

Etude pharmacologique de fractions antidiabétiques de feuilles d'*Icacina oliviformis* (Poiret) Raynal

A. MANGA¹, A. GASSAMA³, A.D. FALL¹, K. DIATTA¹, W. DIATTA¹, G.Y. SY², E. BASSENE¹

Résumé

Icacina oliviformis (Poiret) Raynal est une plante de la pharmacopée traditionnelle sénégalaise dont les feuilles sont utilisées au Sénégal dans le traitement du diabète. L'extraction de la poudre de feuilles a été faite successivement avec de l'hexane, du dichlorométhane, de l'éthanol et de l'eau. Les composés de la fraction éthanolique brute (FEB) ont été séparés sur colonne de silice avec comme éluant acétate d'éthyle/cyclohexane et acétate d'éthyle/méthanol. Les tests ont été réalisés chez des rats normo-glycémiques, sur un test de tolérance au glucose et chez des rats diabétiques de type 2. Chez des rats normo-glycémiques, la FEB (150 mg/kg, per os) entraîne une baisse du glucose sanguin ($0,57 \pm 0,03$ g/L vs $0,68 \pm 0,03$ g/L) ($p < 0,05$; $n = 5$) au bout d'1 heure d'observation. Cette baisse est toutefois transitoire, avec un retour progressif de la glycémie à l'état de base au bout de 4h. Sur un test de tolérance au glucose, la FEB (150 mg/kg, per os) et la FAEM (150 mg/kg, per os) préviennent de façon significative l'apparition d'un pic d'hyperglycémie. La variation Δ du pic d'hyperglycémie est de $1,75 \pm 0,20$ g/L dans la groupe contrôle. Elle est respectivement de $1,27 \pm 0,26$ g/L et de $0,97 \pm 0,13$ g/L pour la FEB et la FAEM. Chez des rats diabétiques de type 2, l'administration quotidienne de la FAEM (150 mg/kg, per os) entraîne un effet anti-hyperglycémiant au bout de 8 jours de traitement. En effet, le glucose varie de $2,81 \pm 0,08$ g/L à $1,34 \pm 0,02$ g/L ($p < 0,05$; $n = 5$).

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

Abstract

Chemical and pharmacological study of antidiabetic fractions of *Icacina oliviformis* (Poiret) Raynal leaves

Icacina oliviformis (Poiret) Raynal is a plant of the Senegalese traditional pharmacopoeia, whose leaves are used in diabetes treatment in Senegal. Extraction of powder leaves was made successively with hexane, dichloromethane, ethanol and water. Compounds of crude ethanol fraction (CEF) were separated on a silicagel column with eluent ethyl acetate/cyclohexane and methanol/ethyl acetate. The test were performed in normoglycemic rats, oral glucose tolerance tests and type 2 diabetic rats. In normoglycemic rats, CEF (150 mg/kg, per os) causes a decrease of blood glucose (0.57 ± 0.03 g/L vs 0.68 ± 0.03 g/L) ($p < 0.05$; $n = 5$) 1 hour after administration, with gradual return to base line values of blood glucose after 4 hours. In oral glucose tolerance test, the CEF (150 mg/kg, per os) and the methanol ethyl acetate fraction (MEAF) (150 mg/kg, per os) significantly prevent the apparition of hyperglycemic peak. The Δ variation of hyperglycemia peak is 1.75 ± 0.20 g/L in the control group. This variation is respectively, 1.27 ± 0.26 g/L and 0.97 ± 0.17 g/L for BEF and the MEAF. In type 2 diabetic rats, the daily administration of MEAF (150 mg/kg, per os) induced an anti-hyperglycemic effect after

1. Labo. de pharmacologie et botanique, FMPO, UCAD, Dakar, Sénégal
2. Labo. de pharmacologie et pharmacodynamie, FMPO, UCAD, Dakar, Sénégal
3. Labo. de chimie et physique des matériaux, Université de Ziguinchor, Sénégal

Mots-clés :

***Icacina oliviformis* (Poiret) Raynal, feuilles, glucose sanguin, diabète de type 2**

Keywords:

***Icacina oliviformis* (Poiret) Raynal, leaves, blood glucose, type 2 diabetes**

8 days of treatment. In fact, the glycaemia varied from 2.81 ± 0.08 g/L to 1.34 ± 0.02 g/L ($p < 0.05$; $n = 5$).

The MEAF has an anti-hyperglycemic profile in both glucose tolerance test and type 2 diabetic rats. This could justify, the traditional use of the leaves of *Icacina oliviformis* (Poiret) Raynal to treat type 2 diabetic rats.

Introduction

Le diabète est une maladie endocrinienne qui touche environ 2% de la population mondiale. Dans le monde, il y a environ 347 millions de diabétiques dont un grand nombre dans les pays en voie de développement [1]. Plus de 80% de décès par diabète se produisent dans les pays à revenu faible ou intermédiaire [2]. Le diabète de type 2 est une forme insidieuse à développement lent, qui apparaît généralement vers la cinquantaine, et représente 85 à 90% de la population diabétique. Dans la région Afrique, le recours aux plantes de la pharmacopée traditionnelle devient courant, selon FARNTHWORTH [3], plus de 70% de la population africaine ont eu à utiliser des plantes médicinales dans le traitement de diverses affections.

Au Sénégal, des études réalisées au centre antidiabétique Marc SANKALE de l'hôpital Abass Ndao, ont montré que la plupart des patients diabétiques, a eu recours au moins une fois aux extraits de plantes [4].

Icacina oliviformis (Poiret) Raynal est utilisée par les tradi-thérapeutes du Sénégal dans la prévention du rachitisme, le traitement du diabète et du paludisme [5, 6].

Au plan chimique, cette plante renferme des substances terpéniques. Une étude phytochimique faite sur le tubercule de la plante révèle la présence de icacenone (0,08%), icacinal (0,03%), β -sitostérol (55%), stigmastérol (45%) et hardwikiol linoléate [7].

Des travaux antérieurs ont montré une activité anti-hyperglycémiant de la fraction éthanologique de feuilles d'*Icacina oliviformis* (Poiret) Raynal [5].

L'objectif de cette étude était de : I) fractionner les composés de feuilles d'*Icacina olivifor-*

mis (Poiret) Raynal par des solvants de polarités différentes et par chromatographie sur gel de silice, II) de tester les fractions obtenues sur divers modèles d'étude du glucose sanguin.

Matériels et méthodes

Matériel végétal

Les feuilles d'*Icacina oliviformis* (Poiret) Raynal ont été récoltées aux mois de février 2010 et 2011 en Casamance dans l'enceinte de l'Université de Ziguinchor où elle pousse spontanément.

Elles ont été identifiées et séchées pendant 3 semaines à la température ambiante au laboratoire de pharmacognosie de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie (FMPO) de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD). Un spécimen a été déposé à l'herbier du laboratoire de pharmacognosie sous le numéro 2012/015.

Obtention de la fraction éthanologique brute (FEB)

Deux-cent trente grammes de poudre ont été introduits dans un ballon de 2 litres contenant 500 ml d'hexane et le tout porté à ébullition sous reflux pendant 4h. Le résidu obtenu après évaporation de l'extrait est mis dans un verre à montre et placé dans un dessiccateur pour une évaporation complète du solvant d'extraction. Le marc issu de l'extraction hexanique est repris successivement dans les mêmes conditions que précédemment par 500 ml de dichlorométhane, d'éthanol et d'eau.

Les filtrats obtenus donnent respectivement après évaporation un résidu dichlorométhane, éthanolique et aqueux.

Séparation de la fraction éthanolique brute par chromatographie sur gel de silice

Huit grammes du résidu sec de la fraction éthanolique brute (FEB) ont été fractionnés par chromatographie sur gel de silice (34 cm) au laboratoire de chimie et physique des matériaux (LCPM) de l'Université de Ziguinchor. L'élution a été faite avec 1L suivant un gradient de polarité croissant successivement par un mélange de solvants avec Acétate d'éthyle / Cyclohexane (3 : 7 v/v) ; Acétate d'éthyle / Cyclohexane (7 : 3 v/v) et Acétate d'éthyle / Méthanol (9 : 1 v/v).

Les trois phases obtenues successivement ont été évaporées séparément à sec. La fraction Acétate d'éthyle/méthanol (FAEM) a été utilisée lors des tests pharmacologiques.

Matériel animal

Des rats de souche Wistar de poids moyen compris entre 125 et 165 g ont été utilisés. Ces rats ont été élevés à l'animalerie du Département de Pharmacie (UCAD).

Essais chez des rats normo-glycémiques

Les rats ont été répartis en lots de 5 puis mis à jeun pendant 14 heures avant l'expérience. Des prélèvements de sang ont été effectués par ponction rétro-orbitaire avant administration des produits.

Les rats ont été ensuite gavés avec de l'eau physiologique (contrôle) à 10 mL/kg, ou la FEB à 150 et à 300 mg/kg, la fraction aqueuse (FA) à 300 mg/kg.

Des prélèvements de sang ont été effectués toutes les heures pendant 4 heures.

Essais sur un test de tolérance au glucose

Les rats ont été répartis en lots de 5 puis mis à jeun pendant 14 heures avant l'expérience. Le premier prélèvement sanguin a été effectué 90 min avant gavage (T-90 min) pour déterminer la glycémie de base.

Immédiatement après, les rats ont été gavés avec de l'eau physiologique (10 mL/kg), FEB (150 mg/kg) ou la FAEM (150 mg/kg).

Un deuxième prélèvement de sang a été effectué à T0, suivi de l'administration per os d'une solution de glucose (4 g/kg). D'autres prélèvements de sang ont été effectués toutes les 30 min pendant 120 min.

Essais chez des rats diabétiques de type 2

Le diabète a été induit chez des rats par injection intra-péritonéale d'une dose unique d'alloxane de 120 mg/kg.

Deux jours après administration de l'alloxane, la glycosurie a été déterminée chez les rats à l'aide de bandelettes réactives de type Keto Diastix®. Les rats présentant une glycosurie franche ont été répartis en différents lots de 5 rats chacun. Ils ont été traités quotidiennement per os avec de l'eau physiologique (10 ml/kg/j) ; le glibenclamide (0,2 mg/kg/j) ou la FAEM (150 et 300 mg/kg/j) pendant 8 jours. Un prélèvement sanguin a été effectué à J0 puis toutes les 48 heures pendant 8 jours.

Dosage du glucose

Le dosage a été réalisé selon la méthode à la glucose-oxydase [8].

Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés sous la forme d'une moyenne \pm erreur standard à la moyenne.

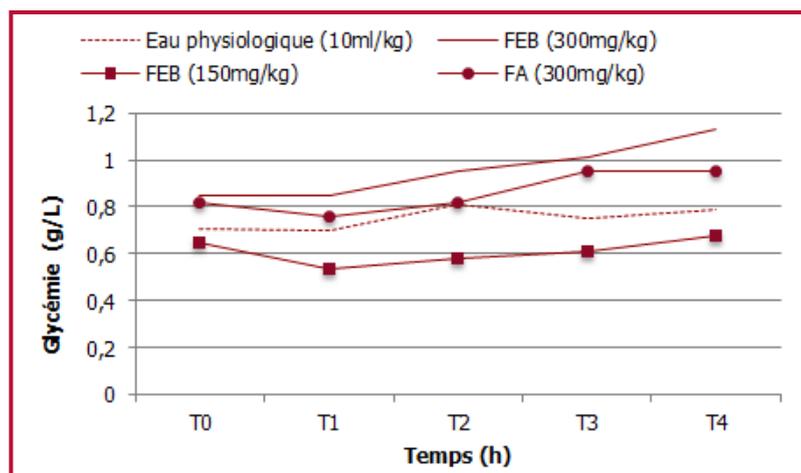
Tableau I : Rendement d'extraction des feuilles d'*Icacina oliviformis* (Poiret) Raynal

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

Tableau II : Rendement des fractions sur colonne

Solvant d'élution	Poids (g)	Rendement (%)
Acétate d'éthyle/cyclohexane (3/7)	1	12,5
Acétate d'éthyle/cyclohexane (7/3)	1,2	15
Acétate d'éthyle/méthanol (9/1)	6	75

Figure 1 : Variations de la glycémie chez des rats normo-glycémiques traités avec *Icacina oliviformis* (Poiret) Raynal



FEB : Fraction éthanolique brute **FA :** Fraction aqueuse

Ils ont été comparés à l'aide du test "t" de Student. La différence entre deux moyennes a été considérée comme significative lorsque $p < 0,05$, $n = 5$ est le nombre d'expériences dans chaque groupe.

Résultats

Rendements de l'extraction

Les tableaux I et II donnent les rendements des différents extraits et fractions obtenus.

Essais chez des rats normo-glycémiques

L'administration de l'eau physiologique, à la dose de 10 mL/kg per os, n'entraîne pas une modification de la glycémie de base chez les rats normo-glycémiques au bout de 4 heures d'observation ($0,87 \pm 0,08$ vs $0,77 \pm 0,04$ g/l) (ns, $n = 5$). A l'inverse, l'administration de la FEB, à la dose de 150 mg/kg per os, entraîne une hypoglycémie au bout d'1 heure ($0,57 \pm 0,03$ vs $0,68 \pm 0,03$ g/l) ($p < 0,05$, $n = 5$), suivie d'un retour progressif de la glycémie vers les valeurs de base au bout de 4 h ($0,74 \pm 0,06$ vs $0,68 \pm 0,03$ g/l).

A une dose plus élevée, la FEB (300 mg/kg, per os) est hyperglycémiant ($1,30 \pm 0,17$ vs $0,88 \pm 0,03$ g/l). Des résultats similaires ont été observés avec la fraction aqueuse (FA) à la dose de 300 mg/kg per os (Figure 1).

Essais sur un test de tolérance au glucose

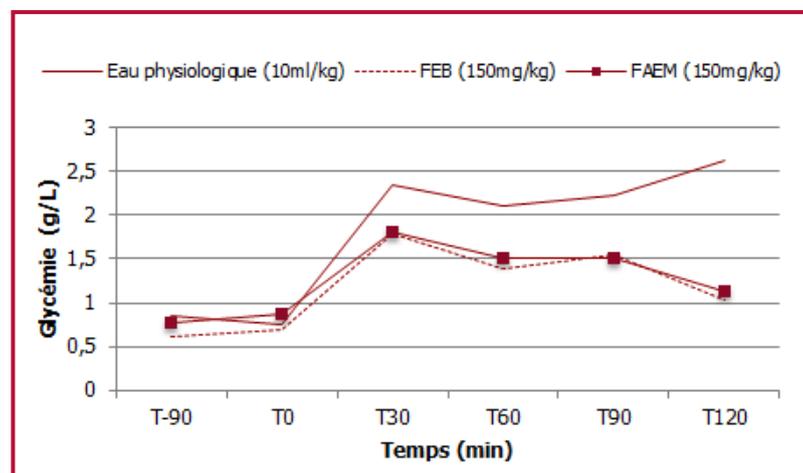
Un prétraitement par la FEB, à la dose de 150 mg/kg per os prévient de façon significative le pic hyper-glycémique observé lors du test de tolérance au glucose.

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

Essais chez diabétiques de type 2

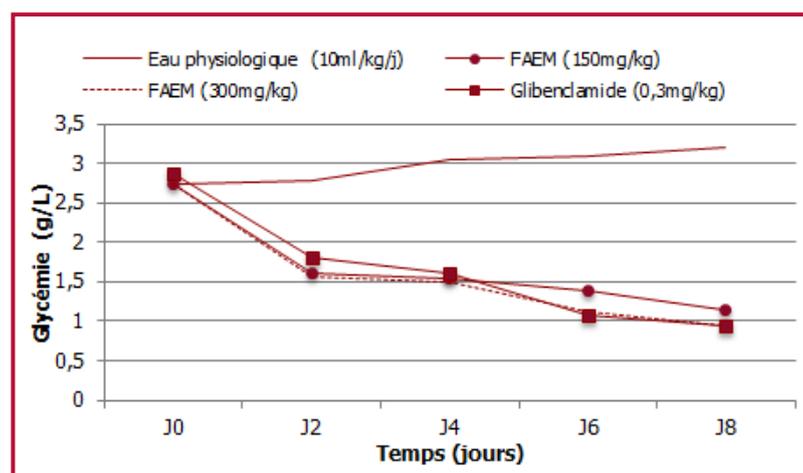
Dans le groupe contrôle, l'administration quotidienne de l'eau physiologique ne modifie pas l'hyperglycémie permanente des rats diabétiques de type 2 ($3,27 \pm 0,06$ vs $2,82 \pm$

Figure 2 : Variations de la glycémie chez des rats soumis à un test de tolérance au glucose après traitement avec *Icacina oliviformis* (Poiret) Raynal



FEB : Fraction éthanolique brute **FAEM :** Fraction acétate d'éthyle / méthanol

Figure 3 : Variations de la glycémie chez des rats diabétiques de type 2 après administration quotidienne de glibenclamide et de *Icacina oliviformis* (Poiret) Raynal



FAEM : Fraction acétate d'éthyle / méthanol

0,09 g/l) ($p < 0,05$, $n = 5$). Le glibenclamide (0,3 mg/kg/j per os) est anti-hyperglycémiant chez des rats diabétiques de type 2 ($0,99 \pm 0,04$ vs $2,94 \pm 0,06$ g/l) ($p < 0,05$, $n = 5$). L'administration quotidienne de la FAEM est anti-hyperglycémiant de façon dépendante à la dose. En effet, à la dose de 150 mg/kg/j per os, la glycémie varie de $2,81 \pm 0,08$ à $1,34 \pm 0,02$ g/l au bout de 8 jours. A une dose plus élevée (300 mg/kg/j per os), la glycémie varie de $2,79 \pm 0,05$ à $1,06 \pm 0,11$ g/l.

Discussion

Des travaux antérieurs réalisés sur l'effet sur le glucose sanguin d'extraits d'*Icacina oliviformis* (Poiret) Raynal ont montré un effet hypoglycémiant de l'extrait éthanolique de feuilles de cette plante. Toutefois, l'hypoglycémie de l'extrait éthanolique observée dans cette étude est transitoire avec un retour progressif de la glycémie vers des valeurs de base [5]. Le but de la présente étude était de fractionner les composés de feuilles d'*Icacina oliviformis* (Poiret) Raynal et de tester les fractions obtenues sur divers modèles d'étude de la glycémie.

Chez des rats normo-glycémiques, la fraction éthanolique brute (FEB) de feuilles d'*Icacina oliviformis* (Poiret) Raynal est hypoglycémiant une heure après administration avec toutefois un retour de la glycémie vers la ligne de base au bout de 4 heures d'observation. Ces résultats montrent un effet sur le glucose identique entre l'extrait total éthanolique des travaux antérieurs de NDIAYE [5] et la FEB de la présente étude. L'effet hypoglycémiant de molécules insulino-sécrétrices comme le glibenclamide met en jeu la sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques [9]. L'hypoglycémie observée avec des extraits de feuilles d'*Icacina oliviformis* (Poiret) Raynal en administration aiguë à une dose unique pourrait être liée à la libération d'insuline chez les rats normo-glycémiques.

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

Pour confirmer le profil anti-hyperglycémiant des composés de feuilles d'*Icacina oliviformis* (Poiret) Raynal, la FAEM a été testée en administration chronique chez des rats diabétiques de type 2, sensibles à l'action du glibenclamide. Comme pour le glibenclamide, la FAEM entraîne un effet anti-hyperglycémiant chez des rats diabétiques de type 2. L'amplitude de l'effet anti-hyperglycémiant de la FAEM est identique à celle du glibenclamide. L'effet sur le glucose sanguin du glibenclamide met en jeu la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques [9].

Au plan phytochimique, une caractérisation préliminaire a montré la présence de flavonoïdes dans la FEB et la FAEM, avec une plus forte teneur dans la FAEM.

Plusieurs études ont décrit l'effet sur le glucose sanguin d'extraits de plantes riches en flavonoïdes. En effet, la fraction d'acétate d'éthyle

d'*Euonymus alatus* riche en flavonoïdes aurait des propriétés stimulantes sur la libération d'insuline [10]. Il en n'est de même de l'effet anti-hyperglycémiant d'un flavonol dérivé de fleurs d'*Hibiscus vitifolius* Linn, sur un test de tolérance au glucose [11].

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

Conclusion

La FAEM est anti-hyperglycémiant sur un test de tolérance au glucose et chez des rats diabétiques de type 2.

Ces résultats pourraient justifier l'utilisation des feuilles d'*Icacina oliviformis* (Poiret) Raynal en milieu traditionnel pour traiter le diabète de type 2.

Références

- DANAËI G, FINUCANE MM, LU Y, SINGH GM, COWAN MJ, PACIOREK CJ.** National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*, 2011; 378 (9785) : 31–40.
- MATHERS CD, LONCAR D.** Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 2006 ; 3 (11) : e442.
- FARNSWORTH NR, AKERELE O, BINGEL AS, SOEJARTO DD, GUO ZG.** Medicinal plants in therapy. *Bull. World Health Org.* 1985; 63 (6) : 965-981.
- DIËYE AM, SARR A, DIOP SN, NDIAYE M, SY GY, DIARRA M. et al.** Medicinal plants and the treatment of diabetes in Senegal: survey with patients. *Fund. Clin. Pharmacol.* 2008 ; 22 (2) : 211-216.
- N'DIAYE M, DIATTA W, SY GY, FALL AD, FAYE B, BASSENE E.** Activité anti-hyperglycémiant de l'extrait éthanolique de feuilles d'*Icacina senegalensis* Juss (*Icacinaceae*). *Méd. d'Afr. Noir.* 2008 ; 55 (8-9) : 442-445.
- SARR SO, PERROTEY S, FALL I, ENNAHAR S, ZHAO M, DIOP YM, CANDOLFI E, MARCHIONI E.** *Icacina senegalensis* (*Icacinaceae*), traditionally used for the treatment of malaria, inhibits in vitro plasmodium falciparum growth without host cell toxicity. *Malaria J.* 2011; 10p.
- SOICKE H, GORLER K, WARNING H.** Terpenic constituents from *Icacina senegalensis*. *Planta Med.* 1991 ; 57 (Suppl 1) : 86-87.
- TRINDER P.** Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* 1969 ; 6: 24-27.
- DAVIS SN, GRANNER DK.** Insulin, oral hypoglycemic agents and the pharmacology of the endocrine pancreas. In : S. Googman L, Gilman AG. (Eds), *The Basic Pharmacology of Therapeutics*, 6th Ed Mc Milan, New York, 1996.
- FANG XK, GAO Y, YANG HY, LANG SM, WANG QJ, YU BY, ZHU DN.** Alleviating effects of active fraction of *Euonymus alatus* abundant in flavonoids on diabetic mice. *Am J Chin Med.* 2008 ; 36 (1) : 125-140.
- RAGUNATHAN V, SULOCHANA N.A.** New flavonol bioside from the flower of *Hibiscus vitifolius* Linn. and its hypoglycaemic activity. *J Indian Chem Soc.* 1994 ; 71 ; 705-706.