

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de biologie physico-chimique
Spécialité : Pharmacotoxicologie



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Effet des extraits de *Fraxinus angustifolia* et
Clematis flammula sur la lipase pancréatique**

Présenté par :

AZZEM CELIA & BENHELLAL SAMIA

Soutenu le : **21 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Mme	BAZIZI-CHAHER. N	MCB	Examinatrice
Melle	MOULAOU. K	MCB	Promotrice
Melle	REMILA. S	MCB	Présidente

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciements

On tient en premiers lieux à remercier le bon dieu le tout puissant de nous avoir procuré la santé et la volonté d'entamer et de mener ce mémoire jusqu'à sa fin.

On réitère nos plus vifs remerciements anticipés au membre du jury Madame N.Chaher et Mademoiselle S.Remila pour leur présence, sympathie, encouragement, conseils et gentillesse. Merci chères dames d'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie de notre jury de soutenance.

Nous adressons nos profondes reconnaissances et nos chaleureux remerciements à notre promotrice Mademoiselle «Moulaoui Kenza» d'avoir accepté de nous encadrer ainsi que Monsieur « zaidi adlane » co-promoteur pour leurs conseils et toute la confiance qu'ils nous ont témoigné.

Nos sincères remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont aidés et soutenu de près ou de loin principalement à tous l'effectif du « Laboratoire Génétique de l'Université de Bejaia » en particulier Madame D.Atmani, N.Debbache, F. Yous et Monsieur G.Aissat qui ont contribué au succès de notre stage. Nous avons eu le privilège de travailler parmi votre équipe et d'apprécier vos qualités et vos valeurs. Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir nous ont énormément marqués. Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération.

On remercie aussi toute l'équipe de la bibliothèque de Science Naturel et de la vie de l'université de Bejaia qui nous ont toujours réservé le meilleur accueil et font en sorte de mettre à notre disposition l'ensemble des ouvrages souhaités. Votre gentillesse mérite toute admiration. Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer tout notre respect.



*Aujourd'hui, ici rassemblés auprès des jurys, Nous prions dieu que
cette soutenance Fera signe de persévérance Et que nous serions enchantés
Par notre travail honoré*



Je dédie ce travail à

*Mes chers parents FARID et NADRA, honorable, aimable : vous
représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de
tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de
prier pour moi. Votre prière et votre bénédiction m'ont été d'un grand
secours pour mener à bien mes études.*

*Ma petite sœur adoré MELISSA et mon adorable frère IAUDAS, je vous
aime fort et je vous souhaite le bonheur et la réussite durant toute la vie*

*Mes chers grands parents paternelle et maternelle que dieu vous garde
prêt de nous, et vous procure la santé et la langue vie.*

Toutes mes tentes et oncles leurs maris et femmes, je vous adore tous.

*Mes chers cousins et cousines leurs époux et épouses je vous souhaite que
du bonheur et la joie, NANI, BOMBINO, DADI, MOHAMED et beaucoup
du courage pour YASSOU et LOUSSINA pour leur soutenance
prochainement ainsi pour SARA et YASMINE Je vous souhaite mes chères
une bonne grossesse et beaucoup de courage.*

*Mes chères copines je vous adore tous, en particulier RYM copine et sœur
que dieu vous protège et nous laisse toujours réuni*

*Mon cher binôme BENHALLALE SAMIA et toute sa famille ainsi que
tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible,
je vous dis merci.*

AZZEM CELIA



Je dédie ce modeste travail :

Au plus respectueux des pères, mon cher papa mouloud.

*A la meilleure mère du monde, ma confidente, ma chère
maman Malika.*

A mes très cher frères daoud et baderddine pour leurs aide

Durant ces années.

A ma très chère et unique sœur Yasmîna.

A ma famille et tous cousins et cousines.

A ma cher binôme : Celia.

Ainsi qu'à tous mes amies et camarades.

Samia.

Liste des abréviations

OMS : Organisation mondiale de la santé.

IMC : Indice de masse corporelle.

F. angustifolia : *Fraxinus angustifolia*.

C. flammula : *Clematis flammula*.

EAG : Equivalent acide gallique.

EQ : Equivalent de quercétine.

EAT : Equivalent acide tanique.

Rd (%) : Rendement exprimé en pourcentage.

P : Poids en gramme de l'extrait sec après extraction.

P₀ : Poids de la poudre avant extraction.

Liste des figures

Figure 1 : Classification des lipides	02
Figure 2 : Isomérisation des acylglycérols et action de la lipase linguale.....	03
Figure 3 : Principaux sels biliaires	04
Figure 4 : Structure de la lipase pancréatique	04
Figure 5: Mode d'action de la lipase dans la dégradation des triglycérides	05
Figure 6 : Action de la phospholipase A2	05
Figure 7 : Formation d'une micelle.....	06
Figure 8 : Absorption des lipides	06
Figure 9 : Schéma récapitulatif de la voie de Kennedy et la voie de Clark et Hubscher.....	07
Figure 10 : Structure d'un noyau phénol	09
Figure 11 : Classification des composés phénoliques	09
Figure 12 : Structures d'un flavonoïde	10
Figure 13 : Structure des différentes classes de flavonoïdes	10
Figure 14 : Structure et classification des tannins	11
Figure 15: Feuilles et fleurs de <i>Clematis flammula</i> (targaouzemmour).....	12
Figure 16 : Photographie correspondants aux différents constituants de <i>Fraxinus angustifolia</i> « a : fruit, b : feuilles ; c : écorce ».....	14
Figure 17: Fine poudre homogène de <i>Fraxinus</i> et <i>Clematis</i>	16
Figure 18 : L'élevage des souris	16
Figure 19 : Schéma de l'extraction éthanolique de la poudre des feuilles de <i>Clematis flammula</i> et <i>Fraxinus angostifolia</i>	18
Figure 20 : Protocole de dosage des phénols totaux.....	19
Figure 21 : Protocole de dosage des flavonoïdes.....	20
Figure 22 : Protocole de dosage des tanins.....	21
Figure 23 : Différentes étapes de l'obtention de la solution d'enzyme.....	23
Figure 24 : Protocol de preparation et d'incubation des émulsions.....	24
Figure 25 : Teneurs en phénols totaux des extraits éthanolique des feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i> et de <i>Clematis flammula</i>	25
Figure 26 : Teneurs en flavonoides des extraits éthanolique des feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i> et de <i>Clematis flammula</i>	26

Figure 27: Teneurs en Tanins des extraits éthanolique des feuilles de *Fraxinus angustifolia* et de *Clematis flammula*27

Figure 28: Représentation graphique du pourcentage d'activité de la lipase pancréatique...28

Liste des tableaux

Tableau I : Classification taxonomique de *Clematis flammula*.....13

Tableau II : Classification taxonomique de *Fraxinus angustifolia*.....14

SOMMAIRE

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	01

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. La physiologie des lipides.....	02
I.1.1. Le métabolisme des lipides.....	02
1.1.1.1 La digestion pré-intestinale des lipides.....	03
I.1.1.2 La digestion intestinale des lipides.....	03
I.2. La physiopathologie des lipides.....	07
I.2.1. L'obésité.....	07
I.2.1.1 La prévalence.....	07
I.2.1.2 L'indice de masse corporelle.....	08
I.2.2 Les causes de l'obésité.....	08
I.2.3 Les conséquences de l'obésité.....	08
I.2.4 Lipides et obésités.....	08
I.3. Les composés phénoliques.....	09
I.3.1 Classification.....	09
I.3.1.1 Les flavonoïdes.....	10
I.3.1.2 Les tanins.....	10
I.4 Mécanisme d'action des composés phénoliques.....	11

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1 Matériels.....	12
II.1.1 Matériel végétal.....	12
II.1.1.1 La description du matériel végétal.....	12
II.1.1.1 <i>Clematis flammula</i>	12
II.1.1.1 <i>Fraxinus angustifolia</i>	14
II.1.1.2 Préparation des extraits.....	15
II.1.3 Le matériel animal.....	16

SOMMAIRE

II.2 Méthodes.....	17
II.2.1 Extraction.....	17
II.2.2 Le dosage.....	19
II.2.3 L'extraction de la lipase pancréatique de souris.....	22
II.2.4 .Mesure de l'effet de la lipase pancréatique en présence et en absence de l'extrait éthanolique de <i>Fraxinus angustifolia</i> et <i>Clematis flammula</i>	23
<i>Chapitre III : Résultats et discussions</i>	
III.1 Le dosage.....	25
III.1.1 Dosage des phénols totaux.....	25
III.1.1 Dosage des flavonoïdes.....	26
III.1.3 Dosage des tanins.....	27
III.2 Evaluation de l'activité et l'inhibition de la lipase pancréatique par les extraits ethanoliques des feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i> et <i>Clematis flammula</i>	28
Conclusion.....	30
Références bibliographiques.....	31
Annexes	
Glossaire	

Introduction



INTRODUCTION

Depuis l'antiquité, les maladies liées au métabolisme des lipides touchent une grande partie de l'humanité. De nos jours le développement culturel, les avancées socio-économiques entraînent des modifications des habitudes de vie quotidienne et des comportements traduits par une consommation plus importante en matières caloriques, nouveaux régimes alimentaires et physiques (Dramane et *al.*, 2017).

L'obésité est due à un déséquilibre de longue durée entre l'apport nutritionnel et le niveau d'activité physique, il se manifeste par le stockage de l'excès de la masse grasse dans les adipocytes ayant des conséquences néfastes sur la santé des populations il reste l'un des défis majeurs du 20^{ème} siècle en raison de sa progression rapide au niveau mondial et les facteurs de risques qui lui sont généralement associés tel que : le diabète de type 2, l'atteintes vasculaires, l'hypertension, et les maladies neuro-dégénératives (Vanhoutte, 2013 ; Besnard, 2015 ; Faucher et *al.*, 2016).

La phytothérapie est la science des métabolites secondaires des végétaux et des plantes médicinales, ces dernières sont considérées comme étant des réservoirs de nouveaux médicaments et la source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (Maurice, 1997).

Fraxines angustifolia et *Clematis flammula* sont des plantes médicinales très abondantes dans la région nord-africaine et largement utilisées en Algérie. Ces deux espèces occupent une place importante dans la recherche scientifique contribuant à la découverte de nouvelles molécules actives, elles sont connues pour être riches en polyphénols, particulièrement les flavonoïdes et tanins (Bruneton, 1999 ; Chawla et *al.*, 2012 ; Ayouni et *al.*, 2016).

Cette thématique a pour objectif d'évaluer le potentiel thérapeutique des deux espèces utilisées traditionnellement pour le traitement de l'obésité et de démontrer le pouvoir inhibiteur de nos extraits éthanoliques sur la lipase pancréatique.

Synthèse

Bibliographique



I.1. Physiologie des lipides

Les lipides sont des molécules biologiques indispensables pour l'organisme, représentent environ 20% de son poids, solubles dans des solvants organiques apolaires tels que le chloroforme, l'éther et le toluène (Olivier, 2002 ; Touitou, 2005).

Les lipides sont très divers (**Figure1**), caractérisés par la présence d'au moins un acide gras dans leurs structure de base, ce sont des molécules de réserves (triglycérides), précurseur (stéroïdes, vitamines, prostaglandines) et structurales (phospholipides) (Touitou, 2005).

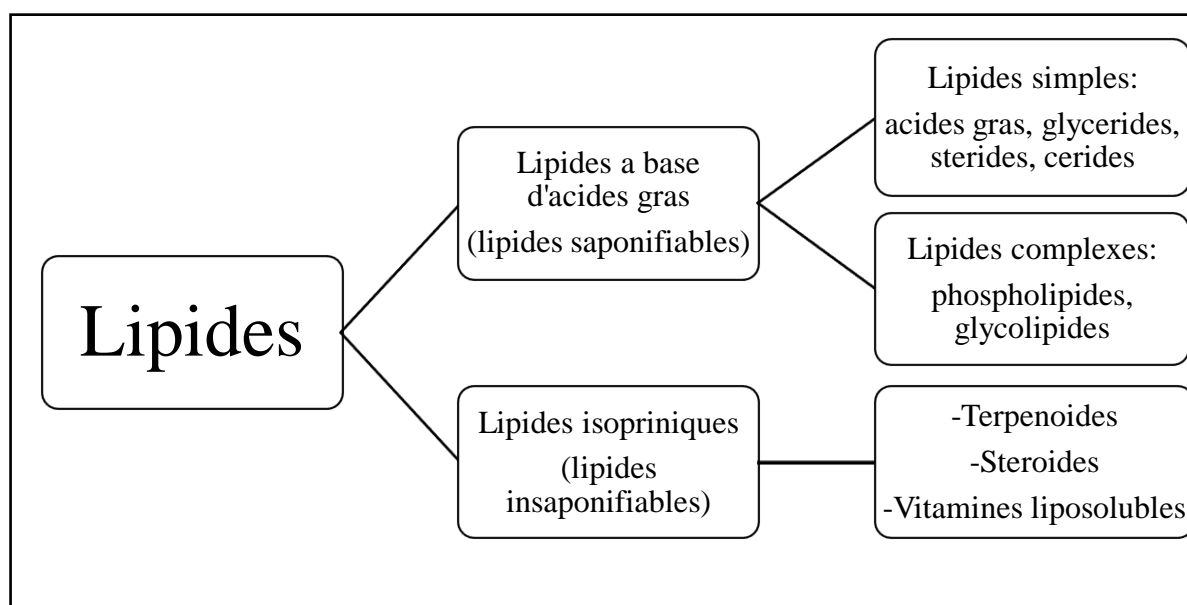


Figure 1 : Classification des lipides (Jacques, 2009).

I.1.1. Le métabolisme des lipides

Les lipides alimentaires sont des molécules complexes difficilement absorbables par les entérocytes, qu'après leur dégradation en acides gras libres tel que : les monoglycérides, le cholestérol et les vitamines liposolubles (Ferran, 2011).

Ces macromolécules ne sont pas solubles dans la muqueuse intestinale, afin d'y arriver, ces molécules doivent passer par différentes étapes : l'émulsification, l'hydrolyse, la formation de micelles et l'absorption par diffusion du contenu micellaire, avec l'intervention d'une cascade enzymatique (les lipases, les colipases, les cholestérols estérases et les phospholipase (A₂) et un groupe de sels biliaries. (Raisonnier, 2004 ; Ferran, 2011 ; Bruckert et Wilfried, 2018)

I.1.1.1. La digestion pré-intestinal des lipides

L'hydrolyse primaire des lipides alimentaires se fait au niveau stomacal ; sous l'action de la lipase linguale, cette dernière est produite au niveau de la partie latéro-postérieure de la langue, agissant ainsi sur des acides gras en position 3 du triacylglycérol (Bouquelet, 2008).

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Environ 30% de la digestion des graisses se fait dans l'estomac ; les pepsines et les protéases du suc gastrique provoquent l'hydrolyse des triglycérides à court et moyenne chaîne (Jacques, 2009).

L'acidité stomacale provoque une isomérisation des acylglycérols et une augmentation de l'activité de la lipase linguale ; les mono et les diacylglycérols contribuent à la formation des acides gras libres et du glycérol comme finalité de ce phénomène réactionnel (**Figure 2**) (Bouquelet, 2008).

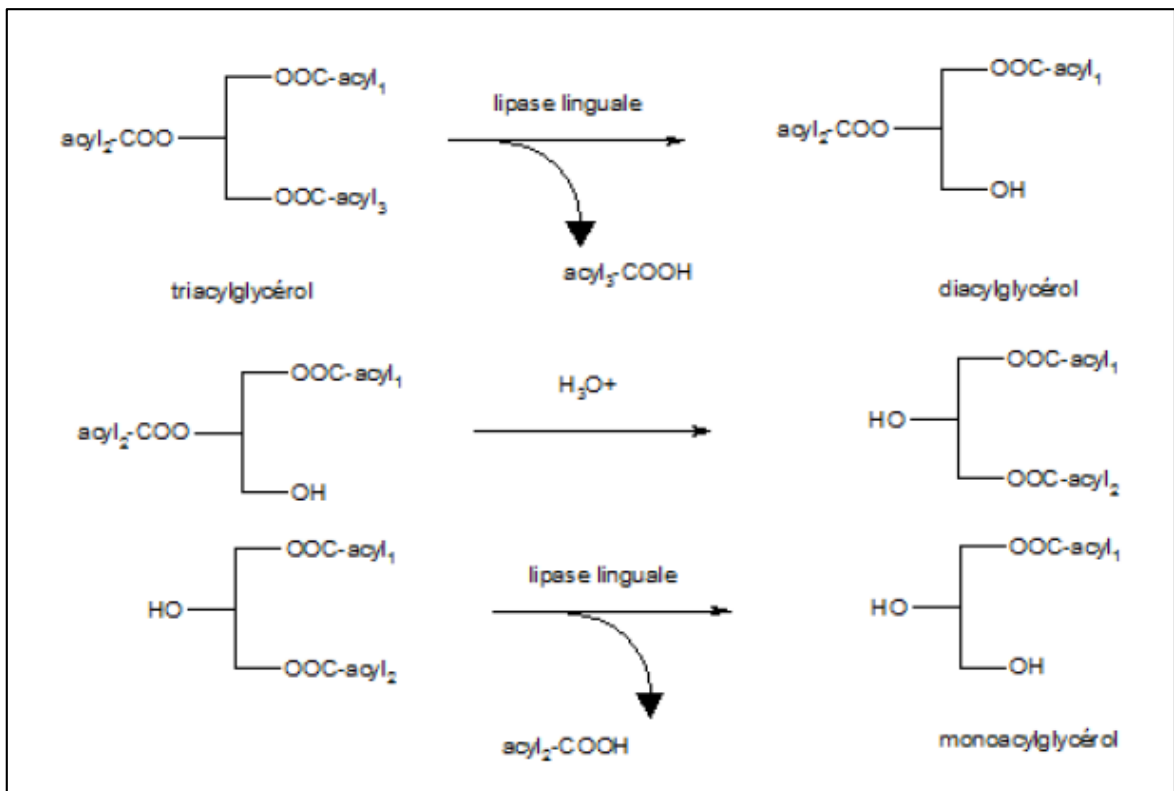


Figure 2 : Isomérisation des acylglycérols et action de la lipase linguale (Bouquelet, 2008).

I.1.1.2. La digestion intestinal des lipides

➤ L'émulsifiations

Les sels biliaires sont des produits de l'oxydation du cholestérol au niveau du foie. La conjugaison leur confère un caractère amphiphile avec un domaine hydrophile (acide aminé conjugué) et un domaine lipophile (cholestérol) (**Figure 3**). Ces derniers sont dotés de la capacité dispersante des lipides dans la muqueuse intestinale, jouant le rôle d'émulsifiant.

L'émulsion stable obtenue rend les lipides accessibles à la lipase pancréatique (Raisonnier, 2004 ; Ferran, 2011).

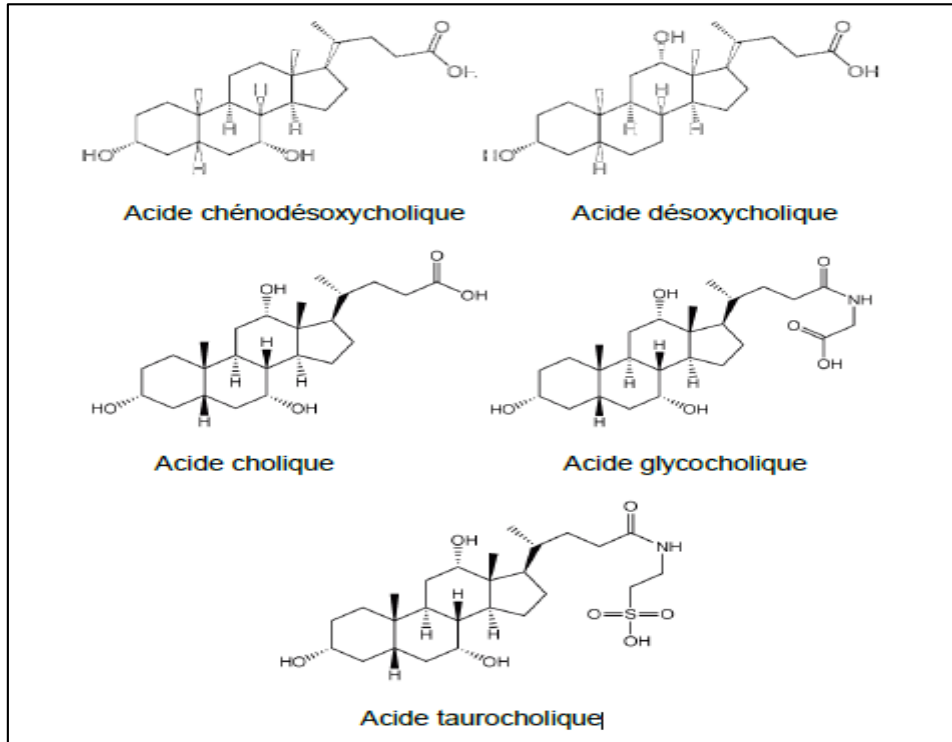


Figure 3 : Principaux sels biliaires (Raisonnier, 2004).

➤ La digestion enzymatique

Le tri-glycérol hydrolase principalement synthétisée par le pancréas, joue un rôle fondamental dans l'hydrolyse des triglycérides (John, 1995 ; Patric *et al.*, 2007).

La lipase pancréatique mature est d'un poids de 53.4 kDa, et à double domaine, amino-terminal globulaire (N-terminal), comprend le site catalytique, le second carboxy-terminal (C-terminal) spécifique à la colipase. (John, 1995 ; Lowe M, 2002). (**Figure4**).

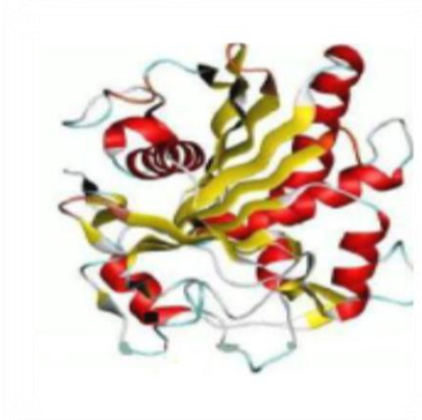


Figure 4 : Structure de la lipase pancréatique (Nahal, 2017).

L'activité enzymatique est optimale à un pH alcalin varié entre 6,5 et 7,5. L'ion bicarbonate sécrété par cet organe neutralise l'acidité gastrique qui favorise le fonctionnement

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

de l'enzyme à ce niveau. Le cofacteur enzymatique (colipase) capte les produits de la réaction enzymatique (les acides gras), puis ces molécules seraient maintenues dans des particules qui se transforment en micelles d'acides gras. En absence de la colipase, l'enzyme serait inhibée par les acides gras libérés et par les sels biliaires de l'émulsion (Bouquelet, 2008 ; Louis et Frédéric, 2010). (**Figure 5**)

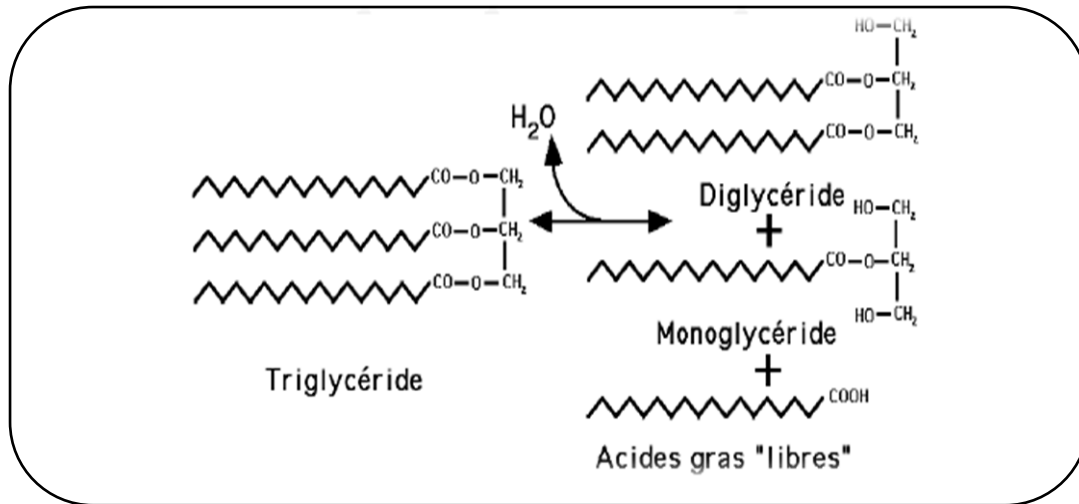


Figure 5: Mode d'action de la lipase dans la dégradation des triglycérides (Raisonnier, 2004).

La cholestérol-estérase et la phospholipase A₂ sont des enzymes intervenant en 2^{ème} degré dans le métabolisme des triglycérides. La première produit des acides gras en hydrolysant les esters de cholestérol, les vitamines (A, D, E) et les glycérides, ainsi par la liaison de trois triglycérides. La deuxième est activée par la trypsine, en provoquant l'hydrolyse des phospholipides (**figure 6**), pour libérer les acides gras et le lysophospholipide, ces deux réactions enzymatiques dépendantes de la présence des sels biliaires (Raisonnier, 2004).

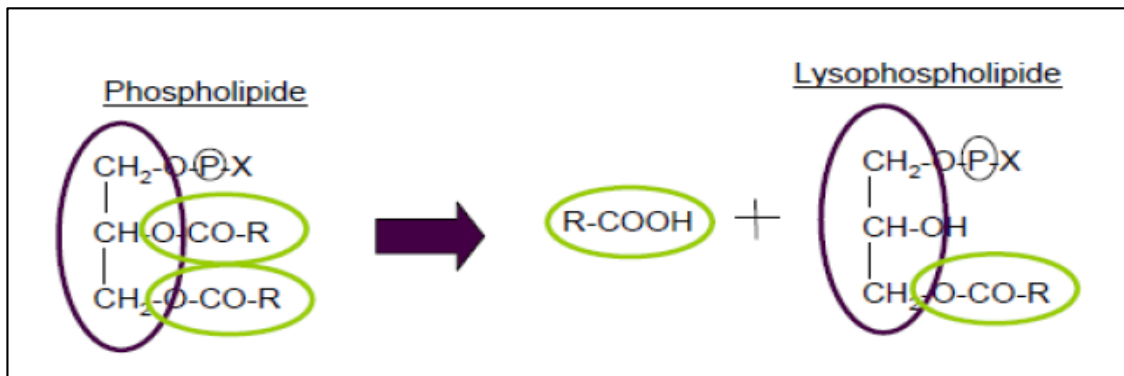


Figure 6 : Action de la phospholipase A₂ (Ferran, 2011)

➤ La formation des micelles

Les micelles sont des complexes hydrosolubles (4 à 6 nm), ils se forment entre les sels biliaires et les produits obtenus de l'hydrolyse des lipides. C'est la phase de la solubilisation des lipides (**Figure 7**) (Moncet, 2017).

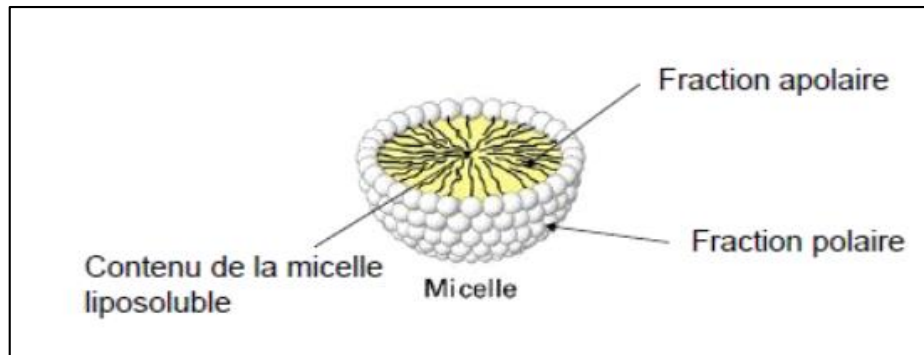


Figure 7 : Formation d'une micelle (Ferran, 2011)

Après l'absorption des acides gras, les sels biliaires des micelles seront rejetés dans la lumière intestinale. Ces derniers sont ainsi réabsorbés pour un recyclage dans l'iléon (troisième partie constitutive de l'intestin grêle) ou bien ils participent à la formation de nouvelles micelles (**Figure 8**) (Raisonnier, 2004 ; Ferran, 2011).

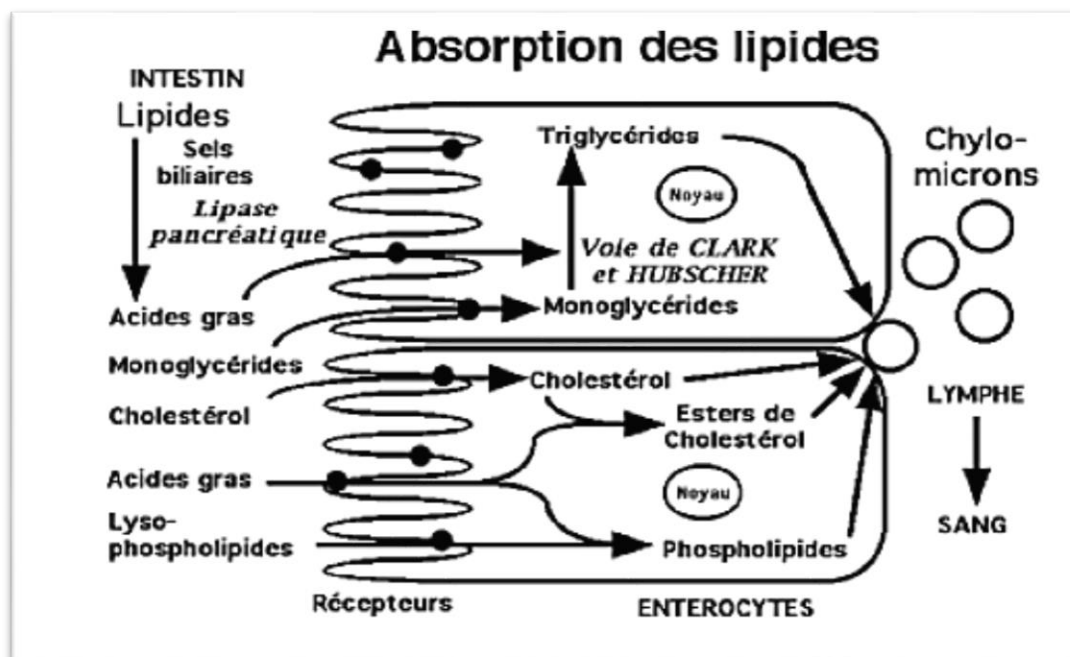


Figure 8 : Absorption des lipides (Raisonnier, 2004).

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Au niveau des entérocytes, les lipides absorbés seront re-synthétisés par la voie de KENNEDY pour les phospholipides à partir des glycérophosphates sous l'action de la glycérophosphate acyl-transférase. La voie de CLARK et HUBSCHER qui fait intervenir une monoglycérideacyl-transférase afin de synthétiser des triglycérides à partir de monoglycéride (Raisonnier, 2004 ; Ferran, 2011) (**Figure 9**).

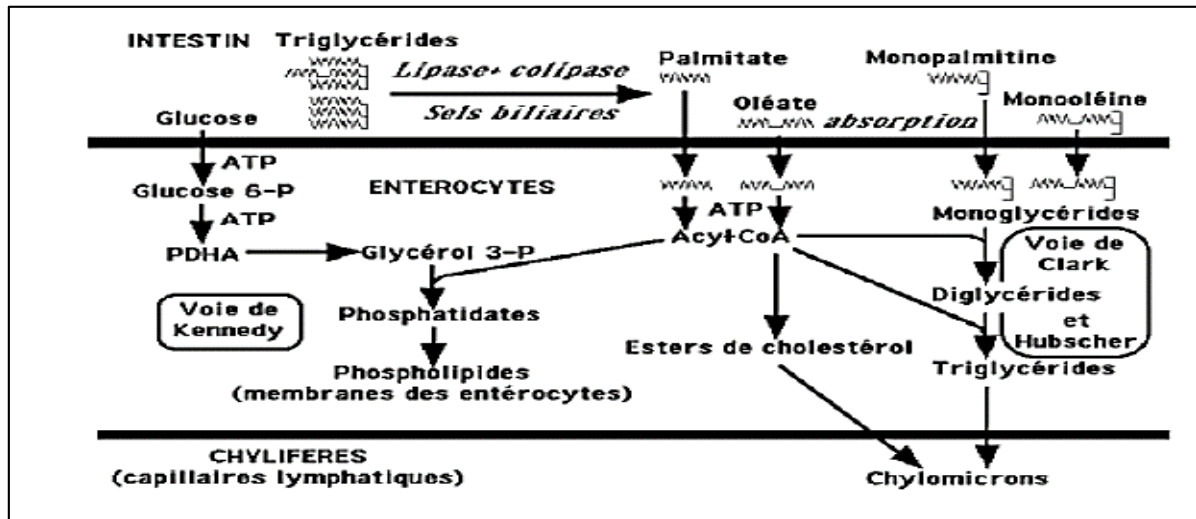


Figure 9 : Schéma récapitulatif de la voie de Kennedy et la voie de Clark et Hubscher. (Raisonnier, 2004).

I.2. La physiopathologie des lipides

I.2.1. L'obésité

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), l'obésité se définit comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle, ce qui représente un risque pour la santé. Elle est reconnue depuis 1997 comme une maladie en raison de ses répercussions sanitaires et économiques, mais aussi de son incidence mondiale. La principale cause de l'obésité est le déséquilibre entre les calories consommées et celles qui sont dépensées. (Audrey et *al.*, 2017).

I.2.1.1. La prévalence

L'obésité est une maladie chronique, son incidence est en croissance depuis 1980. Elle est considérée actuellement comme un problème de santé publique du fait de son augmentation préoccupante au cours des dix dernières années (Pauline et Christine, 2015 ; Audrey et *al.*, 2017).

En 2014, l'OMS dénombrait, parmi la population adulte, plus de 1,9 milliard de personnes en surpoids entre homme, femme et beaucoup plus constater chez ces dernières.

En 2013, le surpoids et l'obésité concernaient environ 42 millions d'enfants de moins de 5 ans (Audrey et *al.*, 2017).

I.2.1.2. L'indice de masse corporelle

L'indice de masse corporelle (IMC) est l'indicateur le plus utile des risques pour la santé associés à un poids excessif et à un poids insuffisant. (OMS. 2014).

$$\text{IMC} = \text{Masse} / \text{Taille}^2$$

Une fois l'indice de masse corporelle calculé, la valeur obtenue est exprimé en kg/m^2 . Il convient toutefois d'interpréter correctement cette valeur. Cette dernière a été classifiée par l'organisation mondiale de la santé (OMS. 2014) (Annexe N°1).

I.2.2. Les cause de l'obésité

La balance énergétique peut devenir positive par l'augmentation des apports alimentaires, mais aussi par diminution de la dépense énergétique totale. La prise alimentaire est un comportement régulé par des mécanismes biologiques complexes qui permettent un apport adapté en nutriments. D'où l'existence des facteurs étiopathogéniques impliqués dans le phénomène de l'obésité, on cite : les facteurs génétiques, héréditaires, physiques et comportementaux. (Bonnamy et Kurtz, 2014 ; Pauline et Christine, 2015 ; Audrey et *al.*, 2017).

I.2.3. Les conséquences de l'obésité

L'obésité est une maladie chronique responsable d'une morbidité et d'une surmortalité, les dégâts qu'elle peut procurer sont nombreux, qu'elles soient physiques et/ou psychologiques. (Jean-Louis, 2010 ; Bonnamy et Kurtz, 2014).

Le diabète de type 2 étant la conséquence majeure de l'obésité qui représente 90% des cas, ainsi que d'autres secondaires entraînant des facteurs de risques multiples on cite : l'arthrose, maladies cardiovasculaires, conséquences psychologiques. (Bonnamy et Kurtz, 2014).

I.2.4. Les lipides et l'obésité

L'obésité est le résultat naturel d'un déséquilibre de la balance énergétique entre les apports et les dépenses énergétiques. Bien que les origines de cette épidémie soient clairement multifactorielles, le bouleversement récent de nos habitudes alimentaires contribue de façon significative à ce phénomène. Les lipides sont des apports alimentaires très riches en graisse, en effet des constatations chez l'Homme ont montré que la surconsommation calorique liée à l'accroissement du pourcentage de lipides de l'alimentation est associée à l'obésité ainsi que d'autres pathologies (Lemonnier, 1967 ; Besnard, 2015).

I.3. Composés phénoliques

Les composés phénoliques (polyphénols) sont des métabolites secondaires, formés d'une complexité d'un ensemble de substances. L'élément structural de base est un noyau benzéique (**Figure 10**) auquel est lié un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction éther, ester et hétéroside. (Bruneton, 1999 ; Boizot N et Charpentier J-P , 2006)

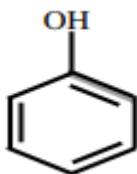


Figure 10 : Structure d'un noyau phénol (Achat, 2013)

I.3.1. Classification

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromagenèse :

-La voie des shikimates (acide shikimique) : elle vise l'obtention des acides cinnamiques et leurs dérivés (acides benzoïque, acétophénone, et lignines, coumarines), en désaminant des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine). (Bruneton, 1999)

-La voie de l'acétate : c'est la cyclisation (réaction de Claisen ou condensation aldolique), des composés polycycliques (chromones, isocoumarines, orcinols, depsides, depsidones, xanthones, quinones) dont le but de formulation des poly- β -cétosters de longueur variable (Bruneton, 1999). (**Figure 11**)

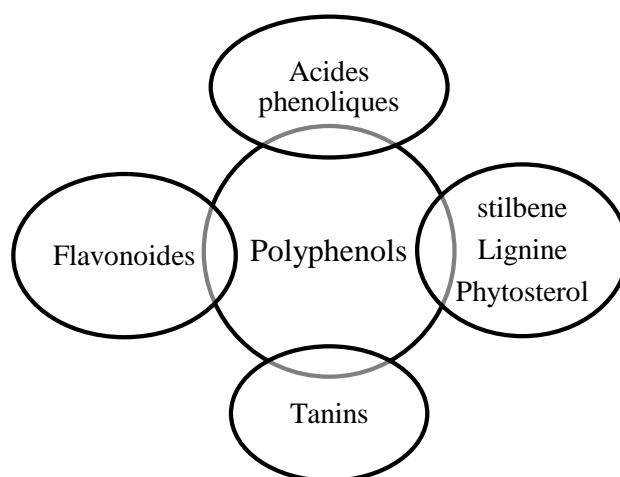


Figure 11: Classification des composés phénoliques (harbona, 1980)

I.3.1.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés très abondants dans le règne végétal, ils font parties de la grande famille des polyphénols. Ces composés phénoliques hautement bioactifs interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défense contre le rayonnement ultraviolet. (Sanda et *al.*, 2012 ; Achat, 2013 ; Ali et *al.*, 2013) (**Figure12**)

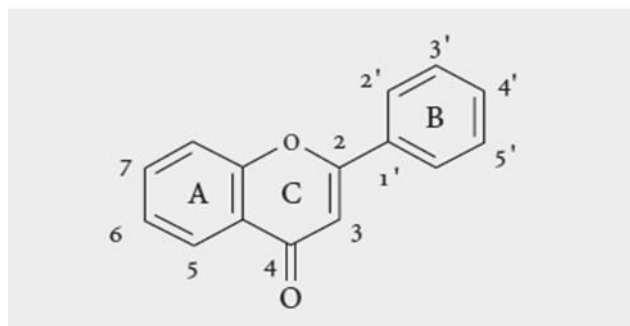


Figure 12 : Structures d'un flavonoïde (Ghedira, 2005)

Les flavonoïdes regroupent 6000 structures, réparties en plusieurs classes (**Figure 13**). Constituées d'un squelette carboné de diphényle propanes, deux cycles benzéniques (A et B) joints par une chaîne linéaire à trois carbones (C6C3C6). (Sanda et *al.*, 2012). (**Figure12**).

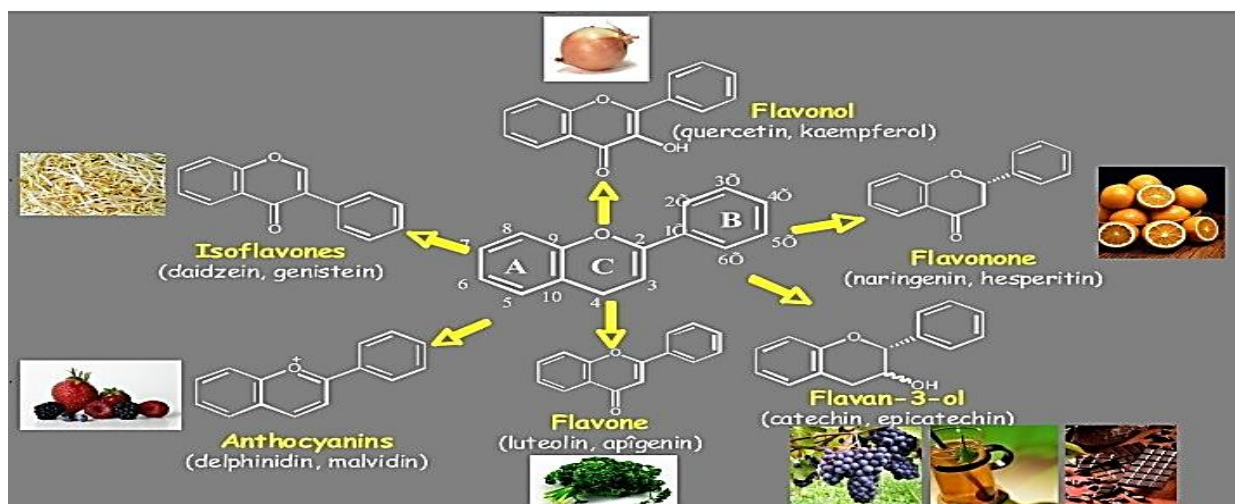


Figure 13 : Structure des différentes classes de flavonoïdes (Stoclet et Schini-Kerth, 2011)

I.3.1.2. Les tanins

Les composés phénoliques complexes ou tanins, classe importante des phénols, caractérisés par leurs propriétés de combinaison aux protéines, dont la capacité à tanner le cuir.

Cette classe importante des polyphénols hydrosolubles est localisée dans les vacuoles avec une masse moléculaire comprises entre 500 et 3000 Da. Les tanins sont diversifiés sur le plan structural en plusieurs sous classe (Achat, 2013 ; Bruneton ; 1999) (**Figure14**)

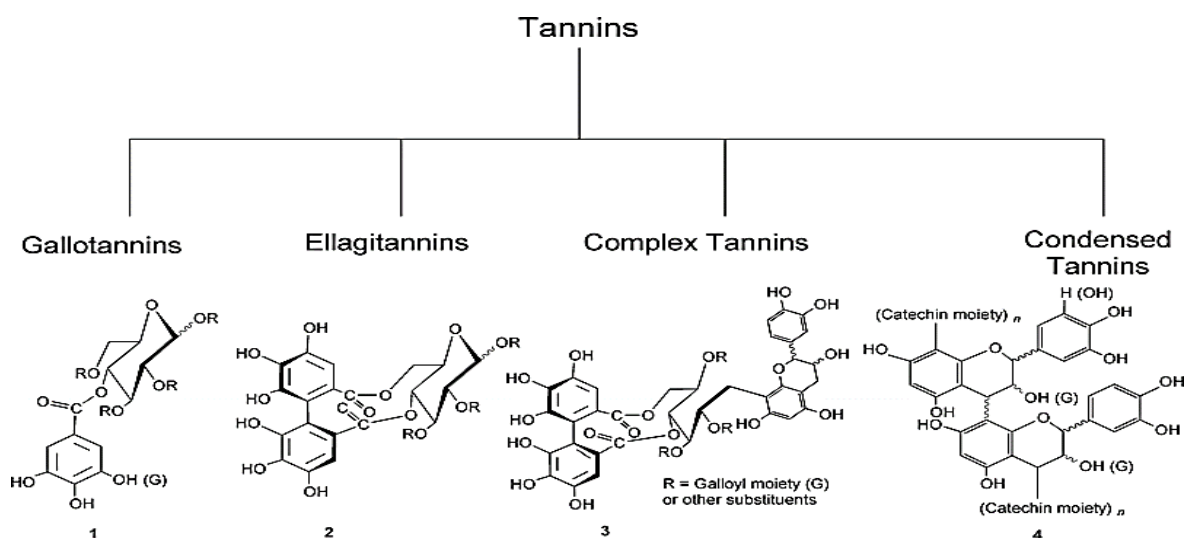


Figure 14 : Structure et classification des tanins (Karamali et Teunis, 2001)

I.3.2. Mécanisme d'action des composés phénoliques

L'obésité est un trouble du métabolisme des lipides qui continue d'être un problème de santé, classé parmi la cinquième cause de décès dans le monde. Elle est considérée comme le résultat d'un déséquilibre de la balance énergétique, entraînant ainsi une série de conséquences majeures (Nitin et *al.*, 2014)

De nos jours le développement de la science, spécifiquement la phytothérapie a poussé nos chercheurs scientifiques à décortiquer les compartiments du règne végétal et découvrir leurs avantages, les molécules bioactives dont les alcaloïdes, les caroténoïdes, glycosides, polysaccharides, les saponines, les trépézoïdes et les polyphénols sont dotés d'activités biologiques diverses et ils occupent une place importante dans le traitement de plusieurs pathologies (Maurice, 1997).

Les composés phénoliques comme métabolites secondaires des végétaux sont doués d'activités biologiques diverses. Ils sont de plus en plus utilisés en thérapie enzymologique comme inhibiteurs, en agissant sur plusieurs classes enzymatiques par un mécanisme compétitif avec leurs cofacteurs enzymatiques ou en provoquant des chélation au niveau du site actif (Enaud et *al.*, 2003 ; Rahaut *et al.*, 2007).

Les flavonoïdes, les tanins et les phénols totaux inhibent la lipase pancréatique en impliquant deux principaux mécanismes. Le premier est compétitif à la colipase, le second chélate les liaisons au niveau du site actif en bloquant la fixation de l'enzyme lui-même (Nitin et *al.*, 2014).

Matériel
Et
Méthodes



II.1. Matériel

II.1.1. Matériel végétal

II.1.1.1. La description du matériel végétal

Notre présent travail est basé sur l'évaluation de l'activité inhibitrice de la lipase pancréatique par des extraits éthanolique de *Clematis flammula* et de *Fraxines angustifolia*.

II.1.1.1. *Clematis flammula*

Le genre *Clematis* est considéré comme une source importante de nouveaux photochimique, il englobe vingt-six espèces dotés d'activités biologiques diverses : anti-inflammatoire, anti-tumorale, anti-bactérienne et anti-cancéreuse (Chawla et al., 2012 ; Saidi et al., 2017).

Clematis flammula ou brulante (**Figure 15**) est une plante méditerranéenne qui croit depuis le Portugal jusqu'en perse, elle est tres abondante en Algerie surtout la Kabylie (Atmani et al., 2011. Tela botanica, 2011). Cette plante est grimpante avec des branches demi herbacé, elle peut atteindre jusqu'à 5m de hauteur. (Rameau et al., 2008. Rousset, 2014)

Clematis a de feuilles ovale ou lancéolées (Telabotanica, 2011), d'une couleur blanche et d'odeur suave (Rousset, 2014), sa fluorisation est en été (Juin Aout) suivi d'une fructification plumeuse à aigrettes qui permet à ses graines d'être transportées par le vent.



Figure 15 : Feuilles et fleurs de *Clematis flammula* (photo originale)

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

- **La classification taxonomique**

Une classification taxonomique de *Clematis flammula* a été récapitulée comme suit :
(Muséum national d'Histoire naturelle 2003-2006)

Tableau 2 : Classification taxonomique de *Clematis flammula* (Tela botanica, 2011)

REGNE	PLANTEA
Embranchement	Magnoliphyta
Classe	Dicotylédone
Ordre	Magnoliopsida
Famille	Rannulculaceae
Genre	<i>Clematis</i>
Espèce	<i>Clematis flammula</i>
Nom vernaculaire berbère	Azenou, Zenzou
Nom vernaculaire arabe	Nard barda, Yasmine Bari, Sebenq

- **Constituants chimiques**

Le genre *Clematis* a un large éventuel de composant tels que les saponines les triterpenes, les flavonoïdes, les lignanes, les coumarines, les alcaloïdes, les acides organique et parmi ceux-ci les saponines destriterpènes qui sont des constituants majoritaires (Chawla et *al.*, 2012) .

- **Les vertus ethnobotaniques et pharmacologies**

Les feuilles de *Clematis flammula* sont largement utilisées dans la médecine traditionnelle par les populations rurales en Algérie (Atmani et *al.*, 2009), elles sont employées pour fournir le soulagement des douleurs (Yesilada et Kupeli, 2007).

Clematis est une source de saponines, ranunculine et ses dérivés, et flavonoïdes glycosylés d'où les systèmes de santé utilisent presque vingt-six espèces de *Clematis* dans le traitement de maladies telles que les troubles nerveux, la syphilis, la goutte, le paludisme, la dysenterie, les rhumatismes, l'asthme, et comme analgésique, anti-inflammatoire, diurétique, anti-tumoral, antibactérien et anticancéreux (Chawla et *al.*, 2012).

Les feuilles de *Clematis* sont également utilisés comme insecticide, leur usage à des doses excessives et une longue durée provoque des brûlures d'où son nom « Clématite brûlante » (Kostova et Iossifova, 2007 ; Atmani et *al.*, 2009).

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1.1.2. *Fraxinus angustifolia*

Fraxinus angustifolia appartient à la famille des Oléacées c'est un arbre méditerranéenne à feuilles caduques de taille moyenne, le frêne à des feuilles étroites ou cendres désertiques et un écorce grise à profondes rides, clairement cannelée et des fruits (samare) de couleur marron, sa floraison est au mois de mai à juin (Ayouni et *al.*, 2016)

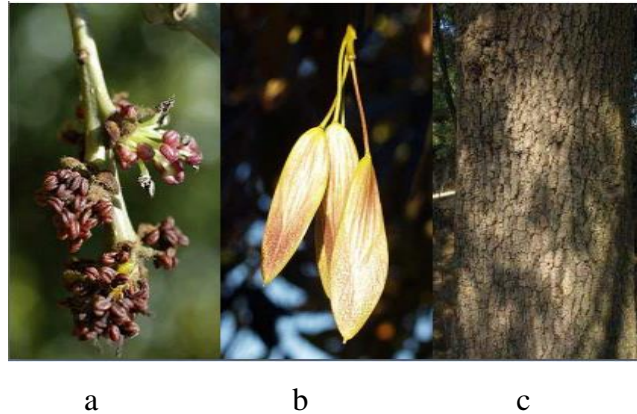


Figure 16 : Photographie correspondantes aux différents constituants de *Fraxinus angustifolia* « a : fruit, b : feuilles ; c : écorce » (original).

- **La classification taxonomique**

Wallander (2008) a placé l'espèce *Fraxinus angustifolia* (Kostova et *al.*, 2007), dans la position systématique suivant :

Tableau 3 : Classification taxonomique de *Fraxinus angustifolia*.

REGNE	PLANTEA
Embranchement	Spermaphytes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Lamiales
Famille	Oléacées
Genre	<i>Fraxinus</i>
Espèce	<i>Fraxinus angustifolia</i>
Nom vernaculaire berbère	Aslen
Nom vernaculaire arabe	Daredare

- **Constituants chimiques**

L'espèce *F. angustifolia* est riche en métabolites secondaires qui jouent un rôle majeure en médecine traditionnelle, leur variété englobe des flavonoïdes (Rutine, Astragalin et Nicotiflorin), coumarines (Esculetin, Esculin, Cichoriin, Scopoletin, Isoscopoletin) et lignans (Pinoresinol, Pinoresinol-4-O- β -D-glucopyranoside, 8-Hydroxypinoresinol-4-O- β -D-glucopyranoside, Fraxiresinol-8-O- β -D-glucopyranoside) et des phénols simples (Kostova et Iossifova, 2007).

- **Les vertus Ethnobotaniques et pharmacologiques**

Fraxinus angustifolia est l'un des arbres les plus répandus dans le nord de l'Algérie est connu par ses utilisations traditionnelles (nourriture pour bétail, source principale de bois de chauffage) (Ayouni et al., 2016).

Les espèces *Fraxinus* ont été utilisées en médecine traditionnelle en raison de leurs propriétés diurétiques, anti-inflammatoires, antioxydantes, hépato-protectrice, antimicrobiennes et antiallergiques. Elles sont utilisées aussi dans le traitement de la constipation, l'arthrite, les douleurs rhumatismales et la stomatite, des maux de dents, de la pyrexie et de l'infection des organes urinaires (Kostova et Iossifova, 2006 ; Moulaoui et al., 2015).

II. 1.2. Préparation des extraits

Les feuilles de *Clematis flammula* et celles de *Fraxinus angustifolia* ont été cueillis en fin mai dans la forêt d'Azru n Bechar de la commune d'Amizour située à l'est de Bejaia. La plante a été identifiée dans le laboratoire de botanique de l'université de Bejaia.

A la fin de la récolte les échantillons ont été séchés à l'air libre, à température ambiante les feuilles ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique et tamiser jusqu'à obtention d'une poudre très fine de 63 μ m.

La fine poudre homogène obtenu a été conservé dans un bocal fermé à 4° C jusqu'à utilisation (**Figure 17**)

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES



La poudre de *Fraxinu angustifolia*



La poudre de *Clematis flamuula*

Figure 17 : Fine poudre homogène de *Fraxinus* et *Clematis*.

II.1.3. Matériel animal :

10 souris swiss albinos adultes prévenant de l'institut pasteur Alger et élevées au niveau de l'animalerie de l'université de Bejaia.

Les souris présentent un poids qui varie entre 20-30g, leurs conditions d'élevages étaient adéquates (lumière (12/12), température à 25°C et humidité relative 65 ± 5 %) ainsi qu'un régime alimentaire standard avec accès libre à l'eau et un entretien de nettoyage (**Figure 18**)



Figure 18 : L'élevage des souris.

II.2 Méthodes

II.2.1. Extraction

L'extraction a été effectuée par l'équipe de laboratoire de génétique. La procédure d'extraction est basée sur le protocole décrit dans l'article d'Atmani et de ces collaborateurs, 2009.

L'extraction éthanolique consiste à dissoudre 100g de poudre des deux plantes *Clematis flammula* et *Fraxinus angustifolia* dans l'éthanol (96 %) avec un rapport de 1:4 (M/V) par le phénomène de macération, sous une agitation pendant 24h, à température ambiante et à l'abri de la lumière.

La solution obtenue a été mise à décanter pendant 12h et le surnageant a été ensuite récupéré. Le culot a été hydrolysé à nouveau dans l'éthanol aux mêmes conditions que la première extraction jusqu'à épuisement.

Les deux surnageants ont été homogénéisés et centrifugés à 1500g pendant 10 min. Le solvant a été ainsi éliminé par évaporation sous pression réduite dans un rotavapeur, permettant ensuite l'obtention de l'extrait éthanolique brut de *Clematis flammula* et *Fraxinus angustifolia* (**Figure19**).

Le taux d'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$\mathbf{Rd\ (\%)\ =\ P/P_0\ \times\ 100}$$

Avec :

- Rd (%) : Rendement exprimé en pourcentage ;
- P : Poids en gramme de l'extrait sec après extraction ;
- P₀ : Poids de la poudre avant extraction

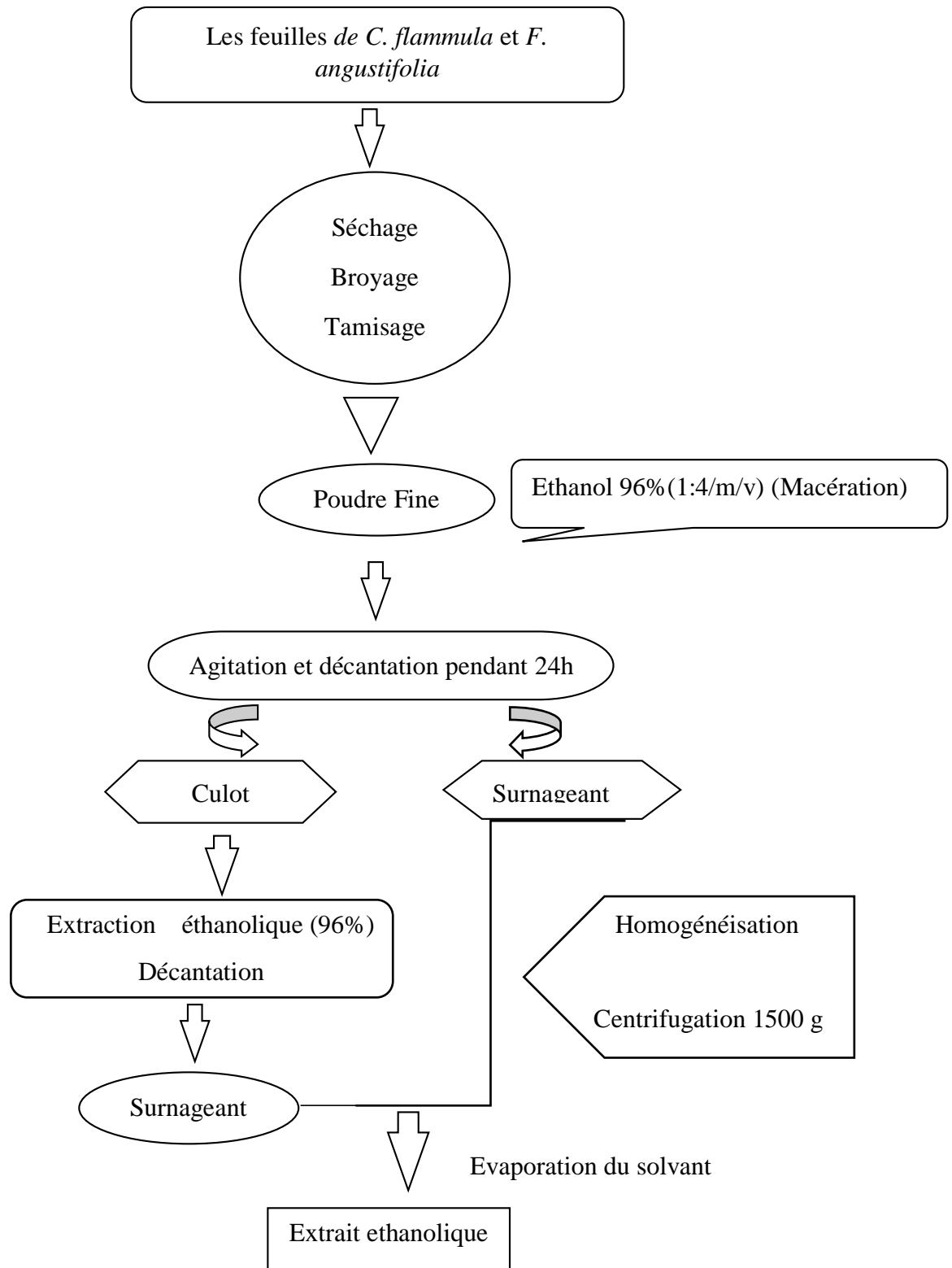


Figure 19 : Schéma de l'extraction éthanolique de la poudre des feuilles de *F. angustifolia* et *C. flammula*.

II.2.2.Dosage

- **Les phénols totaux**

La teneur des extraits éthanolique de *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula* a été déterminé en utilisant le folin ciocalteu comme réactif (Djeridane et *al.*, 2006). Ce mélange d'acide phospho-tungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phospho-molybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) est d'une couleur jaune. Il se réduit lors de l'oxydation des polyphénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}), donnant ainsi une coloration bleu proportionnelle aux taux des composés phénoliques présents dans l'extrait (Lapornik et *al.*, 2005). (**Figure 20**)

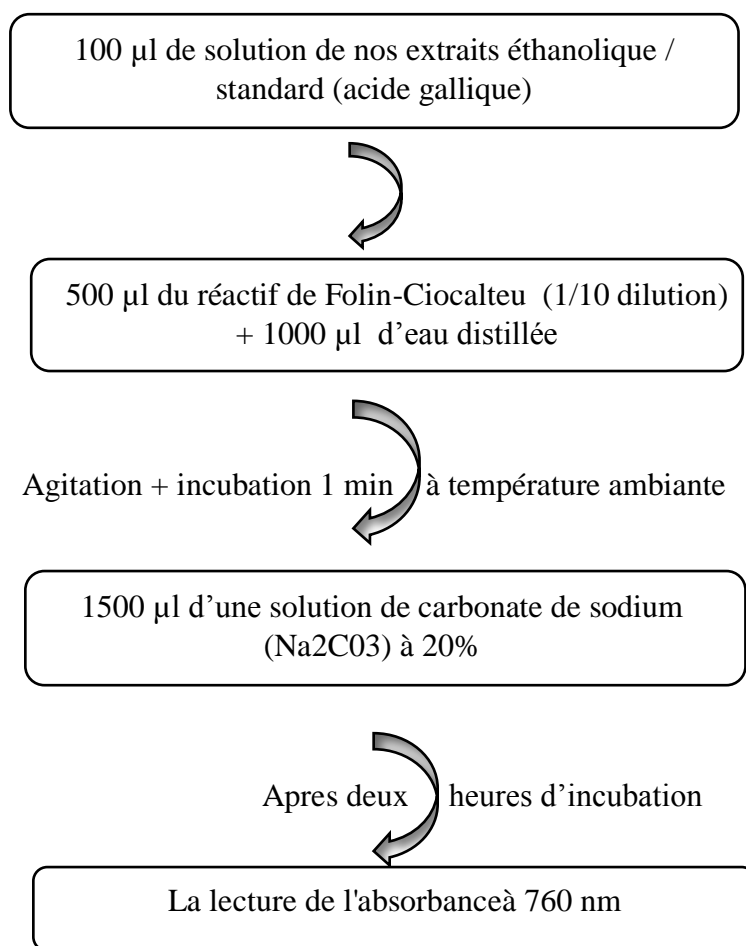


Figure 20 : Protocole de dosage des phénols totaux (Djeridane et al 2006).

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

La teneur en phénols totaux a été calculée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage réalisée avec différentes concentrations d'acide gallique dans les mêmes conditions que le dosage de l'échantillon. La teneur en phénols totaux est exprimée en équivalents milligramme d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/ g d'extrait). (Annexe1).

- **Les flavonoïdes**

Le dosage des flavonoïdes a été effectué suivant la méthode développée par (Maksimović et al., 2004).

Le principe de cette méthode se repose sur l'utilisation du chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) comme réactif. Ce dernier provoque la formation des complexes avec les flavonoïdes donnant ainsi une solution de couleur jaune qui absorbe à 430 nm. (**Figure 21**)

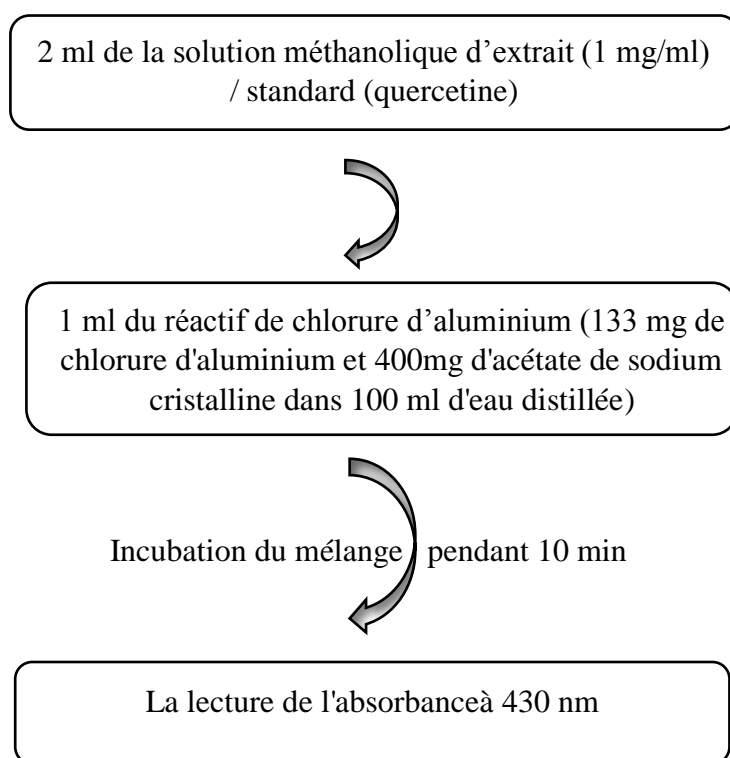


Figure 21 : Protocole de dosage des flavonoïdes (Maksimović et al., 2005).

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant différentes concentration de quercetine, puis le taux des flavonoïdes a été exprimé en milligramme équivalent quercetine par gramme d'extrait (mg EQ/g). (Annexe 2)

- **Les tannins**

La quantité des tannins dans *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula* a été déterminée en utilisant la méthode d'Hagerman et Butler (1978). Cette dernière est basée sur la précipitation des tannins avec une protéine standard BSA. Un complexe fer-phénols coloré se forme qui est déterminée spectrophotométriquement à 510 nm. (**Figure 22**)

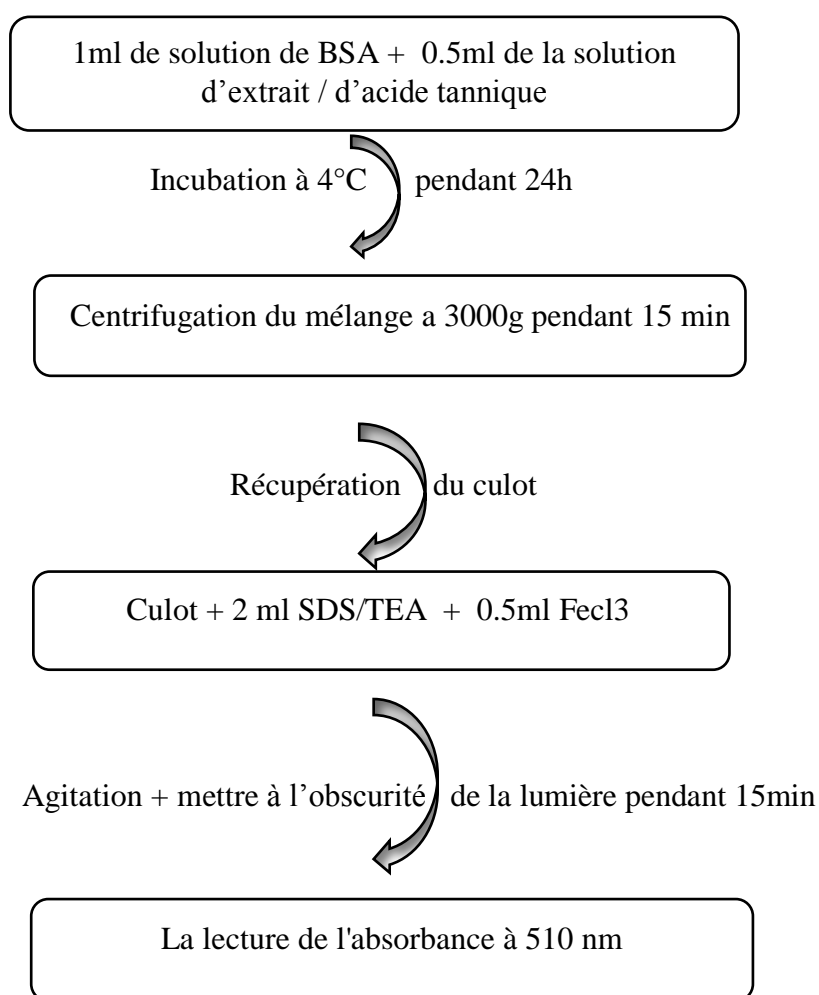


Figure 22 : Protocole de dosage des tannins (Hagerman et Butler, 1978).

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant différentes concentration d'acide tannique, puis la teneur en tannins a été exprimée en milligramme équivalent d'acide tannique par gramme d'extrait (mg EQ/g). (Annexe 3).

II.2.3 L'extraction de la lipase pancréatique de souris

L'extraction et la purification partielle de la lipase pancréatique de souris a été réalisée en se basant sur le protocole de Shahani et ces collaborateurs(1975) avec des modifications appropriées.

10 souris ont été sacrifiées et leurs pancréas ont été fraîchement récoltés, lavés dans l'eau physiologique et placés dans une solution de saccharose (0.01M) à 4°C.

Le mélange a été bien homogénéisé dans la solution de saccharose froide à l'aide d'un polytron, l'homogénat a été répartie sur des tubes eppendorfs puis centrifuger à 15000g pendant 30min à l'aide d'une centrifugeuse réfrigère.

Le surnageant a été précipité au sulfate d'ammonium saturé a 50% (V/V), puis agité et laissé au repos pendant 30min à 4°C ensuite centrifugé à 10000g pendant 30min.

Le culot obtenu a été dissout dans une solution de saccharose (0.01M) et à nouveau saturé avec du sulfate d'ammonium 50% ainsi qu'une centrifugation du mélange a 10000g pendant 30min.

La source d'enzyme a été obtenue après la dissolution du culot final dans un tampon phosphate (**Figure 23**).

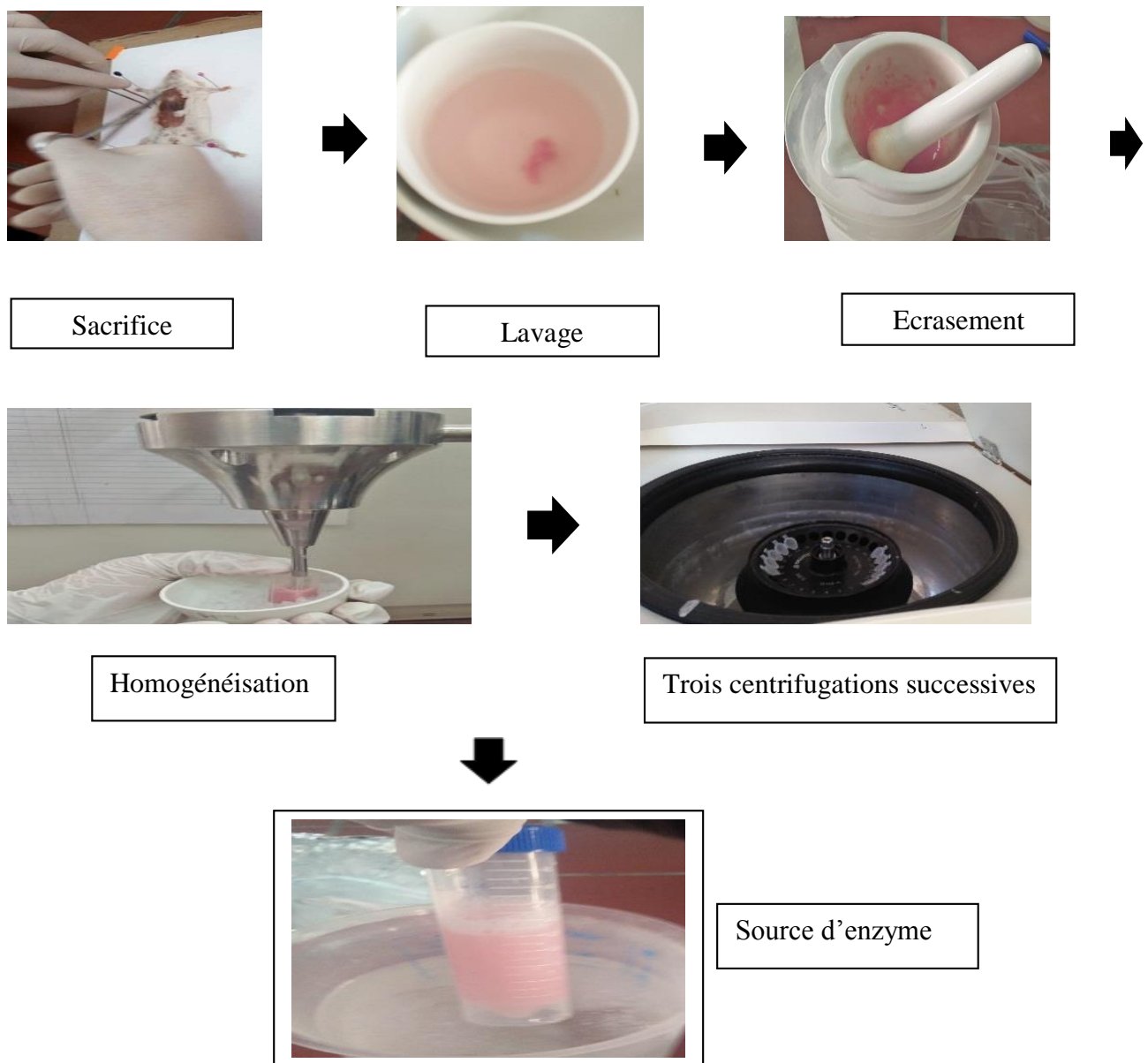


Figure 23 : Differentes étapes de l'obtention de la solution d'enzyme.

II.2.4 Mesure de l'effet inhibiteur de la lipase pancréatique en présence et en absence de l'extrait éthanolique de *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula*

L'effet inhibiteur de la lipase pancréatique a été mesurée selon le protocole de Kumar et ses collaborateurs 2011, en utilisant des extraits éthanolique de *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula*. Ce protocole a été réalisé par titration avec du NaOH (0.02M) et phénol phtaléine (1%) comme indicateur.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

L'activité a été déterminée en incubant un mélange contenant 8ml d'huile d'olive, 0.4 ml de tampon phosphate et 1 ml de la solution contenant la lipase pancréatique, pendant une heure sous agitation. A terme, 1.5 ml d'une solution d'acétone et d'éthanol 95 % (v/v) est ajouté au mélange afin de stopper la réaction, la libération des acides gras a été mesurée par titration. (**Figure24**)

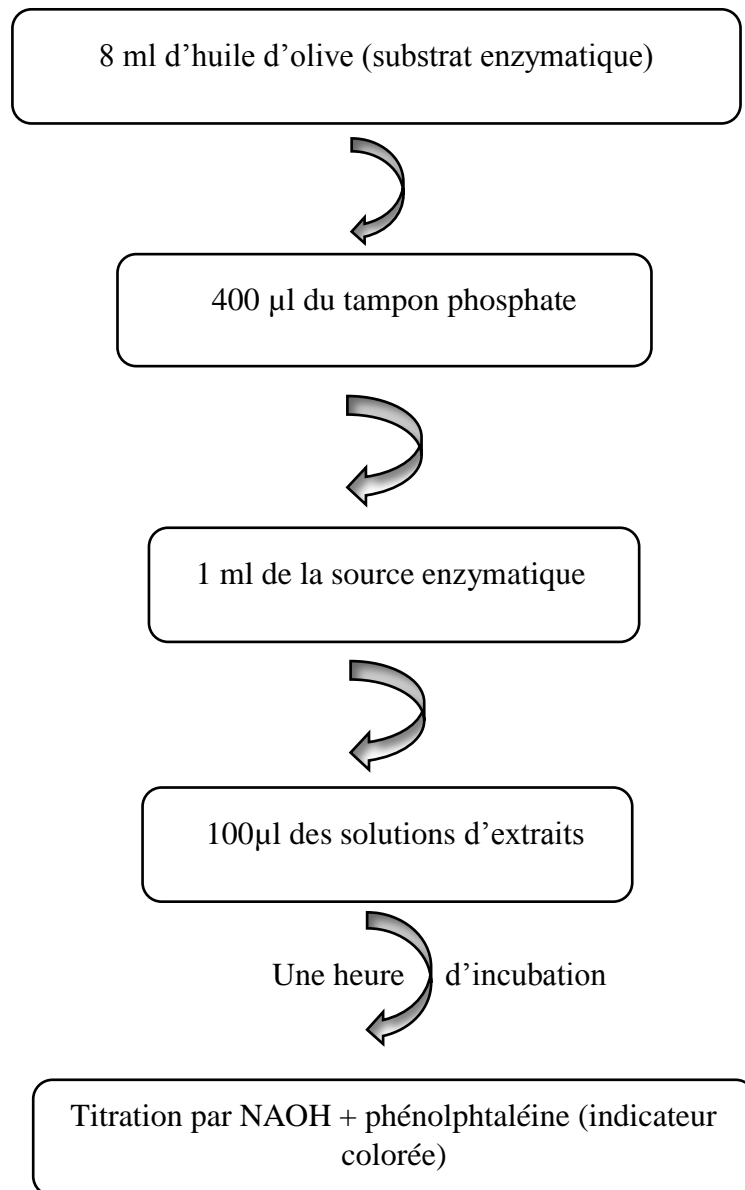


Figure 24 : Protocol de preparation et d'incubation des émulsions

Résultats

Et

Discussion



III.1. Dosage

Dans le but d'une caractérisation des extraits préparés de *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula*, un dosage des phénols totaux, flavonoïdes et des tanins a été effectué.

III.1.1. Dosage des phénols totaux

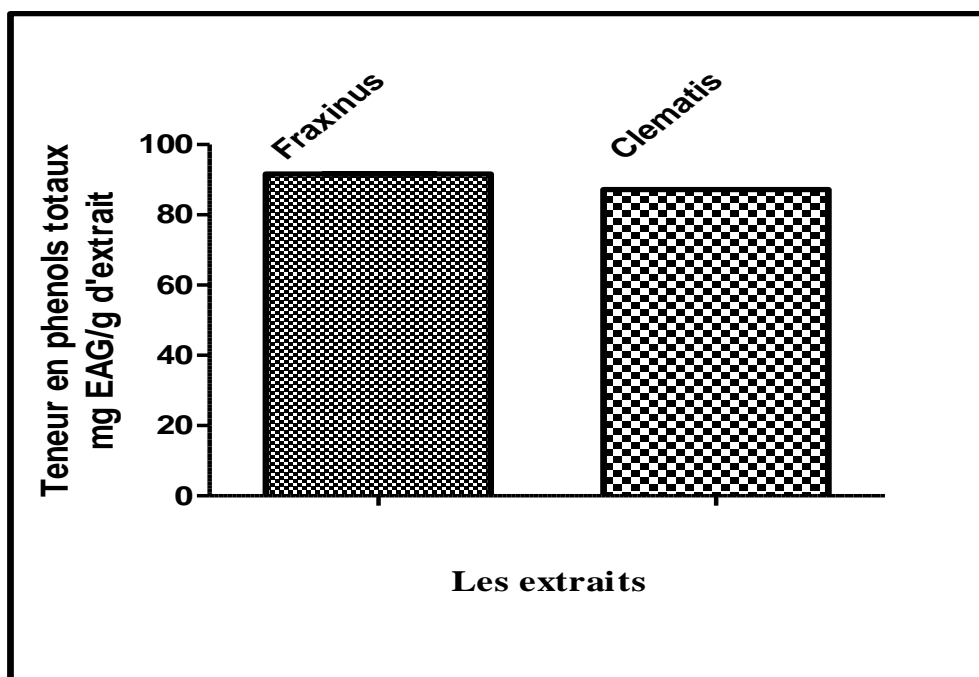


Figure 25 : Teneurs en phénols totaux des extraits éthanolique des feuilles de *Fraxinus angustifolia* et de *Clematis flammula*.

Le taux des phénols totaux de l'extrait éthanolique de *F. angustifolia* et celui *C. flammula* exprimé en mg EAG/g d'extrait, est déterminé à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Annexe N°2).

La quantité en phénols totaux obtenue est de $91,66 \pm 0,0088$ mg EAG/g d'extrait pour *Fraxinus angustifolia* et de $87,22 \pm 0,019$ mg EAG/ g d'extrait pour *Clematis flammula* selon l'analyse statistique une légère différence des teneurs entre les deux plantes. (**Figure 25**).

Ces résultats sont plus élevés que ceux trouvés chez la même espèce de *Fraxinus angustifolia* de Tunisie, dans deux régions différentes (Beja et Nefza) ayant donné $17,55 \pm 1,44$ mg EAG/g d'extrait et $21,86 \pm 1,15$ mg EAG/g d'extrait respectivement (Touhami et al., 2017).

La teneur en phénols totaux de *Clematis flammula* est meilleure à ceux obtenus par Atmani et ses collaborateurs (2009) (19.65 ± 0.361 mg EC/g d'extrait).

La variation des teneurs en phénols totaux entre la même ou différentes espèces due au plusieurs facteurs tels que : les facteurs extrinsèques (tels que les facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques et le degré de maturation de la plante et la durée de stockage (Aganga et Mosase, 2001; Podsedek, 2007; Falleh et *al.*, 2008).

Les extraits de *Fraxinus angustifolia* et de *Clematis flammula* sont riche en phénols totaux comparer aux teneurs en phénols totaux des extraits éthanoliques de *Artemisia herba halba* et *Ruta montana* dont les teneurs sont 13.06 ± 0.40 et 3.13 ± 0.30 mg EAG/g d'extrait respectivement (Djeriddane, 2006).

III.1.2. Dosage des flavonoïdes

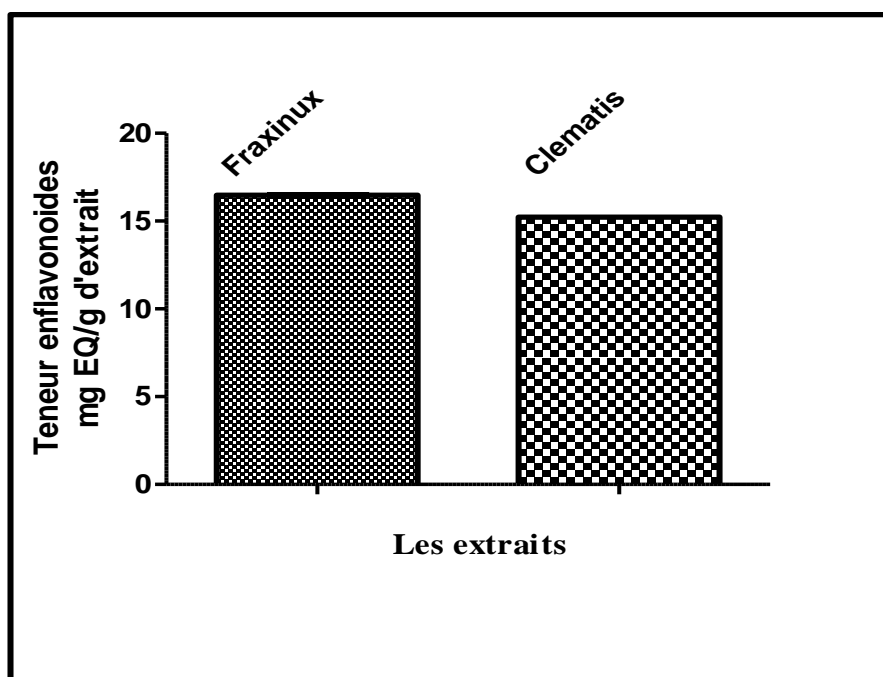


Figure 26 : Teneurs en flavonoïdes des extraits éthanolique des feuilles de *Fraxinus angustifolia* et de *Clematis flammula*.

La teneur en flavonoïdes est calculée à partir de l'équation de la courbe réalisée avec la quercétine et déterminée en mg EQ/g d'extrait (Annexe 3).

La proportion en flavonoïdes des extraits éthanoliques est de $16,47 \pm 0,016$ mg EQ/g d'extrait pour *Fraxinus angustifolia*, est de $15,22 \pm 0,005$ mg EQ/g d'extrait pour *Clematis flammula*. La teneur en flavonoïdes de *F. angustifolia* est similaire à celle de *C. flammula*. (**Figure 26**).

Maksimovic et ses collaborateurs (2005) ont rapporté une teneur de 2.75 ± 21.2 mg EQ/g d'extrait d'extrait de d'une hybride de maïs, suggérant ainsi la richesse des extraits testés en flavonoïdes.

Ces résultats sont meilleur a ceux obtenu par Ali-rached et ses collaborateurs (2018), avec (0,613 mg EQ/g ES) pour l'extrait méthanolique de *Scabiosa Atropurpurea sub Maritima L*, suggérant ainsi la richesse des extraits *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula*.

III.1.3. Dosage des Tanins

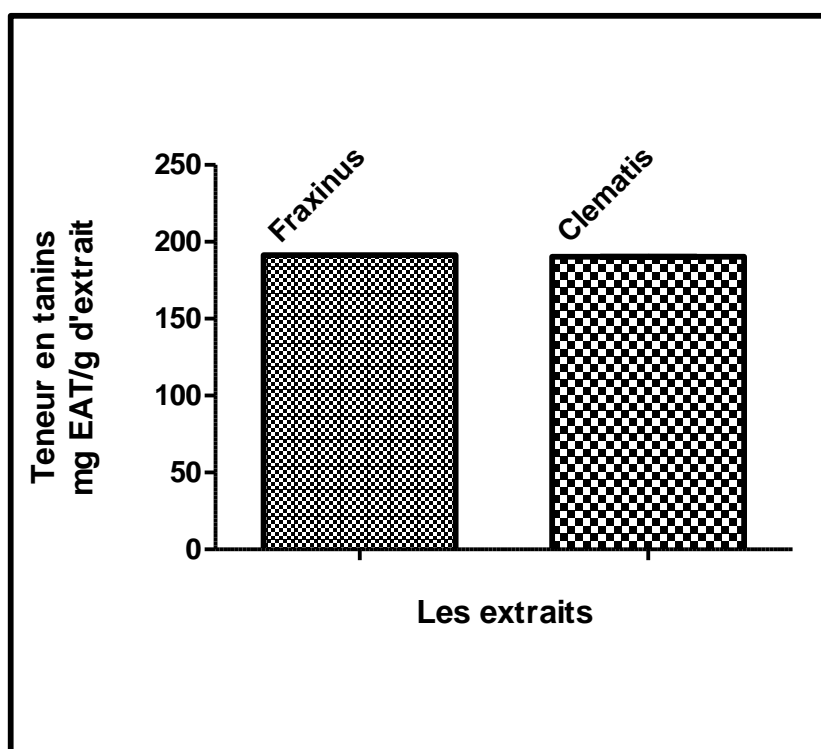


Figure 27 : Teneurs en tanins des extraits éthanolique des feuilles de *Fraxinus angustifolia* et de *Clematis flammula*.

La teneur en tanins est exprimée en mg EAT/g d'extrait déterminé à partir d'une courbe d'étalonnage réalisé par l'acide tannique (Annexe 4).

Les feuilles de *Clematis flammula* et *Fraxinus angustifolia* présentent des teneurs importantes en tanins qui sont de $193,94 \pm 0.072$ mg EAT/g d'extrait et de $122,74 \pm 0.029$ mg EAT/g d'extrait respectivement (**Figure 27**).

Selon le travail réalisé par Touhami et *al.*, 2017 sur la mesure de la teneur en tanins des feuilles de *Fraxinus angustifolia* de la région de Nefza dont la teneur était à $91,41 \pm 3,33$ mg EC/g d'extrait ce qui montre que notre extrait est plus riche en tanins d'où la fiabilité du protocole du dosage et le standard utiliser.

III.2 Evaluation de l'effet inhibiteur de la lipase pancréatique par les extraits éthanoliques des especes de *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula*

L'évaluation de l'activité de la lipase pancréatique a été réalisée en incubant une émulsion d'huile d'olive considérée comme substrat d'enzyme, une solution préparée dans le laboratoire est la source enzymatique et différentes concentration des extraits éthanolique de *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula*. L'histogramme de la (Figure 28) démontre les résultats de l'évaluation.

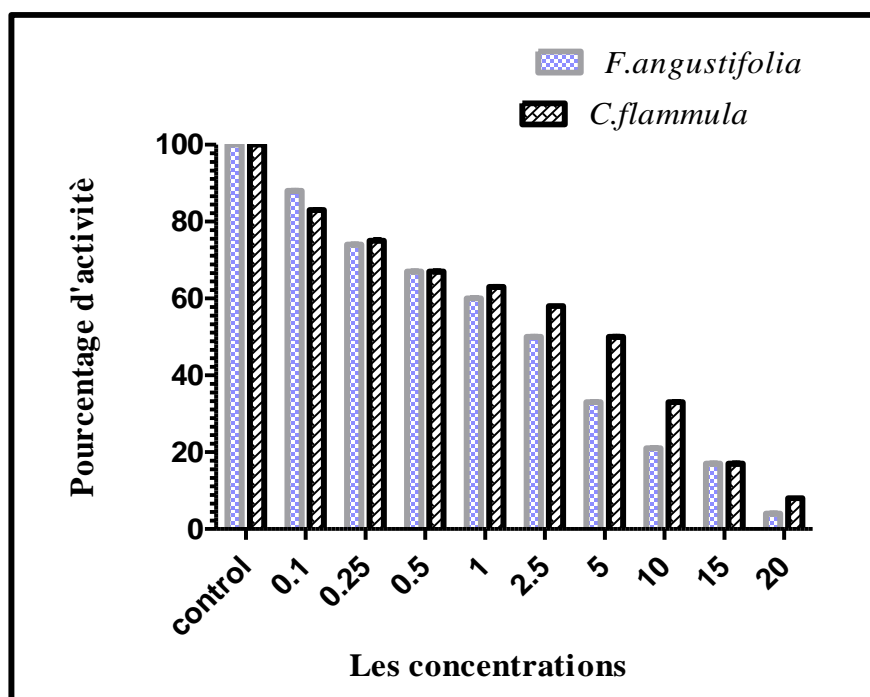


Figure 28: Représentation graphique du pourcentage d'activité de la lipase pancréatique.

On a constaté une activité enzymatique maximale lors de l'incubation sans extrait de plantes, ce qui confirme que notre source d'enzyme est fonctionnelle. Dès l'ajout des différentes concentrations des extraits par un ordre croissant (0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 1.2 ; 5.5 ; 10 ; 15 et 20 mg/ml), une diminution de l'activité enzymatique a été observée jusqu'à 90% à une concentration de 20mg/ml.

L'IC₅₀ (concentration qui inhibe 50% de la lipase pancréatique) est obtenue à partir d'une courbe d'inhibition (**Annexe 5**). Elle est d'une valeur de 2,5 mg/ml pour *Fraxinus angustifolia* et de 5 mg/ml pour *Clematis flammula* ce qui montre que nos extraits éthanoliques présentent un bon pouvoir inhibiteur de la lipase pancréatique.

Le travail présentait par Kumar et ses collaborateurs (2011) sur l'évaluation de l'activité inhibitrice de la lipase pancréatique du poulet par l'extrait méthanolique d'*Everniastrum cirrhatum* (une algue riche en alcaloïdes et en terpènes, et très pauvre en flavonoïdes). Ils ont obtenues une IC₅₀ égal à 12 mg/ml, ce qui est moins important que celui obtenu lors de notre étude. Ces résultats montrent que nos extraits ont une très bonne activité inhibitrice contre la lipase pancréatique.

Différents flavonoïdes inhibent la lipase pancréatique, comme la rutine, la catéchine, la lutéoléine et la quercétine (Cotelle et Queffelec, 2007).

La chromatographie réalisée sur les feuilles de *Fraxinus angustifolia* a montré leur teneur en catéchine et lutéoléine (Medjahed et al., 2016).

L'effet inhibiteur de la lipase pancréatique des extraits de *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula* est due à sa composition en métabolites secondaires.

En effet, il a été démontré que la lutéoléine est capable d'inhiber la lipase pancréatique (Lunagariya et al., 2014)

Une caractérisation de la composition des feuilles de *Clematis flammula* a montré la présence de la rutine et de la quercétine (Chawla et al., 2012) ; l'effet inhibiteur de la lipase pancréatique de *Clematis flammula* est due à sa composition en métabolites secondaires, en effet, il a été démontré que les flavonoïdes comme la quercétine et la rutine exercent un effet inhibiteur la lipase pancréatique (Lunagariya et al., 2014).

Conclusion



CONCLUSION

L'obésité est devenue un véritable phénomène social ces dernières années, Afin d'en lutter nombreuses recherches cliniques effectuées par les scientifiques ont pu mettre en évidence les bienfaits thérapeutiques de certaines plantes. Ces matières naturelles sont notamment utilisées dans le cadre d'un traitement conventionnel tel que la phytothérapie.

Ce présent travail vise la prévention de l'obésité par l'inhibition de la lipase pancréatique en utilisant des extraits éthanoliques de *Fraxines angustifolia* et *Clematis flammula*. La détermination de la teneur en composés phénoliques principalement les phénols totaux, les flavonoïdes et les tanins par processus de dosage a été la première partie dont les résultats ont montrées que nos extraits sont riches en tanins par rapport aux phénols totaux et flavonoïdes qui ont la plus basse teneur ainsi une légère différence des teneurs des composés se présente entre *Fraxines angustifolia* et *Clematis flammula*

La seconde est L'évaluation de l'activité inhibitrice a ètè réalisée en incubant une émulsion contenant l'huile d'olive comme substrat d'enzyme, la solution purifiée comme source d'enzyme et le phénol phtaléine indicateur de titration.

Les résultats obtenus ont montré que les feuilles de *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula* sont riches en métabolites secondaire considéré comme principes actifs jouant un rôle dans la prévention du surpoids donc de l'obésité.

Pour une initiative de découverte, des études futures basées sur ces résultats partiels doivent être développer dans le contexte de la fabrication et la commercialisation des formes pharmaceutiques galéniques prévenant et traitant l'obésité et ses conséquences.

Références

Bibliographiques



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ **Achat S. (2013).** *Polyphénol de l'alimentation : extraction pouvoir antioxydants et interaction avec des ions métalliques.* Travail de diplôme en vue de l'obtention du grade de Docteur en science, filière biologie, Université de Bejaia, P.5.
- ❖ **Aganga A.A., Mosase K.W.(2001).** Tannins content nutritive value and dry matter digestibility of Lonchocarpus capussa, Ziziphium mucropata, Sclerocarya birrea. Kirkia acuminata and Rhus lancea seeds. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 107-113.
- ❖ **Ali-rachedi F., Meraghni S., Touaibia N., Mesbah S. (2018).** Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne Scabiosa Atropurpurea sub. Algeria. *Maritima L*, 15, 13 -21.
- ❖ **Atmani D., Begoña R-L, M., Ruiz-Sanz J.I., Lizcano, L., Bakkali, F. et Atmani, D.(2011).** Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *Clematis flammula* leaf extracts. Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(4): 589-598.
- ❖ **Atmani D., Chaher N., Berboucha M., Ayouni K., Louis H., Boudaoud H., Debbache N., Atmani D. (2009).** Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants .Algerie. *Food Chemistry* , 112 (2) : 303-309.
- ❖ **Audrey P., Cindy U., Sophy D., Yasmina H., Agnès S. (2017).** l'obésité une problématique de santé publique. *Elsevier Masson* .France , 56 (566) : 5.
- ❖ **Ayouni K., Berbouche Rahmani M., Kyongkimb H., Atmani D., Verpoorteb R., Haechoib Y. (2016).** Metabolomic tool to identify antioxidant compounds of *Fraxinus angustifolia* leaf and stem bark extracts. *Industrial Crops and Products*. Algeria .*Elsevier*, 1-13 .
- ❖ **Besnard P. (2015).** lipides et obésité . France. *Elsevier Masson*, 1-7 .
- ❖ **Birari R., Bhutani K. (2007).** Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: an explored potential. India .*Elsevier*, 12.
- ❖ **Boizot N., Charpentier J.P. (2006).** méthodes rapide d'évaluation du contenu en composé phénolique des organes d'un arbre forestier. *Agris*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR2016203001>.
- ❖ **Bonnamy MM et Kurtz . (2014).** *Le guide de l'obésité.* Paris. ISBN : 978-2-36212-2163,.P. 30.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ **Bouquelet S. (2008).** La matière grasse alimentaire. Université des Sciences et Technologiques de Lille 1. <http://biochim-agro.univ-lille1.fr/index.html>
- ❖ **Bruneton J. (1999).** *pharmacognosie (phytochimie, plantesmédicinales)* , 3eme eddition, paris, 227-1095 .
- ❖ **Buscail L., Carrière F. (2010).** Physiopathologie de l'insuffisance pancréatique exocrine et ses implications thérapeutiques. France . *Hepato gastro et oncologiedigestie*,10(7).
- ❖ **Chawla R., Kumar S., Sharma A. (2012).**The genus *Clematis* (Ranunculaceae): Chemical and pharmacological perspectives.India .*Journal of Ethnopharmacology*, 116–150 : 35.
- ❖ **Cotelle P., Queffélec C. (2007).** Les différentes classes de molécules inhibant l'intégrase du VIH . Lille.*Revue virology*, 1 : 163-73.
- ❖ **Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. (2005).** Antioxydant activity of somealgerianmedicinal plantsextractscontainingphenolic compounds .*Food Chemistry*, 97: 654-660.
- ❖ **Dramane G., Ahyi V., Akpona S. (2017).** L'obésité dans les pays en développement : Causes et implications au Bénin .Médecine des maladies Métaboliques.*Elsevier Masson SAS*, 11 (7) .
- ❖ **Enaud E., Humeau C., Piffaut B., Girardin M. (2003).** Enzymatic synthesis of new aromatic esters of phloridzin.france.France. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 27 (2004) 16.
- ❖ **Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M and Abdelly C. (2008).** Phenolic composition of *Cynaracardunculus* L. organs, and theirbiologicalactivities. *Comptes Rendus Biologies*, 331 :372-379.
- ❖ **Fauchera B., Poitou C. (2015).** Physiopathologie de l'obésité. France. *Elsevier Masson*, 1-7.
- ❖ **Ferran A. (2011).** Digestion et absorption. Ecole National Vétérinaire de Toulouse. <http://www.sanru.cd/images/Digestion.pdf>.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ **Fickers P., Destain J., Thonart P. (2007).** Les lipases sont des hydrolases atypiques principales caractéristiques et applications. l'Université de Liège .Base. 12(2). <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=2307>.

- Ghedira K. (2005).** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique, *Phytotherapie*, 3(4):162-169.

- ❖ **Haborne J-B. (1980).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance. *phenolics in Encyclopedia of plant physiology* ,(8): 329-402.

- ❖ **Karamali K., Teunis v.R. (2001).** Tannins Classification and Definition. Republic of South Africa. *The Royal Society of Chemistry Journal* ,.18 : 641–649

- ❖ **Khoddami A., Meredith A., Wilkes and Thomas H., Roberts. (2013).** Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. Australia. *Journal Molecules*, 18, 2328-2375.

- ❖ **Kostova I., Iossifova., T.(2007).** Chemical components of *fraxinus* species . Bulgaria *.fitoterapia*, 78:85-106.

- ❖ **Kumar AHS. KekudaPT., Vinayaka KS., Swathi D., Venugopal TM. (2011).** Antiobesity(Pancreatic lipase inhibitory) activity of *Everniastrumcirrhatum*(Fr.) Hale (Parmeliaceae). *Pharmacognosy Journal*, 19: 65-68.

- ❖ **Lapornik B., Prošek M., Wondra A-G. (2005).** Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. Slovenia. *Journal of Food Engineering*, 71 :214-222.

- ❖ **Lemonnier D. (1967).** Obésité par régime hyperlipidémie chez les rats et les souris. Anale of nutrition et métabolisme. France. *Nure Dieta*, 9 : 27-42.

- ❖ **Lowe M. (2002).** The triglycéride lipases of the pancréas. *journal*, 43(12).

- ❖ **Lunagariya N.A, Patel N-K, Jagtap S.C and Bhutani K.K. (2014).** Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art and clinical perspectives. *journal*, 13: 897–921

- ❖ **Maksimovic Z., Malencic D., Kovacevic N.(2005).** Polyphenol contents and antioxidant activity of Maydis stigma extracts. Belgrade. *Bioresource Technology*, 96 :873–877.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ **Maurice N. (1997).** L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe. Ed.Lavoisier, 12-14.
- ❖ **Moncet Marie-Claude. (2017).** *Biologie fondamentale cycle de la vie et grande fonction UE 2.2 et 2.1.* Paris.VernazobresGrego,32.
- ❖ **Moulaoui K., Caddeo C., Manca M-L., Castangia I., Valenti D., Escribano E., Atmani D., Fadda A-M et Manconi M. (2015).** Identification and nanoentrapment of polyphenolic phytocomplex from *Fraxinus angustifolia*: In vitro and in vivo wound healing potential. Europe. *European Journal of Medicinal Chemistry* ,89 : 179-188.
- ❖ **Muséum national d'Histoire naturelle [Ed]. (2003-2006).** Inventaire national du Patrimoine naturel. <http://inpn.mnhn.fr>. Document téléchargé le 22 avril 2009 .
- ❖ **Olivier M. (2002).** *Biochimie de base biochimique de la diététique. Paris .3e édition, P.81.*
- ❖ **Organisation Mondiale de la Santé - International Classification of adult underweight, overweight and obesity according to BMI - Dernière visite le 5 Mai 2014.** <https://www.calculersonimc.fr/classifications-tranches-imc.html>
- ❖ **Perret B., Azéma C., Jaspard B, Danet C., Barbaras R., Collet X. (1995).** La triglycéride lipase hépatique : structure, régulation, rôles métaboliques et implications physiopathologiques. *John Libbey eurotext*,7(3) .
- ❖ **Podsedek A.(2007).** Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables, *Elsevier* , 40:1–11.
- ❖ **Raisonnier A. (2004).** DCEM1 : Digestion – Détoxification. Université Paris- VI. Paris. <http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/DGbioch/index.html>.
- ❖ **Rameau J.C., Mansion D., Dumé G.(2008).** *Flore forestière française : Région méditerranéenne Forêt privée française.* Tome 3. Institut pour le développement forestier , P.24-26.
- ❖ **Rameau J.C., Mansion D., Dumé G. (1989).** *Flore forestière française 1 Plaines et collines. Tome 1.* Institut pour le développement forestier,P. 457-459.
- ❖ **Sahani KM., Khan IM., Chandan RC. (1975).** Bovine Pancreatic Lipase: Isolation, Homogeneity, and Characterization. *Journal Dairy Science.* 59(3):369-375.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ **Saidi R., Khanous L., Khadim Allah S., Hamdi B., Ayadi A., Damak M., Hammami H., Mezghani-Jarraya R. (2017).** Antifungal, molluscicidal and larvicidal assessment of anemonin and *Clematis flammula* L. extracts against mollusc *Galba truncatula*, intermediate host of *Fasciola hepatica* in Tunisia Tunisia. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 1-7
- ❖ **Schlienger J-L. 2010.** Conséquences pathologiques de l'obésité. France. *Elsevier Masson*. ,39(9):8.
- ❖ **So-Youn J, Jee-Young I. (2014).**Lipase inhibition and cholesterol-lowering activities of laccase-catalyzed catechin polymers .*Food Science and Biotechnology*. 23:1703.
- ❖ **Stoclet J-C, Schini-Kerth V. (2011).** Flavonoïdes alimentaires et santé humaine.Frnace. *Elsevier masson* .<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00667027>.
- ❖ **Tela botanique .(2011).** *Clematis flammula* <http://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-86188-synthese> .
- ❖ **Telabotanique. (2017).** *Fraxines angustifolia*<http://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-28210>
- ❖ **Touhami I., Ghazghazi H., Sellimi H., Khaldi A., Mahmoudi H. (2017).** Antioxidant activities and phenolic contents of bark and leave extracts from Tunisian native tree: *Fraxinus angustifolia* Vahl. subsp *Angustifolia* .Tunisie. *Journal of new science*, 45(5): 2497-2499.
- ❖ **Touitou Y. (2005).** *Biochimie : Structure des glucides et lipides*. Université Paris- VI. Niveau PAES. Paris.P 31-44.
- ❖ **Vladimir-Knežević S., Blažeković B., Bival Štefan M., Babac M. (2012).** *Phytochemicals as Nutraceuticals*. plant polyphenols as antioxidants Influencing the human health. *University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Croatia*. P. 27.
- ❖ **Wallander, E. (2008).** Systematics of *Fraxinus*(Oleaceae) and evolution of dioecy. *Plant Journal systematics and Evolution*, 273:25-49.
- ❖ **Wlodek , L., kusior, D. (2006).** Oxidative hémolysis of erythrocytes . Poland. *Institute of Medical Biochemistry* .34(6):438-43.

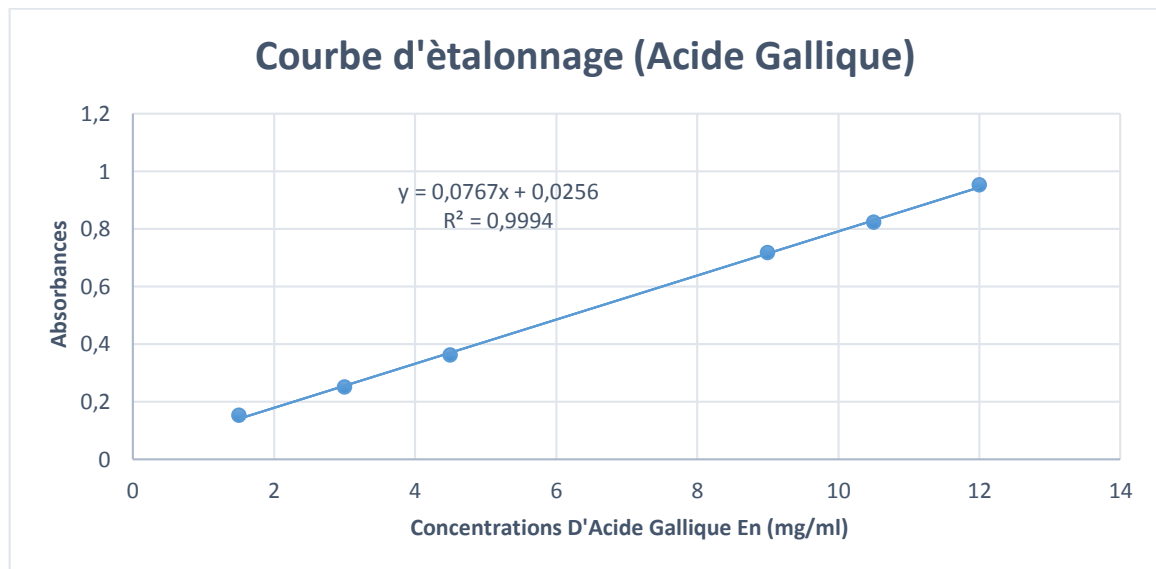
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ **Weil J-H. (2009).** *Biochimie générale*. Paris. 11eme eddition. P.28.
- ❖ **Yesilada E & Küpeli E. (2007).** *Clematis vitalba L.* aerial part exhibits potent anti-inflammatory,antinociceptive and antipyretic effects .Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(3):504-15.

Annexe I

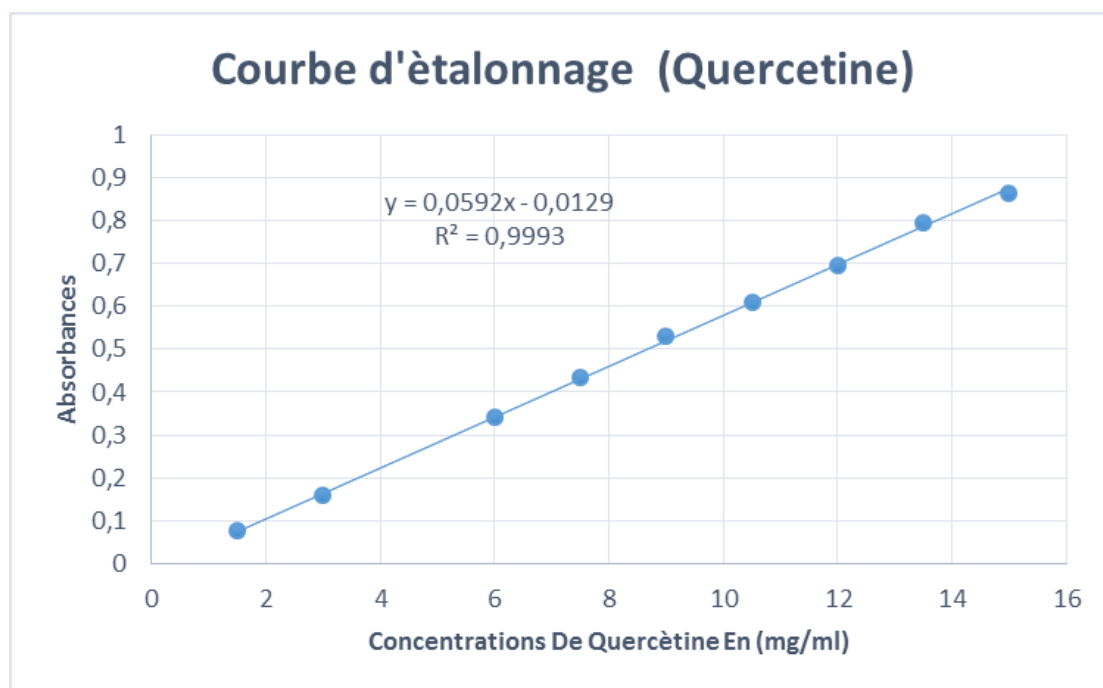
Classification selon l'OMS	Valeurs de l'IMC (en kg/m ²)
Insuffisance pondérale	< 18.5
Insuffisance pondérale sévère	< 16.5
Insuffisance pondérale modérée	16.00 - 16.99
Insuffisance pondérale légère	17.00 - 18.49
Corpulence normale	18.50 - 24.99
Surpoids	≥25.00
Prè-obésité	25.00 - 29.99
Obésité	≥30.00
Obésité de classe I	30.00 - 34.99
Obésité de classe II	35.00 - 39.99
Obésité de classe III	≥40.00

Annexe II



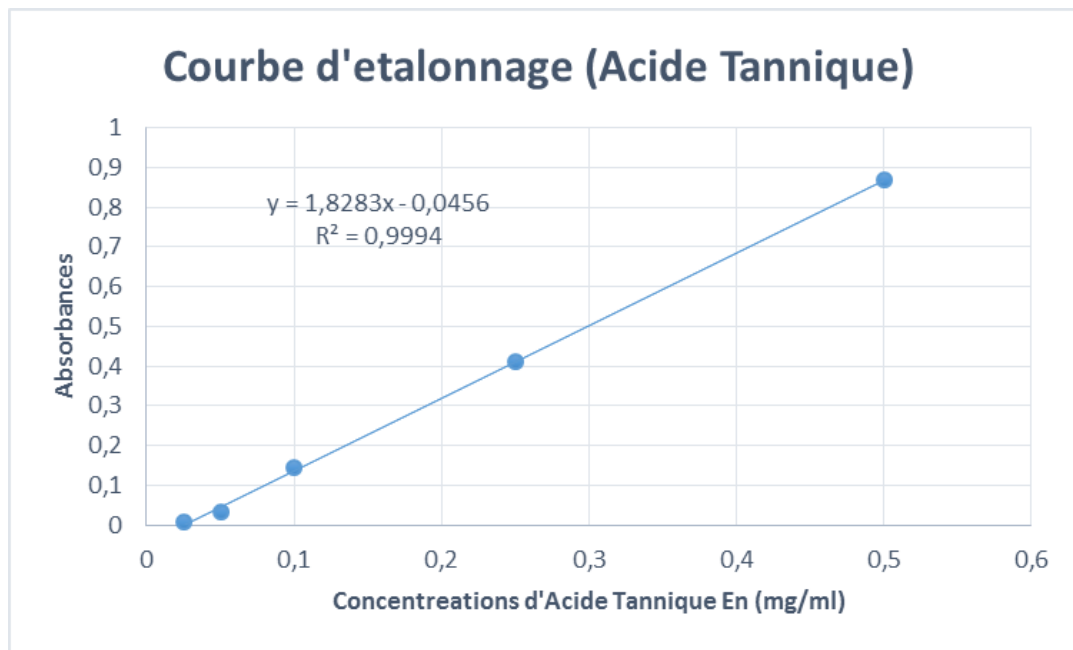
Courbe D'Etalonnage Avec L'Acide Gallique.

Annexe III



Courbe D'Etalonnage Avec La Quercetine.

Annexe IV



Courbe D'Etalonnage Avec L'Acide Tannique

Annexe V

Le pourcentage d'inhibition de l'activité de la lipase pancréatique a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$\%I = (A - B) / A \times 100$$

Avec :

- %I : Pourcentage d'inhibition de la lipase ;
- A : Activité de la lipase ;
- B : Activité de la lipase incubé avec l'extrait.

Tableau : Les pourcentages d'activité et d'inhibition de la lipase pancréatique (avec ou sans l'extrait éthanolique *Fraxinus angustifolia*).

Concentration mg/ml	Activité de la lipase %	% d'inhibition
Control	100	0
0,1	88	13
0,25	74	26
0,5	67	33
1	60	40
2,5	50	50
5	33	67
10	21	79
15	17	83
20	4	96

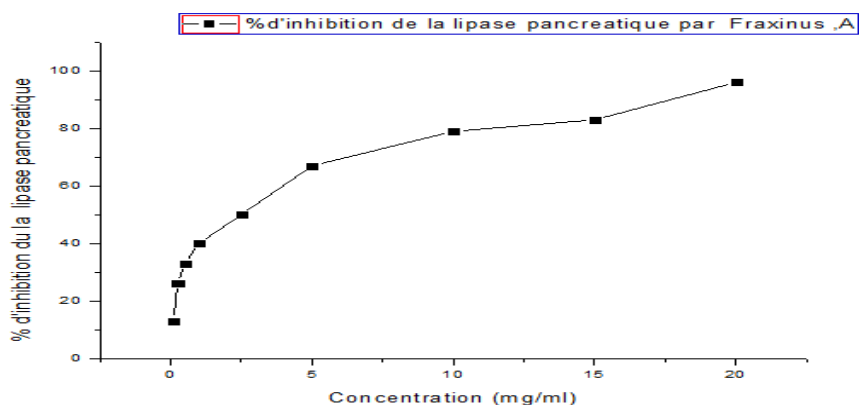


Figure : Représentation graphique du pourcentage d'inhibition de la lipase pancréatique par l'extrait éthanolique des feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

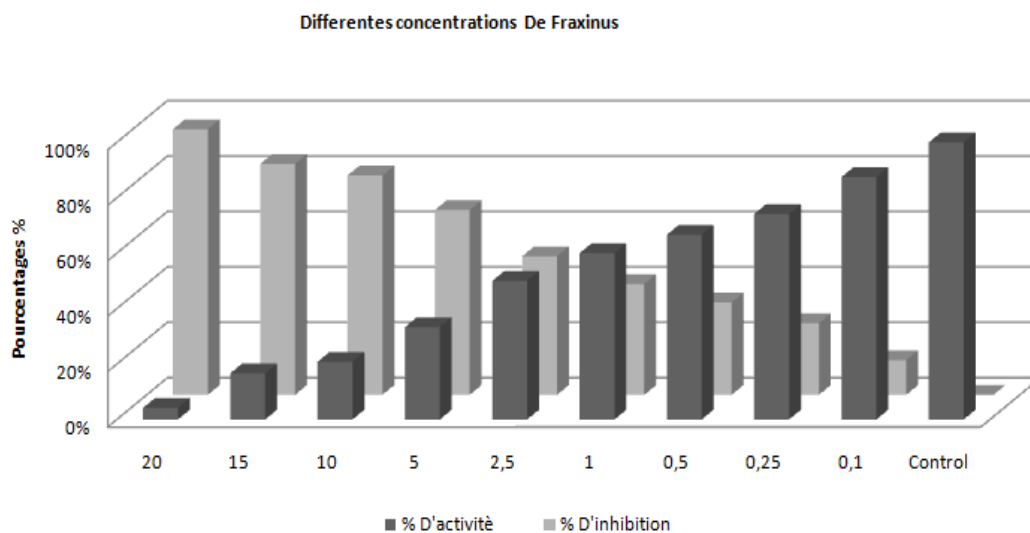


Figure : Histogramme du pourcentage et de l'activité de la lipase pancréatique par l'extrait éthanolique des feuilles de *Fraxines Angustifolia*

Tableau : Les pourcentages d'activité et d'inhibition de la lipase pancréatique (avec ou sans l'extrait éthanolique *Clematis flammula*).

Concentration mg/ml	Activité de la lipase %	% d'inhibition
0	100	0
0,1	83	17
0,25	75	25
0,5	67	33
1	63	38
2,5	58	42
5	50	50
10	33	67
15	17	83
20	8	92

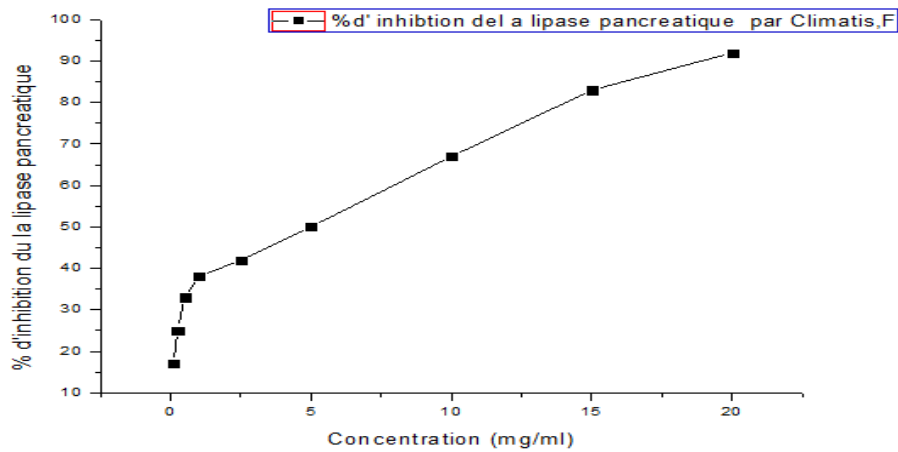


Figure : Représentation graphique du pourcentage d'inhibition de la lipase pancréatique par l'extrait éthanolique des feuilles de *Clematis flammula*

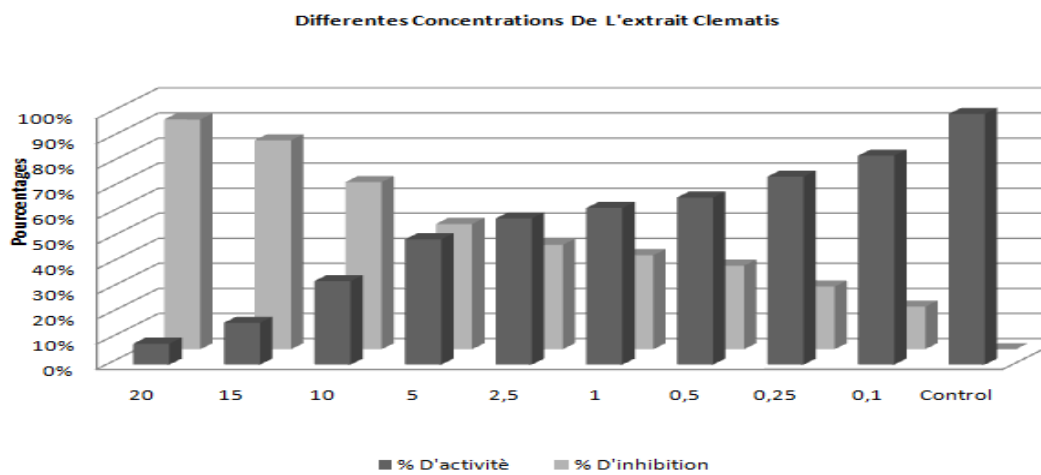


Figure : histogramme du pourcentage d'inhibition et de l'activité de la lipase pancréatique par l'extrait éthanolique des feuilles de *Clematis flammula*

Glossaire

Entérocytes : Les entérocytes sont les cellules les plus internes de l'intestin grêle. Leur principale fonction est de permettre le transit sélectif des nutriments de la lumière (intérieur) de l'intestin grêle vers le milieu intérieur en passant par le sang.

Colipase : est un cofacteur protéique de la lipase pancréatique, issu d'une procolipase activée par la trypsine.

Cholestérol estérase : La cholestérol estérase est une enzyme du suc pancréatique qui effectue la digestion des esters de cholestérol alimentaires. Elle catalyse l'hydrolyse de ces stérides en cholestérol libre et acides gras libres, qui seront absorbés dans les micelles lipidiques avec les produits de digestion de la lipase pancréatique.

Phospholipases A2 : la phospholipase A2 hydrolyse l'acide gras de la fonction alcool secondaire en C2, libérant un acide gras et un lysophospholipide.

L'iléon : En anatomie du système digestif, l'iléon est la troisième partie (finale) de l'intestin grêle en amont du côlon et en aval du jéjunum, son pH de l'iléon est en général entre 7 et 8 (neutre ou légèrement alcalin).

La voie de KENNEDY : C'est la synthèse des glycérolipides par estérification de l' α -glycérophosphate par différents acyl coenzymes A conduit aux phosphatidates. Dans les membranes du reticulum endoplasmique, les phosphatidates sont hydrolysés par la phosphatidate phosphatase qui fixe les diglycérides dans la membrane. Ces diglycérides sont ensuite estérifiés à nouveau pour faire des triglycérides dans la lumière d'une vésicule lipidique (foie, tissu adipeux) ou pour faire des glycérophospholipides (phosphatidylcholines et phosphatidyléthanolamines).

La voie de CLARK et HUBSCHER : Les triglycérides des chylomicrons sont synthétisés à partir des monoglycérides par une monoglycéride acyl-transférase propre aux entérocytes et la diglycéride acyl-transférase. Cette voie plus économique en énergie (voie de CLARK et HUBSCHER) s'accompagne de synthèse de phospholipides à partir des lysophospholipides absorbés et d'esters de cholestérol.

Résumé

L'évaluation de l'inhibition de la lipase pancréatique par les extraits éthanologiques de *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula* était principal objectif de ce travail.

Les extraits éthanologiques ont été préparé selon une extraction précise. On s'est référé en premier lieu à une quantification des composés phénolique suivant des protocoles de dosage déterminé, dont les teneurs en phénols totaux (*F. angustifolia* : $91,66 \pm 0,008$, *C. flammula*: $87,22 \pm 0,019$ mg EAG/g d'extrait), flavonoïdes (*F. angustifolia* : $16,47 \pm 0,01$, *C. flammula*: $15,22 \pm 0,005$ mg EQ/g d'extrait) et les tannins (*F.angustifolia* : $122,74 \pm 0.029$, *C.flammula*: $193,94 \pm 0.072$ mg EAT/g d'extrait) , ainsi la dissolution des extraits aux différentes concentrations . Ces dernières ont été testé sur une source enzymatique (lipase pancréatique) extraite d'un modèle animal vivant et purifier partiellement. Le pouvoir inhibiteur des extraits a été déterminé selon une courbe en calculant IC50 qui égale à 2.5 mg/ml pour *Fraxinus angustifolie* et 5 mg/ml pour *Clematis flammula*,

Mot clé: lipase pancréatique, *Fraxinus angustifolia*, *Clematis flammula*, composés phénolique

Abstract

The evaluation of the inhibition of pancreatic lipase by the ethanol extracts of *Fraxinus angustifolia* and *Clematis flammula* was the main objective of this work. The ethanolic extracts were prepared according to a precise extraction. In the first place, reference was made to a quantification of the phenol compounds following specific dosing protocols including the total phenol contents (*F. angustifolia* : 91.66 ± 0.0088 , *C. flammula*: 87.220339 ± 0.019 mg EAG / g extract) flavonoids (*F. angustifolia* : 16.47 ± 0.01 , *C. flammula*: 15.22 ± 0.005 mg EQ / g extract) and tannins (*F. angustifolia* : 122.7470826 ± 0.029 , *C. flammula* : 193.9458428 ± 0.072 mg EAT / g of extract), and the dissolution of the extracts at different concentrations. The latter were tested on an enzymatic source (pancreatic lipase) extracted from a live animal model and partially purified. The inhibitory power of the extracts was determined according to a curve by calculating IC 50 which is equal to 2.5 mg / ml for *Fraxinus angustifolia* and 5 mg / ml for *Clematis flammula*.

Key word: pancreatic lipase, *Fraxinus angustifolia*, *Clematis flammula*, phenol compounds

ملخص

الهدف الأساسي من هذه الدراسة هو تقييم عملية تثبيط الليباز البنكرياس بالمستخلصات الإيثانولية لدردار و الياسمين البري . اظهرت نتائج قياس الكمي للمستخلصات الإيثانولية على احتوائه على للمركبات الفينول لكلي (لدردار : $91,66 \pm 0,0088$; الياسمين البري: $87,22 \pm 0,019$) ، الفلافونويد (لدردار $16,47 \pm 0,01$; الياسمين البري: $15,22 \pm 0,005$) والعفص (لدردار $122,74 \pm 0,029$; الياسمين البري: $193,945 \pm 0,072$) ، بعد تحليل تركيزات مختلفة. تم اختبار هذا الأخير على مصدر إنزيمي (الليباز البنكرياس) المستخرج من نموذج حي وتقنية جزئياً. وقوة المثبطة لتركيزات في منحنى عن طريق حساب IC 50 الذي يساوي 2.5 ملغ / مل لياسمين البري و 5 ملغ / مل لدردار .

كلمات مفتاح: الليباز البنكرياس , الدردار, الياسمين البري , للمركبات الفينول .

