.34
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Multinu
 PULPROG zg
 TD 32768
 SOLVENT MeOH
 NS 10
 DS 0
 SWH 1436.782 Hz
 FIDRES 0.043847 Hz
 AQ 11.4033136 sec
 RG 104
 DW 348.000 usec
 DE 4.50 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 sec

----- CHANNEL f1 -----
 NUC1 1H
 P1 7.70 usec
 PL1 -6.00 dB
 SFO1 200.1609021 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 16384
 SF 200.1600171 MHz
 WDW no
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 0.50

1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 F1P 8.000 ppm
 F1 1601.28 Hz
 F2P 0.843 ppm
 F2 168.81 Hz
 PPMCM 0.35783 ppm/cm
 HZCM 71.62326 Hz/cm

ANNEXE B



ppm 7 6 5 4 3

3
4
5
6
7
ppm

Current Data Parameters
 NAME SE06-GRIGNON
 EXPNO 5
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20000906
 Time 15.46
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Multinu
 PULPROG cosy90
 TD 1024
 SOLVENT MeOH
 NS 8
 DS 16
 SWH 1436.782 Hz
 FIDRES 1.403107 Hz
 AQ 0.3564020 sec
 RG 512
 DW 348.000 usec
 DE 4.50 usec
 TE 300.0 K
 DO 0.00000300 sec
 D1 1.50000000 sec
 INO 0.00069600 sec

----- CHANNEL f1 -----
 NUC1 1H
 P1 7.70 usec
 PL1 -6.00 dB
 SFO1 200.1609021 MHz

F1 - Acquisition parameters
 NDO 1
 TD 171
 SFO1 200.1609 MHz
 FIDRES 8.402231 Hz
 SW 7.178 ppm

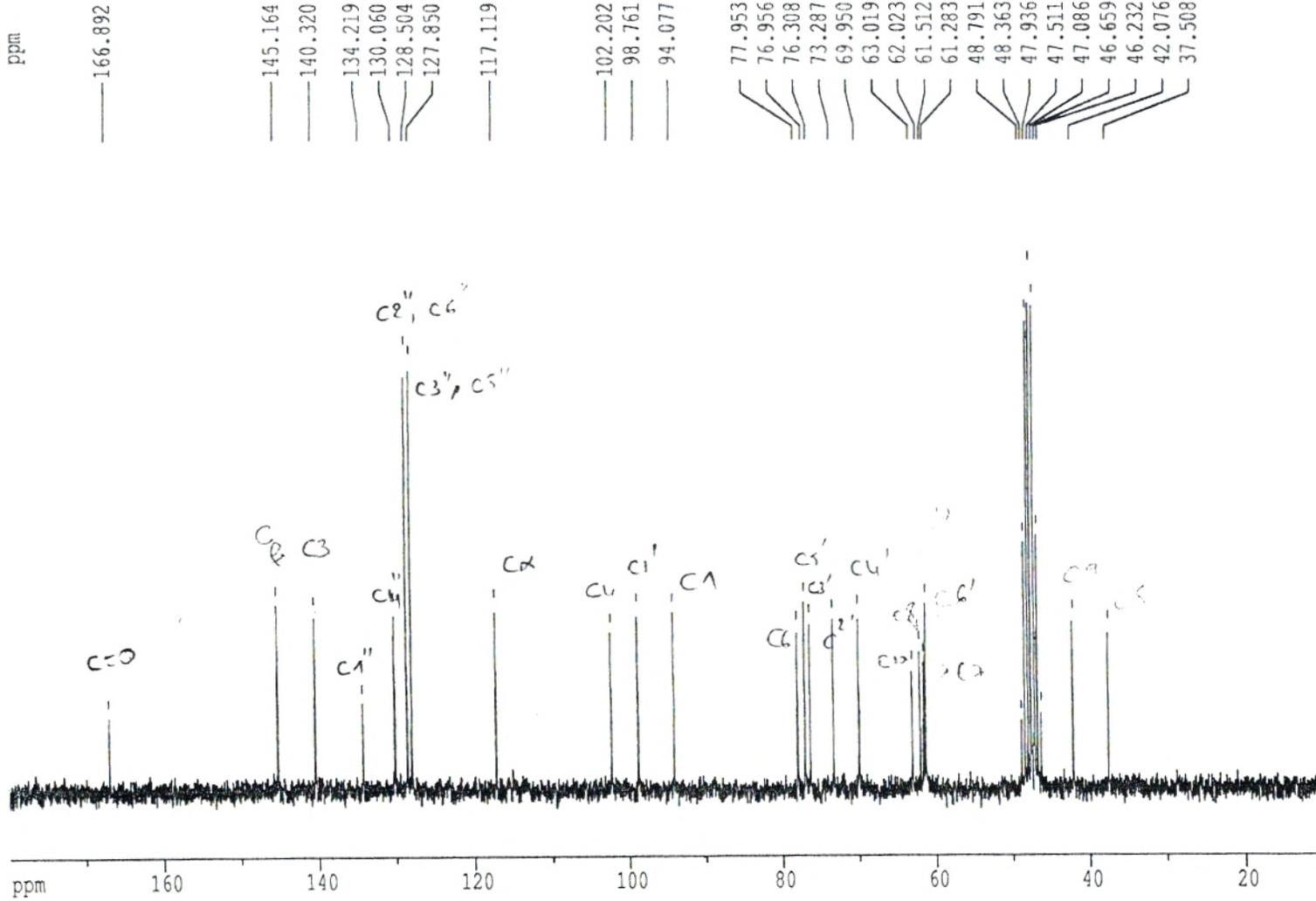
F2 - Processing parameters
 SI 1024
 SF 200.1600171 MHz
 MDW SINE
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 0.50

F1 - Processing parameters
 SI 1024
 MC2 QF
 SF 200.1600171 MHz
 MDW SINE
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0

2D NMR plot parameters
 CX2 13.00 cm
 CX1 13.00 cm
 F2PLO 7.807 ppm
 F2LO 1562.73 Hz
 F2PHI 1.996 ppm
 F2HI 399.56 Hz
 F1PLO 7.807 ppm
 F1LO 1562.73 Hz
 F1PHI 1.996 ppm
 F1HI 399.56 Hz
 F2PPMCM 0.44702 ppm/cm
 F2HZCM 89.47506 Hz/cm
 F1PPMCM 0.44702 ppm/cm
 F1HZCM 89.47506 Hz/cm

ANNEXE C

13C/MS 3-5/CD3OD



Current Data Parameters
 NAME SE06-GRIGNON
 EXPNO 2
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20000906
 Time 14.45
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Multinu
 PULPROG zgpg
 ID 32768
 SOLVENT MeOH
 NS 747
 DS 0
 SWH 11074.197 Hz
 FIDRES 0.337958 Hz
 AQ 1.4795252 sec
 RG 20432
 DW 45.150 usec
 DE 64.50 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 sec
 D11 0.03000000 sec
 D12 0.00002000 sec

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 13C
 P1 4.10 usec
 PL1 -6.00 dB
 SFO1 50.3355367 MHz

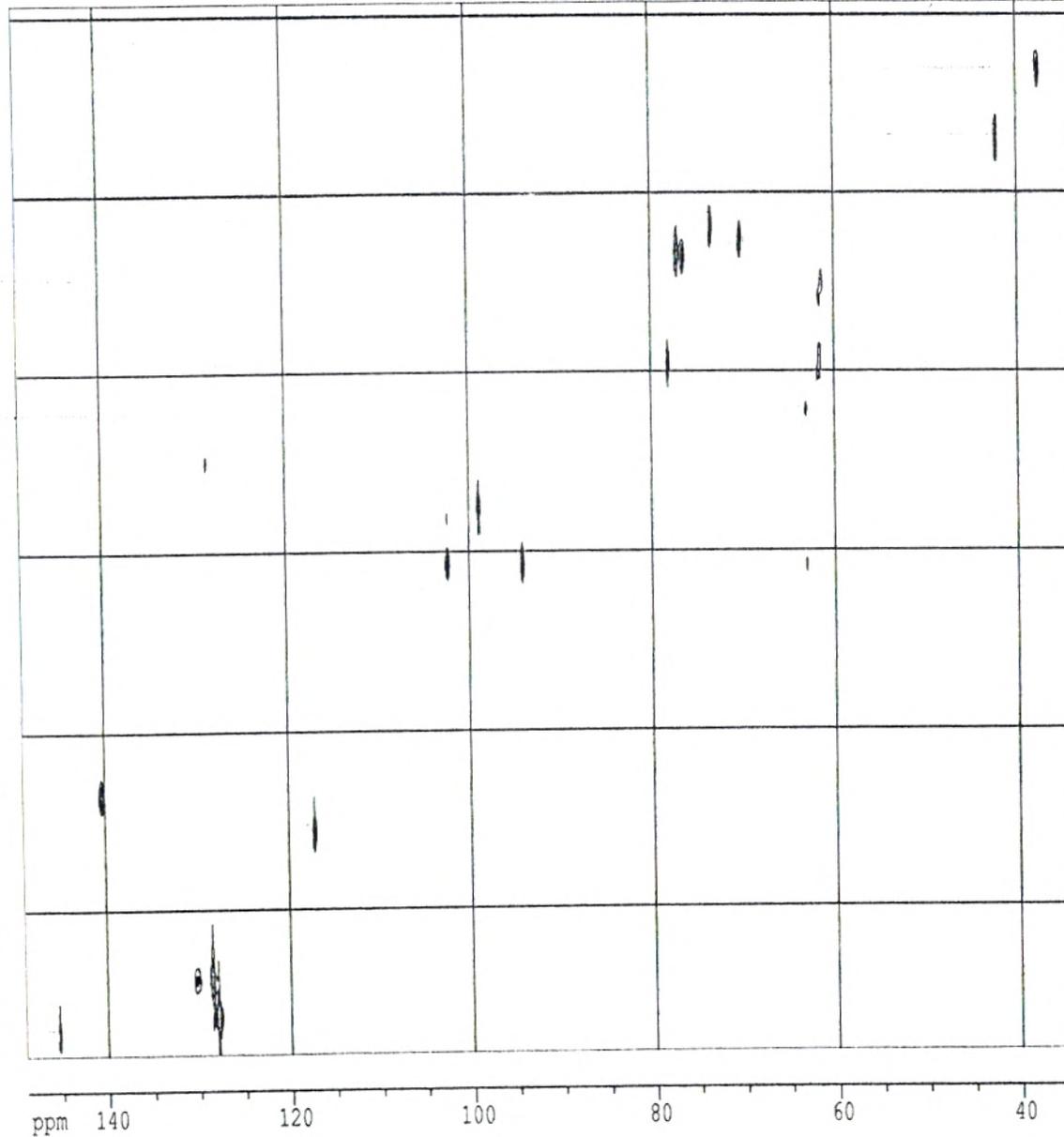
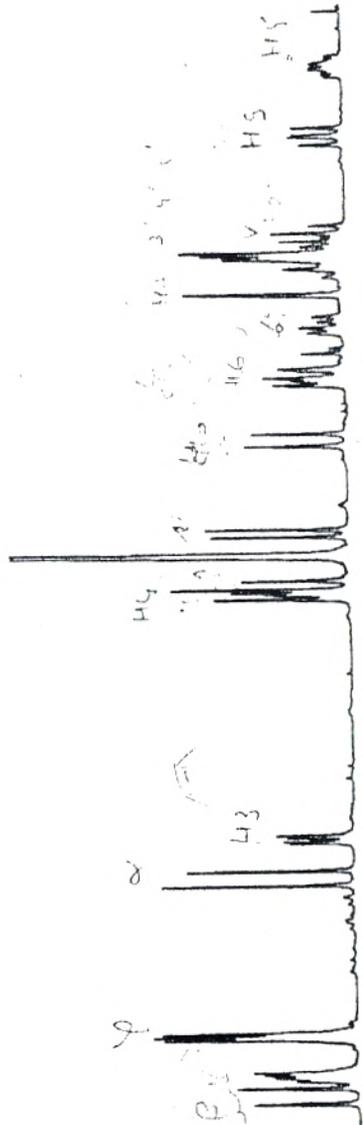
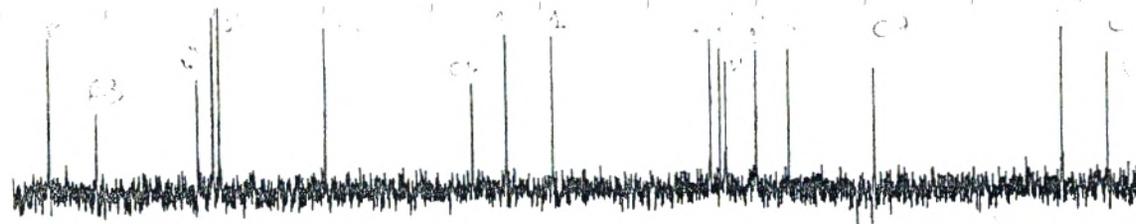
===== CHANNEL f2 =====
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 100.00 usec
 PL2 -6.00 dB
 PL12 18.00 dB
 PL13 18.00 dB
 SFO2 200.1609007 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 16384
 SF 50.3302792 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 0.20

1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 F1P 180.000 ppm
 F1 9059.45 Hz
 F2P 10.000 ppm
 F2 503.30 Hz
 PPMCM 8.50000 ppm/cm
 HZCM 427.80737 Hz/cm

ANNEXE D

HXDEPTBI/MS 3-5/CD3OI



Current Data Parameters
 NAME SED6-GR10M01
 EXPNO 7
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20000907
 Time 11.05
 I11STR0M spect
 PROBHD 5 mm Multino
 PULPROG hxdecptbtz
 TD 2048
 SOLVENT MeOH
 NS 96
 DS 16
 SWH 11074.197 Hz
 FIDRES 5.407323 Hz
 AQ 0.0925172 sec
 RG 29193
 DW 45.150 usec
 DE 64.50 usec
 TE 300.0 K
 D0 0.00000300 sec
 D1 1.00000000 sec
 D2 0.00340000 sec
 D11 0.03000000 sec
 D12 0.00002000 sec
 IN0 0.00017400 sec

***** CHANNEL f1 *****
 NU01 13C
 P1 4.10 usec
 P2 8.20 usec
 PL1 -6.00 dB
 SFO1 50.3355367 MHz

***** CHANNEL f2 *****
 CPDPRG2 waltz16
 NU02 1H
 P0 13.50 usec
 P3 9.00 usec
 P4 18.00 usec
 PCPD2 100.00 usec
 PL2 -6.00 dB
 PL3 18.00 dB
 SFO2 200.1609021 MHz

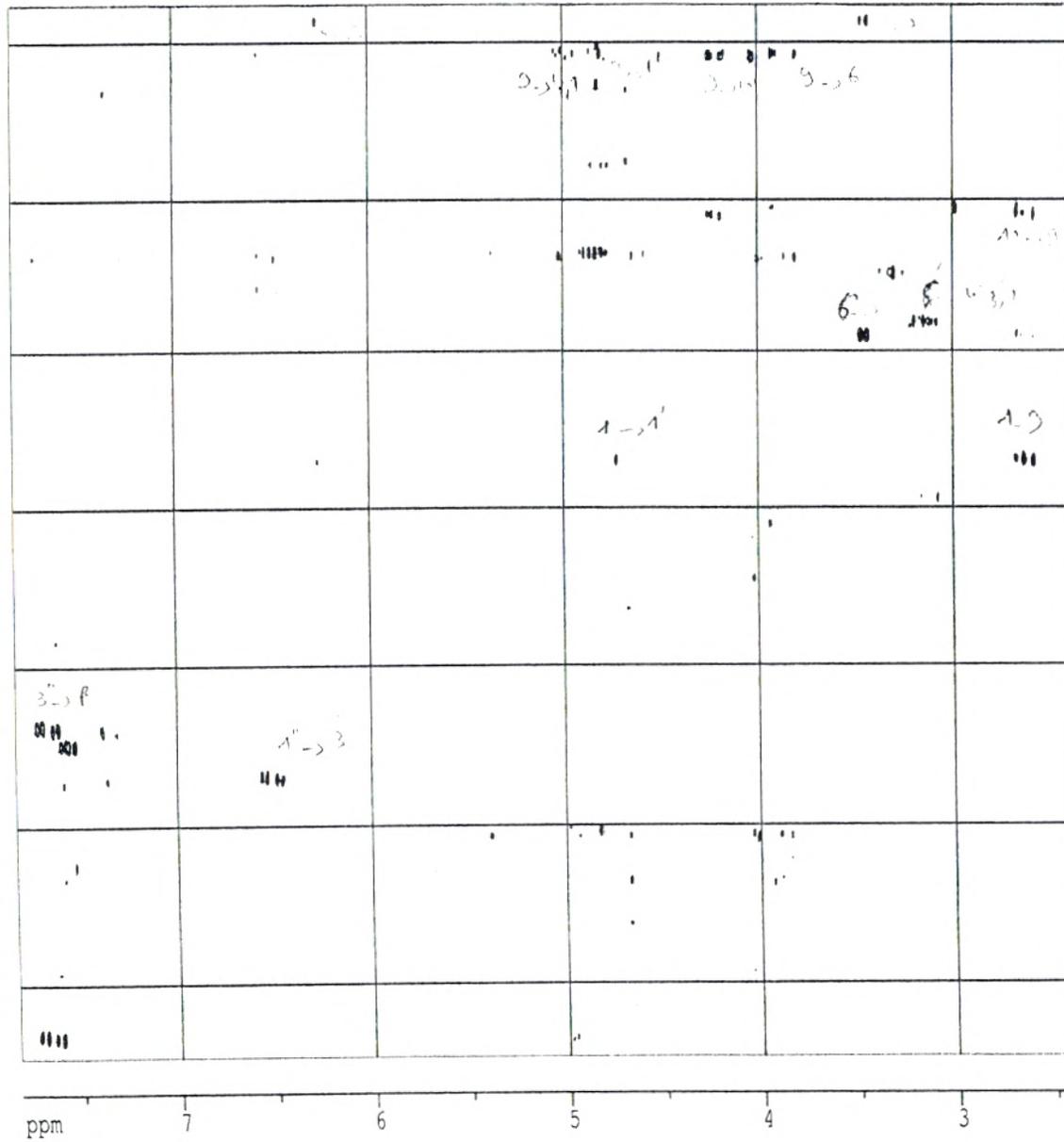
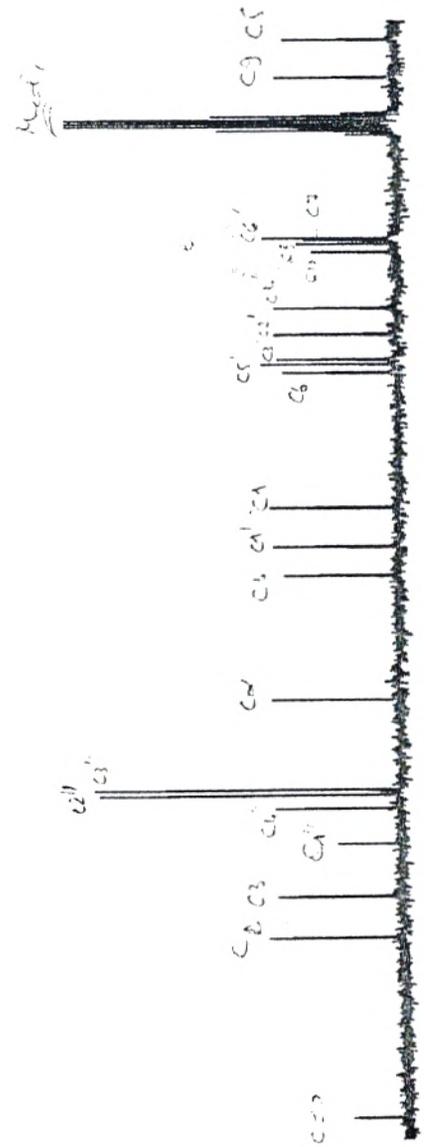
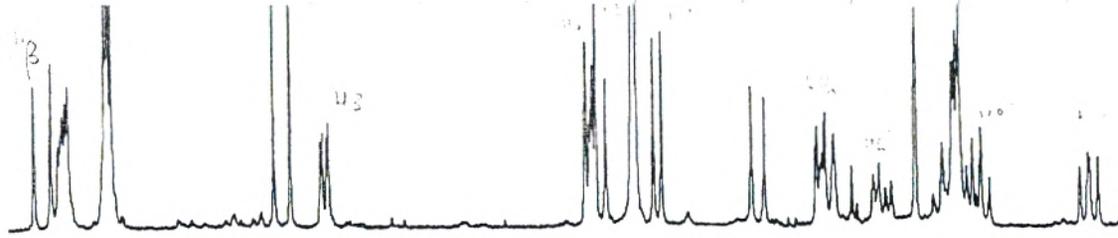
F1 - Acquisition parameters
 ID 201
 SFO1 200.1609 MHz
 FIDRES 7.148167 Hz
 SW 7.178 ppm

F2 - Processing parameters
 SI 1024
 SF 50.3302792 MHz
 WDW GSIIE
 SSB 2
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 0.50

F1 - Processing parameters
 SI 1024
 MC2 1991
 SF 200.1599754 MHz
 WDW GSIIE
 SSB 2
 LB 0.00 Hz
 GB 0

2D INMR plot parameters
 CX2 15.00 cm
 CX1 15.00 cm
 F2PLO 148.938 ppm
 F2LQ 7496.09 Hz
 F2PRI 34.195 ppm
 F2HI 1721.07 Hz
 F1PLO 7.817 ppm
 F1LQ 1564.62 Hz
 F1PRI 1.921 ppm
 F1HI 384.60 Hz
 F2PPMCH 7.64950 ppm/cm
 F2HSCH 385.00137 Hz/cm
 F1PPMCH 0.39302 ppm/cm
 F1HSCH 78.66754 Hz/cm

ANNEXE F



40
60
80
100
120
140
160
ppm

Current Data Parameters
 NAME SD06-GRIGNON
 EXPNO 8
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20000907
 Time 17.33
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Multinu
 PULPROG inv4lp1rnd
 TD 2048
 SOLVENT MeOH
 NS 128
 DS 16
 SWS 1436.782 Hz
 FIDRES 0.701554 Hz
 AQ 0.7127540 sec
 RG 1290
 DM 348.000 usec
 DE 497.14 usec
 TE 300.0 K
 D0 0.00000300 sec
 D1 1.50000000 sec
 D2 0.00345000 sec
 D6 0.06200000 sec
 IN0 0.00004515 sec

----- CHANNEL f1 -----
 NUC1 1H
 P1 7.80 usec
 P2 15.60 usec
 PL1 -6.00 dB
 SFO1 200.1609021 MHz

----- CHANNEL f2 -----
 NUC2 13C
 P3 5.30 usec
 PL2 -6.00 dB
 SFO2 50.335367 MHz

F1 - Acquisition parameters
 WD0 2
 TD 236
 SFO1 50.33554 MHz
 FIDRES 43.258583 Hz
 SW 220.008 ppm

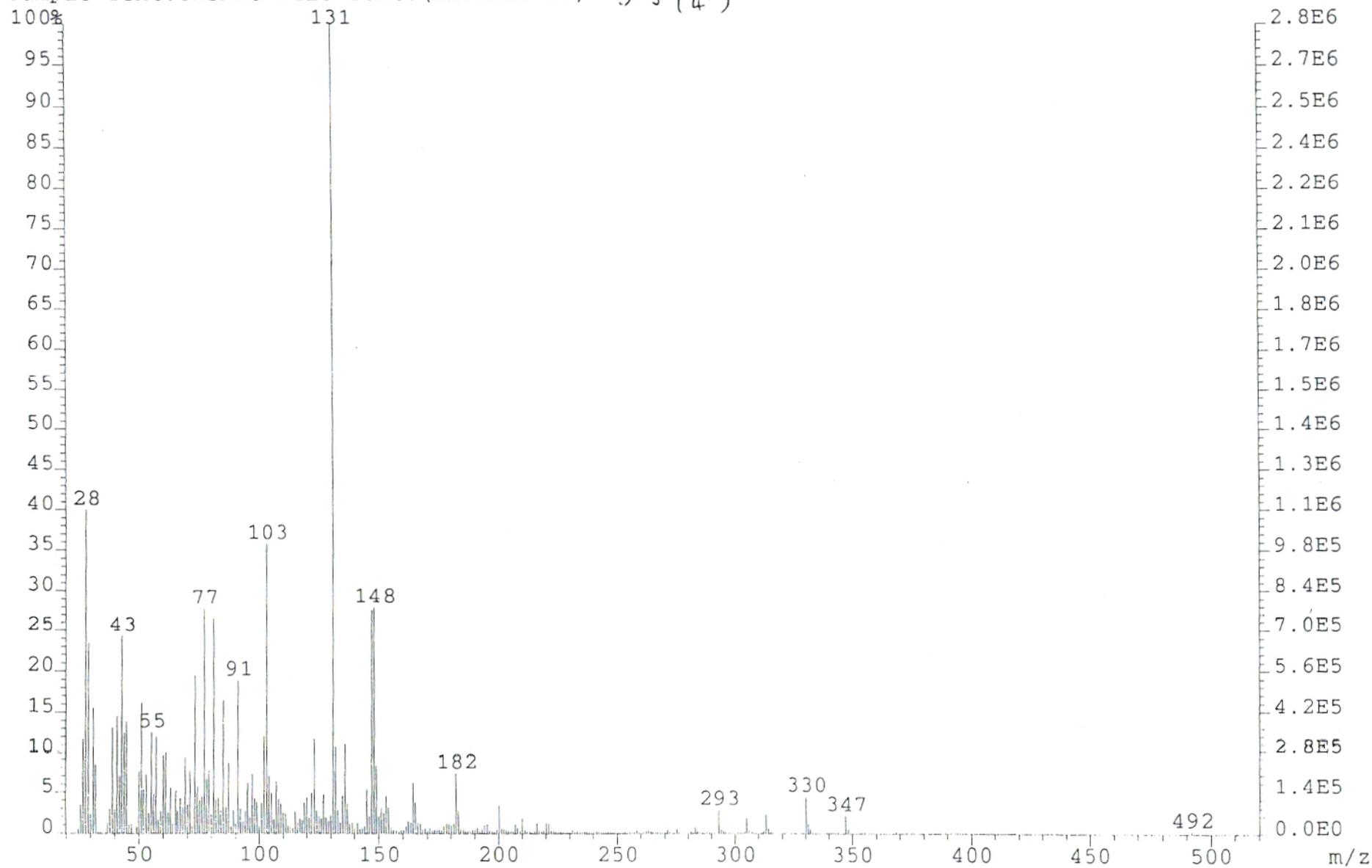
F2 - Processing parameters
 SI 1024
 SF 200.1600171 MHz
 WDM QSTINE
 SSB 4
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 0.50

F1 - Processing parameters
 SI 1024
 MC2 QF
 SF 50.3302782 MHz
 WDM QSINE
 SSB 4
 LB 0.00 Hz
 GB 0

2D NMR plot parameters
 CA2 15.00 cm
 CX1 15.00 cm
 F2PLO 7.828 ppm
 F2LO 1566.94 Hz
 F2PHI 2.396 ppm
 F2HI 479.53 Hz
 FIPL0 169.566 ppm
 FILO 8534.30 Hz
 FIPHI 35.270 ppm
 FIHI 1775.14 Hz
 F2PPMCM 0.36218 ppm/cm
 F2HSCM 72.49387 Hz/cm
 F1PPMCM 8.95306 ppm/cm
 F1HSCM 450.61026 Hz/cm

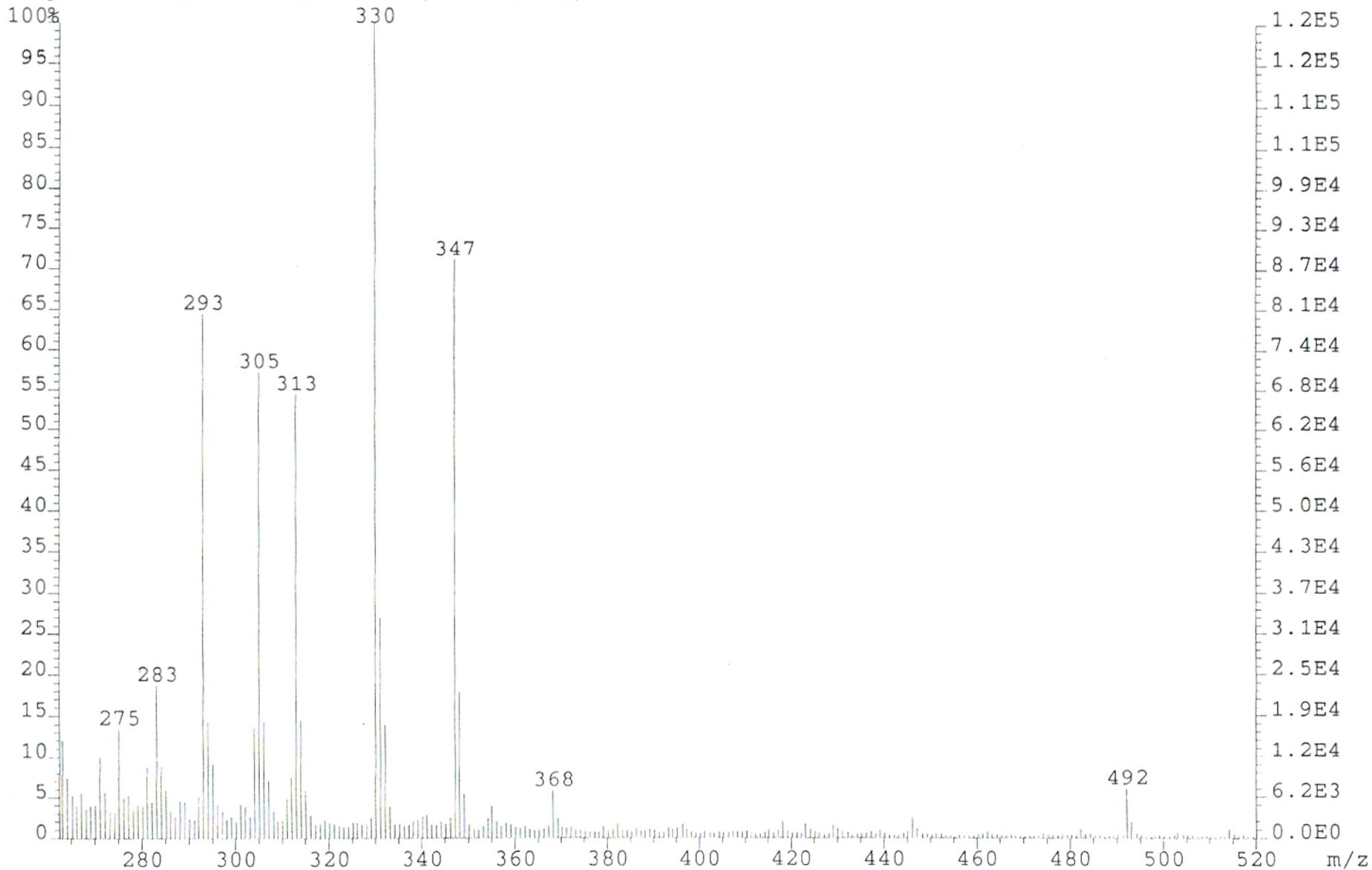
ANNEXE G

File:200451EIID-GRIGNON Ident:200_229-85 Mer Def 0.25 Acq: 7-JUN-2000 14:18:00 +9:23 Cal:CAL-EI>
AutoSpecEQ EI+ Magnet BpM:131 BpI:2789640 TIC:28456716 Flags:HALL
Sample Text:CESAMO File Text:(EXTRAIT-H1) 3-5 (4')



ANNEXE H

File:200451EIID-GRIGNON Ident:200_230 Mer Def 0.25 Acq: 7-JUN-2000 14:18:00 +9:24 Cal:CAL-EIID->
AutoSpecEQ EI+ Magnet BpM:131 BpI:2769772 TIC:31204296 Flags:HALL
Sample Text:CESAMO File Text:(EXTRAIT-H1)



ANNEXE I

ANNEXE J

Tableau 8 : L'effet de la streptozotocine sur la glycémie et le poids corporel des rats males et femelles.

Rats	Rats traités par la STZ (60mg/kg)		Rats traités par le tampon citrate (5ml/kg)	
	Males (n=11)	Femelles (n=11)	Males (n=3)	Femelles (n=3)
Glycémie t=0(g/l)	0.76±0.03	0.81±0.05	0.74±0.01	0.77±0.09
Glycémie t=72h (g/l)	3.59 ±0.10 ***a	3.06±0.16***a	0.92±0.10	0.84±0.10
Poids t=0 (g)	318.25±7.79	187.28±2.95	301.17±10.13	177.37±8.42
Poids t=72h(g)	289.25±7.27**a	174.62±2.72**a	308.57±11.12	180.53±8.14

a par rapport à t=0 ,*** p<0.001 ,** p<0.01.

Tableau 9: L'effet de la globularine et l'effet du glibenclamide sur la glycémie à jeun (g/l) des rats normaux et diabétiques.

Temps (min)	0	60	120	180	240	300	480
Rats normoglycémiques + NaCl 0.9%	0.96±0.06	1.15±0.07	1.04±0.06	0.93±0.07	0.86±0.05	0.85±0.05	0.75±0.08
Rats normoglycémiques +Glibenclamide 0.6mg/kg	0.92±0.02	0.91±0.03*	0.79±0.07*a (14.13%)	0.75±0.5**a (18.47%)	0.67±0.02*a (27.17%)	0.70±0.05	0.70±0.02
Rats normoglycémiques + Globularine 100mg/kg	0.96±0.07	1.01±0.06	0.86±0.06*a (10.4%)	0.86±0.06 (10.4%)	0.90±0.06	0.76±0.04	0.71±0.05
Rats diabétiques+ NaCl 0.9%	4.19±0.32	4.21±0.33	4.08±0.16	3.92±0.03	4.24±0.18	3.53±0.15	3.71±0.16
Rats diabétiques+ Glibenclamide 0.6mg/kg	3.21±0.23	3.65±0.15	3.81±0.20	3.58±0.19	3.49±0.23*a	3.52±0.19	3.39±0.10
Rats diabétiques+ Globularine 100mg/kg	3.81±0.13	4.01±0.14	3.63±0.15	3.43±0.13*a (10%)	3.54±0.09	3.38±0.16	3.44±0.16

a par rapport aux à t=0,** p<0.01 ,* p<0.05.

() pourcentage de diminution de la glycémie.

Tableau 10: Test de tolérance au glucose chez des rats normaux traités par le serum physiologique, le glibenclamide et la globularine.

Temps (min)	0	30	60	90	120	180
Rats normoglycémiques+ NaCl 0.9%	1.12±0.03	1.61±0.20	1.47±0.08	1.31±0.08	1.24±0.05	0.97±0.07
Rats normoglycémiques+Glibenclamide 0.6mg/kg	0.92±0.06	0.98±0.07*	1.08±0.02**	1.13±0.11	1.04±0.10	0.81±0.06
Rats normoglycémiques+ Globularine 100mg/kg	0.90±0.07	1.56±0.08	1.56±0.05	1.41±0.11	1.25±0.11	1.06±0.12

a par rapport aux rats traités par du NaCl, ** p<0.01, * p<0.05.

Tableau 11: L'effet de la globularine et l'effet du glibenclamide sur la glycémie non à jeun des rats diabétiques (g/l).

Jours	1	2	3	4	5	6	7
Rats normaux+ NaCl 0.9%	1,36±0.04	1.36±0.02	1.30±0.06	1.29±0.05	1.30±0.02	1.26±0.06	1.38±0.05
Rats diabétiques+ NaCl 0.9%	5.04±0.28	5.72±0.14	5.53±0.22	5.60±0.13	5.53±0.24	5.76±0.21	5.84±0.10
Rats diabétiques+ Glibenclamide 1.2mg/kg/j	5.33±0.27	4.98±0.19**	5.73±0.13	5.72±0.14	5.29±0.31	4.85±0.16**	5.01±0.20**
Rats diabétiques+ Globularine 200mg/kg/j	4.76±0.33	5.42±0.18	5.57±0.21	5.74±0.17	-	5.11±0.37	5.17±0.21

Par rapport aux rats diabétiques traités par du NaCl. ** p< 0.01.

Tableau12 : Evolution du poids corporel des rats traités par la globularine et le glibenclamide en 7 jours de l'expérience.

jours	1	2	3	4	5	6	7
Rats normaux + NaCl 0.9%	254.32±33.6	255.53±33.3	256.42±32.2	258.37±33.2	260.13±33.3	259.78±34.1	263.3±35.36
Rats diabétiques+ NaCl 0.9%	243.78±32.05	249.6±32.82	249.77±32.3	250.42±31.5	251.6±31.57	252.23±31.91	232.28±29.40
Rat diabétiques+ Glibenclamide 0.12mg/kg/j	237,7±25.19	235,54±24.74	238,91±25.20	240,14±25.09	236,84±23.46	227,63±20.88	240,75±23.32
Rats diabétiques+ Globularine 200mg/kg/j	217.86±16.65	221.53±17.74	219.16±17.09	217.5±16.48	218.23±16.88	211.26±13.14	221.48±16.14

Tableau 13: Quantités d'aliment et d'eau consommés par les rats durant les 7 jours de l'expérience.

	Quantité d'aliment consommée g/Kg/Jour	Quantité d'eau consommée ml/Kg/Jour
Rats normaux+NaCl 0.9%	58.25 ±3.50	144.88±8.33
Rats diabétiques +NaCl 0.9%	113.87±6.76***	671.82±26.63***
Rats diabétiques+Glibenclamide (0.12mg/kg/j)	102.63±9.62	671.53±75.69
Rats diabétiques+Globularine (200 mg/kg/j)	104.97±12.84	659.81±61.47

*** p<0.001 par rapport aux rats normaux.

Tableau 14: Glycémie et paramètres lipidiques dosés en fin de l'expérience (le 8^{ème} jour) g/l.

Paramètres	Glycémie	Triglycérides	Cholestérol total
Rats normaux + NaCl 0.9%	1.03±0.07	0.68±0.13	0.39±0.02
Rats diabétiques+ NaCl 0.9%	4.23±0.27	1.71±0.22** ^a	0.53±0.04** ^a
Rats diabétiques+Glibenclamide (0.12mg/kg/j)	4.79±0.11	0.95±0.25* ^u	0.51±0.03
Rats diabétiques+ Globularine (200 mg/kg/j)	4.22±0.36	0.79±0.07** ^b	0.41±0.02* ^b

^a par rapport aux rats normaux, ^b par rapport aux rats diabétiques NaCl . *<0.05, ** <0.01.

Résumé

L'étude de la **composition chimique** des feuilles de *G.alypum*, par les réactions de caractérisation, a révélé la présence des groupes chimiques suivants : les flavonoïdes, les coumarines, les tanins, les terpénoïdes et les saponosides, les tests de recherche des quinones, des anthraquinones et des alcaloïdes ont été négatifs. Le fractionnement de la phase d'acétate d'éthyle sur colonne ouverte de chromatographie liquide d'adsorption a permis d'obtenir 3.4% (g/g) de la **globularine**, un iridoïde identifié par analyses spectrales (RMN, SM). Une étude des flavonoïdes (sous forme aglycones obtenus par hydrolyse acide), et des saponosides (extrait brut quantifié) a été également réalisée. L'étude de la **toxicité aigue** de la globularine chez des rats a montré que les différentes doses utilisées (300,600, 800,1000 mg /kg) n'avaient aucun effet mortel. L'**activité antidiabétique** de la globularine a été étudiée chez des rats normaux (RN) et des rats rendus diabétiques par la **streptozotocine ;60mg/kg** (RD), et a été comparée à une substance de référence : le glibenclamide. Deux types d'études ont été réalisées. **En 1^{er} temps** ; un suivi de la glycémie à 0min (avant), 60,120,180,240,360 et 480min (après) injection intra-péritonéale de la globularine (100mg/kg p.c) et du glibenclamide (0.6mg/kg) à des RN et RD. Un test de tolérance au glucose (TTG ; 2.5g/kg.p.o) a également été réalisé chez des RN. **En 2^{ème} temps** ; un suivi de la glycémie journalière a été réalisé chez des RD traités par la globularine et le glibenclamide par la même dose, deux injections par jour pendant 7 jours. Le poids des rats et les quantités d'aliment et de l'eau consommées ont été mesurées quotidiennement. Au 8^{ème} jour du traitement le taux des triglycérides et du cholestérol ont été mesurés. La globularine, a diminué la glycémie des RN à t=120min (p < 0.05) et des RD à t = 180min (p < 0.05), par ailleurs avec le glibenclamide, on a noté uniquement des diminutions chez les RN aux temps suivants : t=120 min, 180min (p < 0.05) et à t=240min (p < 0.01). Le TTG chez les RN a été positif, en présence du glibenclamide et négatif en présence de la globularine. L'administration de la globularine aux RD pendant 7 jours, n'a pas montré de réduction significative de glycémie, excepté celle faite au 7^{ème} jour (p < 0.05), celle du glibenclamide également été sans effet. A noter qu'un effet hypolipémiant remarquable a été observé chez les rats traités par la globularine ; diminution du taux des triglycérides (p<0.01) et du cholestérol total (p<0.05) après 7 jours de traitement.

En conclusion on peut dire que la globularine est une substance faiblement toxique, l'activité antidiabétique a été peu efficace pour classer cette substance parmi les produits naturels antidiabétiques, l'effet hypolipémiant de la globularine détecté en fin de l'expérience nous ouvre un nouveau axe de recherche intéressant, d'autres études seront nécessaires.

Mots clés : Diabète sucré, *Globularia alypum* L., la globularine, RMN, SM, rat, toxicité aigue, activité antidiabétique, diabète expérimental.

Abstract

The leaves of *G.alypum* were investigated for their **secondary metabolites**, using chemical reactions, flavonoids, coumarins, tannins, terpenoids and saponins, were detected, quinones anthraquinones and alkaloids were absent. Extraction of **globularin** using chromatographic method and spectral analysis was well accomplished, 100 g of powdered leaves yield about 3.14g of pure globularin. Identification of aglycones flavonoids after acid hydrolysis was failed, by absence of standards. Crude saponin extract was quantified from butanolic fraction. **Acute toxicity** of globularin was assessed in rats' females at different doses (300,600, 800, 1000 mg /kg); no toxic effect was noted. **Antidiabetic activity** of globularin was investigated in normal and **streptozotocin** induced diabetic rats (60mg/kg), **glibenclamide** was used as drug reference. Drugs was administered in two manner, **first** at a single intraperitoneal dose, globularin; 100mg/kg and glibenclamide, 0.6mg/kg, to normal and diabetic rats, tolerance test of glucose was also done in normal rats; **second** at the same dose, but injected twice daily for 7 days only to diabetic rats. Body weight, Food and water intake, were measured every days at the same moment for seven days of treatment. Hypolipidemic effect of globularin was investigated in diabetic rats, at the end of treatment. Following acute treatment a moderate reduction was noted at 120min (p < 0.05) in normal rats and at 180min (p < 0.05) in diabetic rats treated with globularin at 120,180 (p < 0.05) and 240 (p < 0.01) min with glibenclamide only in normal rats. Tolerance test of glucose was positive with glibenclamide and negative with globularin. Sub-chronic administration was with no effect, both in diabetic rats treated with globularin and glibenclamide. It was found that globularin could significantly reduce serum triglycerides and total cholesterol concentrations.

In conclusion, globularin is considered as no toxic molecule, their antidiabetic activity was absent in our experimental conditions. Globularin was possible active principle of hypolipidemic. Further studies shall be necessary for clarifying these results.

Words keys: Diabetes mellitus, *Globularia alypum* L., natural's products, globularin, spectral analysis, rat, acute toxicity, antidiabetic activity.

المرض السكري من أكثر الأمراض انتشاراً يتميز بنسبة مرتفعة من الغلوكوز في الدم ناتجة عن خلل في إنتاج وعمل الأنسولين. يعرف هذا المرض المزمن بتعدد الحالات المرضية، ولهذا لعدة أنواع: نوع أ ونوع ب هما أكثر الأنواع انتشاراً ودراسة، تم التطرق إليهما بشكل مفصل يناقش أهم الدراسات العلمية التي أجريت عليهما. علاج المرض السكري رغم نجاحه يشكو من بعض أذى البحث عن جزيئات كيميائية يمكن لها أن تتحكم في المرض بطريقة أكثر فعالية هو حالياً إحدى اهتمامات الهيئة العلمية. ولقد خصص للنباتات حيز كبير كمصدر علاجي للمرض السكري. **بلاغ ريبا اليوم** (عين الأرنب) واحدة من هذه النباتات المتميزة بقدرتها على خفض نسبة السكر في الدم، وقد تم تجريبها البرهان على هذه الخاصية. إيجاد الجزيء أو الجزيئات المسئولة عن هذه القدرة هذه الدراسة أسفرت دراسة المكونات الكيميائية لأوراق غلوبيلاريا اليوم على وجود عدة مركبات طبيعية، ولقد تم بنجاح إستخلاص مركب نقي، غلوبيلارين (RMN, SM) الذي برهن أنه مركب سام. من جهة أخرى تطرقنا للبحث عن إمكانية غلوبيلارين في خفض نسبة السكر في الدم. في هذا الإطار تم حقن هذا الجزيء في جردان من نوع "وستار" على طريقتين: الأولى حقنة واحدة (100 ملغ) في جردان سليمة وأخرى مصابة بالمرض السكري (سترايبتوزوتوسين 60ملغ/كغ) وتمت مراقبة نسبة السكر في الدم لمدة 480 دقيقة. الثانية حقنات يومية (صباحاً 100 ملغ/كغ) (علاً 100 ملغ/كغ) فقط في جردان مصابة بالمرض السكري وذلك لمدة 7 أيام، تم خلالها قياس نسبة السكر في الدم، الوزن وكميات الغذاء والماء المستهلكين يوميا بطريقة دقيقة وقد تم كذلك في هذه الدراسة قياس نسبة الكولسترول والجليسيريدات الثلاثية في الدم بالموازاة فورنت هذه التجارب مع جزيئي قادر على خفض نسبة السكر في الدم وهو غليبكتاميل في كلتا التجربتين لم تبدي الغلوبيلارين فعالية ملموسة في خفض نسبة السكر في الدم، يمكن أخذها بعين الإعتبار، وعلى عكس ما كنا ننتظره برهنت الغلوبيلارين على قدرتها على خفض نسبة الدهون في الدم، كخلاصة لهذا العمل يمكن القول أن الغلوبيلارين جزيء غير سام، ليس فعال ضد المرض السكري، بل يمكن له أن يكون فعال ضد الدهون، وهذا ما يفتح المجال لدراسات أخرى.

الكلمات المفتاحية: مرض السكري، غلوبيلاريا اليوم، غلوبيلارين (RMN, SM)، تسمم حاد، قدرة ضد السكري، سترايبتوزوتوسين جردان وستار مرض السكري تجريب