



Université de POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNEE 2022

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(arrêté du 8 avril 2013)**

présentée et soutenue publiquement
le 8 mars 2022 à POITIERS
par **Monsieur HUGUET Clément**

Les sécrétagogues du GLP-1 d'origine naturelle,
une nouvelle source d'antidiabétiques

Composition du jury :

Président : Monsieur le Professeur SARROUILHE Denis

Membres : Madame GIRARDOT Marion, MCU
Madame JAULIN Charlotte, Docteur en Pharmacie

Directrice de thèse : Madame GIRARDOT Marion, MCU



Université de POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNEE 2022

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(arrêté du 8 avril 2013)

présentée et soutenue publiquement
le 8 mars 2022 à POITIERS
par **Monsieur HUGUET Clément**

Les sécrétagogues du GLP-1 d'origine naturelle,
une nouvelle source d'antidiabétiques

Composition du jury :

Président : Monsieur le Professeur SARROUILHE Denis

Membres : Madame GIRARDOT Marion, MCU
Madame JAULIN Charlotte, Docteur en Pharmacie

Directrice de thèse : Madame GIRARDOT Marion, MCU

PHARMACIE

Professeurs

- CARATO Pascal, PU, chimie thérapeutique
- COUET William, PU-PH, pharmacie clinique
- DUPUIS Antoine, PU-PH, pharmacie clinique
- FAUCONNEAU Bernard, PU, toxicologie
- GUILLARD Jérôme, PU, pharmacochimie
- IMBERT Christine, PU, parasitologie
- MARCHAND Sandrine, PU-PH, pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, PU, galénique
- PAGE Guylène, PU, biologie cellulaire
- RABOUAN Sylvie, PU, chimie physique, chimie analytique
- RAGOT Stéphanie, PU-PH, santé publique
- SARROUILHE Denis, PU, physiologie
- SEGUIN François, PU, biophysique, biomathématiques

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, MCU-PH, immunologie-hématologie
- BARRIER Laurence, MCU, biochimie
- BINSON Guillaume, MCU-PH, pharmacie clinique
- BODET Charles, MCU, bactériologie (HDR)
- BON Delphine, MCU, biophysique
- BRILLAULT Julien, MCU, pharmacocinétique, biopharmacie
- BUYCK Julien, MCU, microbiologie,
- CHARVET Caroline, MCU, physiologie
- CHAUZY Alexia, MCU, pharmacologie fondamentale et thérapeutique
- DEBORDE-DELAGE Marie, MCU, sciences physico-chimiques
- DELAGE Jacques, MCU, biomathématiques, biophysique
- FAVOT-LAFORGE Laure, MCU, biologie cellulaire et moléculaire (HDR)

- GIRARDOT Marion, MCU, biologie végétale et pharmacognosie
- GREGOIRE Nicolas, MCU, pharmacologie (HDR)
- HUSSAIN Didja, MCU, pharmacie galénique (HDR)
- INGRAND Sabrina, MCU, toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile, MCU, pharmacochimie
- PAIN Stéphanie, MCU, toxicologie (HDR)
- RIOUX BILAN Agnès, MCU, biochimie
- THEVENOT Sarah, MCU-PH, hygiène et santé publique
- TEWES Frédéric, MCU, chimie et pharmacochimie
- THOREAU Vincent, MCU, biologie cellulaire
- WAHL Anne, MCU, chimie analytique

Maîtres de Conférences Associés - officine

- DELOFFRE Clément, pharmacien
- ELIOT Guillaume, pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwyn, pharmacien

A.T.E.R. (attaché temporaire d'enseignement et de recherche)

- MIANTEZILA BASILUA Joe, épidémiologie et santé publique

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite exprimer toute ma reconnaissance au Pr Denis SARROUILHE pour avoir accepté d'être le président du jury et au Dr Charlotte JAULIN pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie Marion GIRARDOT qui m'a permis de réaliser mon premier stage d'initiation à la recherche et qui a encadré cette thèse d'exercice. Cette première expérience en laboratoire m'a conforté dans mon choix de faire de la recherche sur les substances naturelles et leurs propriétés pharmacologiques. Je tiens à exprimer ma gratitude à toute l'équipe pédagogique de l'UFR de Pharmacie des universités de Poitiers, Nantes et Strasbourg pour leur accompagnement dans mon cursus universitaire.

Je tiens également à remercier Christine IMBERT sans qui mon expérience indonésienne à Semarang n'aurait pas été possible. Merci à toute l'équipe de l'université Diponegoro et aux employés de l'entreprise Sido Muncul pour leur accueil, leur gentillesse, leur bienveillance pendant ma première expérience dans le milieu industriel à 12 000 km de chez moi.

En tant qu'alsacien d'adoption depuis près de trois ans maintenant, je souhaite remercier tous les membres de l'équipe de chimie analytique des molécules bioactives et pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg. La réalisation de ce travail n'aurait pas été possible sans la confiance d'Aurélié URBAIN pour la poursuite du projet « Substances naturelles antidiabétiques » au cours de mon stage de fin d'études. Je souhaite également remercier Éléonore REAL pour son initiation à la culture cellulaire et Laurence GONDET qui m'a permis de découvrir le domaine de la biotechnologie végétale. Je remercie tous les anciens étudiants en thèse du labo, Zélie TRIAUX, Mamadou BALDE, Gwenaëlle FLIELLER et Quentin FAVRE-GODAL qui fait toujours preuve d'une grande écoute encore aujourd'hui.

Enfin, j'ai une pensée pour ma famille. Merci à mes parents qui m'ont toujours soutenue, à mes grands-parents pour les séjours de révisions intensives dans le Loir-et-Cher et à mes deux petits frères dont je suis très fier. Je salue tous mes amis de La Rochelle et de la faculté de Poitiers.

Je suis très heureux que certains d'entre eux aient fait le choix de venir s'installer en Alsace pour y passer quelques années ensemble. J'adresse tout mon amour à Maryne qui est ma plus fidèle confidente et qui fait toujours preuve d'un soutien indéfectible à mon égard. Merci de croire en moi.

Table des matières

Introduction	1
Chapitre 1 Le diabète et ses traitements.....	3
1.1 L'homéostasie glucidique.....	3
1.2 Le diabète	4
1.2.1 Le diabète de type 1	4
1.2.2 Le diabète de type 2	8
1.2.3 Le diabète gestationnel.....	15
1.2.4 Résumé.....	15
1.3 Les thérapeutiques du diabète.....	16
1.3.1 Le traitement du diabète de type 1	16
1.3.2 La prise en charge du diabète gestationnel.....	19
1.3.3 Les traitements du diabète de type 2	20
1.3.3.1 Les mesures hygiénodietétiques	20
1.3.3.2 Les antidiabétiques oraux et analogues du GLP-1	21
1.3.3.3 L'insulinothérapie	28
1.3.4 Conclusion.....	29
Chapitre 2 Le GLP-1 et l'ensemble des modèles pour son étude	31
2.1 Le GLP-1	31
2.1.1 L'effet incrétine.....	31
2.1.2 La biosynthèse du GLP-1	31
2.1.3 La sécrétion du GLP-1	32
2.1.4 Les récepteurs du GLP-1	35
2.1.5 Les effets biologiques du GLP-1.....	35
2.2 Les modèles <i>in vitro</i> de l'étude du GLP-1.....	37
2.2.1 Les cellules STC-1	37
2.2.2 Les cellules GLUTag	39
2.2.3 Les cellules NCI-H716.....	40
2.2.4 Les cellules entéroendocrines L primaires	41
2.3 Les modèles <i>ex vivo</i> de l'étude du GLP-1	43
2.4 Les modèles <i>in vivo</i> de l'étude du GLP-1.....	44
2.4.1 Les souris.....	44
2.4.1.1 Les souris <i>db/db</i>	44
2.4.1.2 Les souris <i>ddY</i>	45
2.4.1.3 Les souris <i>C57BL/6J</i>	45

2.4.1.4	Les souris ICR	45
2.4.2	Les rats	46
2.4.2.1	Les rats Wistar	46
2.4.2.2	Les rats Sprague-Dawley	46
2.4.2.3	Les rats Goto Kakizaki	47
2.4.3	Conclusion.....	47
Chapitre 3	La recherche de sécrétagogues naturels du GLP-1	49
3.1	Les extraits de plantes sécrétagogues du GLP-1	49
3.2	Les extraits de plantes et leurs métabolites sécrétagogues du GLP-1	53
3.2.1	<i>Gentiana scabra</i> et l'acide loganique.....	53
3.2.2	Les métabolites secondaires d' <i>Oparanthus teikiteetini</i>	54
3.2.3	<i>Momordica charantia</i> et les cucurbitanes	56
3.2.4	<i>Fagonia cretica</i> , l'acide quinovique et ses dérivés	57
3.2.5	<i>Olea europaea</i> , l'acide oléanolique et ses isomères	58
3.2.6	<i>Panax ginseng</i> , les ginsénosides et le composé K	61
3.2.7	Les stéroïdes des <i>Apocynaceae</i>	62
3.2.8	<i>Ribes nigrum</i> et ses anthocyanes	66
3.2.9	<i>Glycine max</i> et ses polyphénols	68
3.2.10	<i>Ipomoea batatas</i> , <i>Ilex paraguariensis</i> et les dérivés de l'acide chlorogénique..	70
3.2.11	<i>Arctium lappa</i> et les lignanes	73
3.2.12	<i>Angelica dahurica</i> et ses coumarines	74
3.3	Autres exemples de molécules naturelles sécrétagogues du GLP-1 classées par catégories chimiques.....	75
3.3.1	Monoterpènes	75
3.3.2	Les diterpènes.....	75
3.3.3	Les sesquiterpènes.....	77
3.3.4	Les stilbénoides	77
3.3.5	Les alcaloïdes isoquinoléiques	78
3.3.6	Les alcaloïdes quinoléiques.....	80
3.3.7	Les pseudo-alcaloïdes aromatiques	81
3.3.8	Les composés soufrés.....	82
3.4	Etudes d'extraits de plantes sur l'homme.....	83
3.5	Conclusion	85
Conclusion	87

Liste des abréviations

AcOEt : Acétate d'éthyle	Hétéroside acide quinovique 2 : ester de l'acide-3 β -O- β -D-glucopyranosyl-(28,1)-D-glucopyranosyl quinovique
ADO : Antidiabétiques oraux	Hex : Hexane
AGNE : Acides gras non estérifiés	HGPO : Hyperglycémie provoquée par voie orale
AMM : Autorisation de mise sur le marché	HLA : <i>Human Leukocyte Antigen</i> (antigène des leucocytes humains)
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique	CLHP : Chromatographie liquide haute performance
AP1 : Protéine activatrice 1	IKK/NFkappa B : <i>nuclear factor kappa-light-chain- enhancer of activated B cells</i> (facteur de transcription de la réponse immunitaire et du stress cellulaire)
AS160 : <i>Akt substrate of 160 kDa</i> (substrat de l'Akt de 160 kDa)	IL-6 : interleukine 6
ATP : Adénosine triphosphate	IP1 : <i>intervening peptide 1</i>
BCE : Blackcurrant Polyphenol Extract 75	IP2 : <i>intervening peptide 2</i>
Bcl-2 : <i>B-cell lymphoma 2</i> (lymphoma à cellules B)	IP ₃ : Inositol triphosphate
BuOH : Butanol	IRS-1 : <i>Insulin receptor substrate-1</i> (substrat majeur du récepteur à l'insuline)
CaMKII : Kinase II dépendante de la Ca ²⁺ /calmoduline	JNK : <i>c-Jun NH₂-terminal kinase</i> (famille de protéines kinases)
CaSR : <i>Ca²⁺- sensing receptor</i> (récepteur du calcium extracellulaire)	kD : kilodalton
CCK : Cholécystokinine	LDH : Lactate déshydrogénase
C _{max} : Concentration maximale	MBPM : Molécules de bas poids moléculaire
CH ₂ Cl ₂ : Dichlorométhane	MeOH : Méthanol
CHCl ₃ : Chloroforme	MPGF : <i>Major proglucagon fragment</i> (fragment majoritaire du proglucagon)
Composé K : 20-O- β -D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol	MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltétraazolium bromide
Cucurbitane 1 : 9-nor-cucurbita-5(10),6,8,22-(E),24-pentaen-3 β -ol	NEP : <i>Neutral endopeptidase</i> (néprilysine)
DG : Diabète gestationnel	NOD : <i>Non obese diabetic</i> (diabétique non obèse)
DMEM : <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (milieu de culture cellulaire)	NPH : <i>Neutral Protamine Hagedorn</i>
DPP4 : Dipeptidyl-peptidase-4	OMS : Organisation mondiale de la santé
DT1 : Diabète de type 1	PC-1/3 : prohormone convertase - 1/3
DT2 : Diabète de type 2	PDE : Phosphodiesterase
EMA : <i>European Medicines Agency</i> (agence européenne des médicaments)	PI3K : <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> (phosphoinositide 3-kinase)
EtOH : Éthanol	PKC : Protéine kinase C
FDA : <i>Food and Drug Administration</i>	PTC : Phénylthiocarbamide
FFAR : <i>Free fatty acids receptors</i> (récepteur des acides gras libres)	PYY : Peptide YY
FTL : Fraction totale des lignanes	RCPGs : récepteurs couplés aux protéines G
GIP : <i>Gastric inhibitory polypeptide</i> (peptide insulinothrompe dépendant du glucose)	SC : Sous-cutanée
GK : Goto Kakizaki	SD : Sprague-Dawley
GLP-1 : <i>Glucagon like peptide 1</i>	SDIP : Segments distaux d'intestin de porcs
GLP-1R : Récepteur du GLP-1	SGLT : <i>sodium-linked glucose transporters</i> (transporteur sodium glucose)
GLP-2 : <i>Glucagon like peptide 2</i>	SOCs-3 : <i>Suppressor of cytokine signalling-3</i> (protéines de suppression des signaux des cytokines)
GLUT4 : transporteur de glucose 4	TAS2R : <i>taste receptor 2</i> (récepteur à la saveur amère)
GPR : <i>G protein-coupled receptor</i> (récepteur couplé aux protéines G)	
GRPP : <i>glicentin-related pancreatic peptide</i> (polypeptide pancréatique lié à la glicentine)	
Hétéroside acide quinovique 1 : l'acide-3 β -O- β -D-glucopyranoside quinovique	

TGIP: Tolérance au glucose par voie intrapéritonéale

TGR5 : *Takeda G-protein receptor-5* (récepteur couple à une protéine G spécifique des acides biliaires)

TNF- α : *Tumor necrosis factor α* (facteur de nécrose tumorale α)

TRP : *Transient Receptor Potential* (canaux perméables aux cations)

TRPA1 : *Transient Receptor Potential Ankyrin 1* (canal cationique à potentiel de réception transitoire de l'ankyrine 1)

TRPM5 : *Receptor potential melastatin-5 ion channel* (canal cationique monovalent dépendant du calcium)

TRPV1 : *Transient receptor potential vanilloide 1* (récepteurs ionotropiques activés par les vanilloïdes)

UICN : Union internationale pour la conservation de la nature

Table des figures

Figure 1 : Les rôles de l'insuline et du glucagon dans l'homéostasie glucidique (4).....	3
Figure 2 : Voie de la signalisation cellulaire suite à la fixation de l'insuline à son récepteur (27).....	9
Figure 3 : Surcharge adipeuse, inflammation et insulino-résistance (31 - 33)	11
Figure 4 : L'implication des acides gras non estérifiés dans l'insulino-résistance et l'hyperglycémie (35 - 41)	12
Figure 5 : Différences entre les insulines humaines, bovines et porcines	17
Figure 6 : Origine et développement des trois biguanides : metformine, buformine et phenformine...	22
Figure 7 : Structure chimique de l'acide benzoïque, du métilglinide et du répaglinide	24
Figure 8 : Le Monstre de Gila (wikimedia commons © H. van der Ploeg) et l'homologie peptidique entre l'exendine-4 de son venin et le GLP-1	26
Figure 9 : Ensemble des antidiabétiques utilisés dans le traitement du DT2 et leurs actions pharmacologiques.....	28
Figure 10 : Les cellules intestinales L et l'exocytose du GLP-1 (118 - 128)	34
Figure 11 : Les actions biologiques du GLP-1 et leurs répercussions sur l'homéostasie glucidique....	36
Figure 12 : Le noyau commun des 16 prégnanes étudiés (A), le groupement <i>p</i> -hydroxybenzoyle (B), le groupement ikemaoyl (C) et les chaînes osidiques de l'otophylloside A (D), du wilfoside C3N (E) et du wilfoside C1N (F).....	65
Figure 13: Structure chimique de la delphinidine-3-rutinoside et éléments structuraux essentiels à l'activité sécrétagogue (en rouge).	67
Figure 14: Structure chimique de l'acide tricaféoylquinique.....	71

Table des tableaux

Tableau 1 : Principales caractéristiques des différents types de diabète	16
Tableau 2 : Avantages et inconvénients des différentes lignées cellulaires pour l'étude du GLP-1	43

Introduction

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), 442 millions d'adultes dans le monde sont diabétiques avec une prévalence qui a doublé en 35 ans. Les prévisions concernant cette pathologie métabolique sont alarmantes. En effet, l'OMS estime que le diabète pourrait devenir la 7^{ème} cause de décès dans le monde d'ici 2030, à cause des complications macro et microangiopathiques qu'il entraîne (1). Le diabète de type 2 (DT2) représente 90 à 95% de tous les diabètes diagnostiqués chez l'adulte (2).

Depuis le début de l'histoire de la pharmacie, les produits naturels occupent une place importante dans la découverte de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique. Concernant le traitement du diabète, de nombreux principes actifs proviennent aussi bien du règne végétal avec la plante *Galega officinalis*, que du règne animal avec le Monstre de Gila.

L'utilisation des médicaments développés autour de l'hormone *glucagon like peptide 1* (GLP-1) est considérée comme la plus grande révolution dans le traitement du diabète depuis les insulines. C'est dans ce contexte que nous traiterons de la découverte de nouvelles molécules naturelles exerçant une action sécrétagogue du GLP-1.

Ce travail présentera dans un premier temps la pathologie du diabète et l'ensemble des thérapeutiques actuellement utilisées pour son traitement.

Puis, nous nous focaliserons sur le GLP-1, une hormone jouant un rôle important dans le maintien de l'homéostasie glucidique à plusieurs échelles. Nous nous intéresserons à l'ensemble des modèles utilisés en laboratoire pour étudier cette hormone et développer de nouveaux principes actifs stimulant sa sécrétion.

Enfin, nous présenterons l'ensemble des ressources naturelles, leurs extraits et les molécules déjà identifiées, exerçant un effet sécrétagogue du GLP-1, effet constituant une stratégie thérapeutique originale dans la prise en charge du diabète de type 2 (DT2).

Chapitre 1

Le diabète et ses traitements

1.1 L'homéostasie glucidique

Le glucose est considéré comme le carburant de l'organisme. Qu'il soit apporté de manière exogène par l'alimentation, ou généré à partir de réserves via la glycogénèse ; sa transformation finale permet la génération d'adénosine triphosphate (ATP), élément essentiel au métabolisme cellulaire (3). De nombreux organes et hormones sont impliqués dans l'homéostasie glucidique pour maintenir une glycémie entre 0,8 et 1,2 g/L. L'insuline et le glucagon sont les hormones clés dans le maintien de cet équilibre, avec pour la première un effet hypoglycémiant, et hyperglycémiant pour la seconde. Une glycémie haute induite par une prise alimentaire provoquera la stimulation de la sécrétion de l'insuline par les cellules β pancréatiques. En atteignant ses cibles via la circulation sanguine, l'insuline permettra soit d'utiliser directement le glucose au niveau du cœur, des muscles striés squelettiques et du cerveau, soit de le stocker sous forme de glycogène dans les muscles et le foie ou sous forme de triglycérides dans les tissus adipeux (4). Le glucagon, quant à lui, est produit par les cellules α pancréatiques en réponse à un taux glycémique bas, observé par exemple en période de jeûne. Cette hormone va restaurer ce manque de glucose circulant en stimulant la glycogénolyse et la néoglucogénèse (synthèse du glucose à partir de précurseurs tels que le glycérol ou des acides aminés) dans le foie. Le rôle physiologique des deux hormones est illustré dans la **figure 1**.

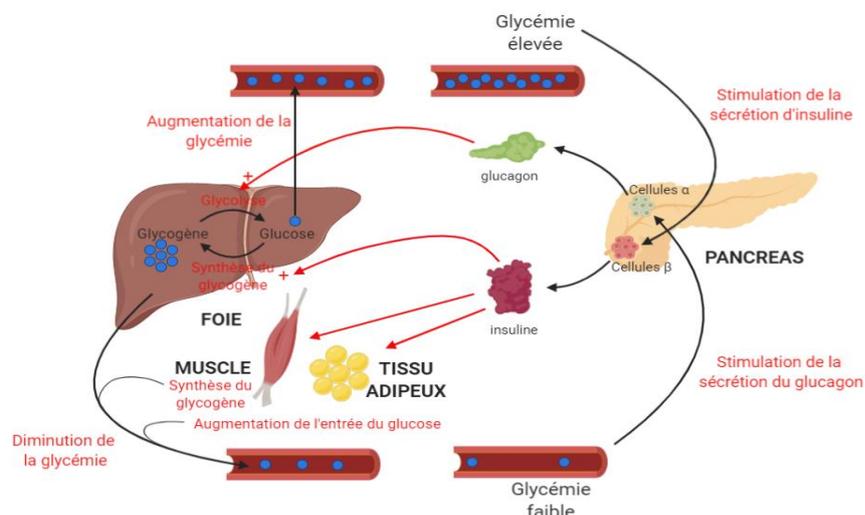


Figure 1 : Les rôles de l'insuline et du glucagon dans l'homéostasie glucidique (4)

1.2 Le diabète

- Généralités

La perturbation de l'homéostasie glucidique peut conduire notamment à l'apparition d'un diabète. La plus vieille description du diabète nous vient de l'Égypte antique en -552 av. J.-C., dans le fameux Papyrus d'Ebers (5). C'est au médecin Apollonius de Memphis, que l'on doit l'introduction du terme « diabète ». Ce néologisme tient de la réunion des mots grecs « dia » (à travers) et de « betos » (fuite) (6). *Diabetes* qui veut dire « siphon » en latin, rend bien compte de l'un des symptômes les plus fréquents du diabète sucré : la polyurie. Malgré l'ingestion de grandes quantités d'eau, les personnes diabétiques l'éliminent très rapidement. Cette première observation clinique donnera le nom à la maladie. Le diabète est une maladie métabolique se caractérisant par une hyperglycémie chronique. Le diagnostic repose sur la mesure d'une glycémie à jeun supérieure ou égale à 1,26 g/L à deux reprises, ou à une glycémie supérieure à 2 g/L quel que soit le moment de la journée (7). Cette hyperglycémie est causée par un dérèglement du système d'utilisation et/ou du stockage des sucres de l'organisme.

- Les différents types de diabète

Il existe trois types de diabète :

- le diabète de type 1 (DT1) qui est une maladie auto-immune où la destruction des cellules β pancréatiques conduit à une diminution de la production d'insuline.
- le diabète de type 2 (DT2) qui est induit par une résistance des cellules cibles de l'insuline.
- le diabète gestationnel (DG) provoqué par un dérèglement hormonal placentaire.

1.2.1 Le diabète de type 1

Le DT1 se caractérise par un déficit en insuline, d'où son autre dénomination : diabète insulino-dépendant. Comme nous l'avons exposé, ce type de diabète résulte d'une dégradation des cellules β du pancréas qui produisent l'insuline.

- Étiologie

L'origine de cette dégradation auto-immune reste à éclaircir, mais les recherches suggèrent qu'une prédisposition génétique mêlée à des facteurs environnementaux déclenchants seraient à l'origine de l'apparition de la maladie. En effet, concernant la génétique, pas moins de 40 locus ayant un lien avec cette pathologie ont été identifiés (8). La région génétique la plus associée au DT1 se situe sur le bras court du chromosome 6, dans le complexe majeur d'histocompatibilité comprenant les gènes HLA (*Human Leukocyte Antigen*). Les allèles dénommés DR3 et DR4 des gènes du HLA sont présents dans plus de 90% des cas des adolescents caucasiens développant un diabète de type 1 (9). Néanmoins, cette dimension génétique doit être combinée à des facteurs environnementaux initiant le processus auto-immun. De plus en plus d'études démontrent que ces facteurs jouent le rôle principal dans la pathogenèse du DT1 (10). Voyons ci-dessous ces différents facteurs.

- Les infections virales

Le rôle des infections virales dans l'initiation d'un DT1 est débattu depuis plus de 40 ans. Cette hypothèse fut émise après une observation faisant le lien entre une variation saisonnière des cas de diabète et des infections aux entérovirus (virus ourlien et les virus de type coxsackie), le virus de la rubéole et les cytomégalovirus (11). Les infections par ces virus chez la mère pendant la grossesse entraîneraient une augmentation du risque de développement du DT1 chez les enfants (12). Les entérovirus ont un tropisme pour les cellules β du pancréas où ils provoquent une lyse cellulaire et une inflammation. Des antigènes de ces entérovirus sont très proches de protéines des cellules β et le système immunitaire n'est pas capable de les différencier. Cela provoquerait un détournement de la réponse immunitaire contre les cellules pancréatiques (13).

- L'alimentation :

La consommation de lait de vache au cours de la petite enfance impliquerait une élévation du risque de développement d'un DT1 (14). Plusieurs protéines du lait ont été suspectées, mais pour l'heure, c'est la A1 β -caséine qui semble augmenter l'incidence du DT1 chez les souris NOD (*non obese diabetic*) (15). Ces souris sont utilisées en tant que modèle pour l'étude du DT1. La consommation de certaines protéines du lactosérum est également liée à la survenue de la maladie (16).

La consommation de gluten est aussi à l'origine de l'augmentation de l'incidence du DT1, chez les souris NOD et les rats Biobreeding (souche consanguine de rat de laboratoire qui développe spontanément un diabète auto-immun) (17). Les additifs alimentaires comme les nitrates et les nitrites, qui sont ensuite transformés en nitrosamines dans l'intestin, ont été associés au risque d'un développement du DT1 dans une étude épidémiologique finlandaise (18).

➤ Perméabilité et inflammation intestinale

L'augmentation de la perméabilité intestinale a été décrite comme un facteur favorisant le DT1, aussi bien chez les animaux que chez les humains (19,20). Cette perméabilité peut être favorisée par un autre facteur environnemental décrit précédemment: les infections virales (21,22). Une conséquence de cette perméabilité est l'augmentation de l'exposition des antigènes luminaux dans le compartiment sous-épithélial. Ceci entraîne un renforcement de l'activation du système immunitaire et une réaction inflammatoire pouvant aboutir à une réaction auto-immune. Cette réaction auto-immune pourra se retourner contre les cellules β pancréatiques, via le lien entre l'intestin et le pancréas. Le rôle du microbiote intestinal rentre également en ligne de compte. Le microbiote régule la perméabilité intestinale par la bonne expression des protéines des jonctions serrées intercellulaires (23).

• Diagnostic

Le diagnostic du DT1 est généralement établi chez des patients jeunes (âge < 35 ans). La découverte d'un DT1 a souvent lieu au cours d'une hospitalisation suite à des signes graves d'hypo ou d'hyperglycémie. La survenue des premiers symptômes est très rapide avec une hyperglycémie majeure et une cétose (accumulation dans l'organisme de corps cétoniques, substances produites lors de la dégradation des graisses) (24).

• Symptomatologie

Les signes cliniques les plus répandus du diabète de type 1 sont : la polydipsie (soif excessive), la polyphagie (faim excessive et absence de satiété), la polyurie (urine abondante), un amaigrissement important et une asthénie profonde. À ces symptômes typiques, d'autres signes sont retrouvés comme des infections récurrentes et des problèmes de cicatrisation.

- Évolution et complications

Si le DT1 est non diagnostiqué ou mal contrôlé par un apport insulinique, des complications aiguës graves peuvent survenir comme l'acidocétose diabétique, le coma hyperosmolaire et l'hypoglycémie, complications que nous allons détailler ci-dessous.

- L'acidose diabétique :

L'insulinopénie du DT1 empêche l'utilisation du glucose comme source d'énergie par les muscles. C'est le métabolisme des lipides qui prend alors le relais pour fournir de l'énergie. Au niveau hépatique, la cétonogénèse se met en route et les corps cétoniques s'accumulent dans l'organisme. Les corps cétoniques acides sont responsables d'une diminution du pH sanguin et un tableau clinique caractéristique se met en place : polyurie, polydipsie, asthénie, anorexie, des troubles digestifs et une haleine cétonique inconstante (odeur de pomme). Si le patient n'est pas pris en charge en urgence avec une insulinothérapie adaptée, la symptomatologie se complique avec des signes neurologiques, un syndrome cardinal (polyuropolydipsie, amaigrissement, polyphagie et asthénie) sévère accompagné d'une déshydratation profonde (25) . On retrouve une cétose qui se caractérise par une haleine cétonique et est accompagnée des troubles digestifs : nausées, vomissements, diarrhées et douleurs abdominales. En plus de la cétose, on constate un syndrome d'acidose métabolique qui associe des signes respiratoires : polypnée voire dyspnée et des troubles neurologiques : confusion, stupeur et même un coma.

- Le coma hyperosmolaire :

Le coma hyperosmolaire se caractérise par une déshydratation massive. Sur le plan biologique, il y a une hyperglycémie majeure et une hypernatrémie qui seront à l'origine d'une hyperosmolarité (> 350 mmol/L). Ce type de coma se met en place par une polyurie insuffisamment compensée par les apports hydriques. Une insuffisance rénale fonctionnelle consécutive à une hypovolémie provoque une rétention sodée. Il n'y a pas de cétose, car il y a un taux d'insuline sanguin suffisant pour inhiber la lipolyse. Ce type de complication aiguë survient chez les personnes âgées (plus de 60 ans), qui ne perçoivent pas la sensation de soif. Le coma hyperosmolaire apparaît également chez des personnes dont le diagnostic de diabète n'est pas établi. L'hyperosmolarité peut être provoquée ou aggravée par des déshydratations (dûes à des vomissements, de la diarrhée, ou la prise de diurétique) et des hyperglycémies (dûes à la prise de corticoïdes, ou à des infections par exemple).

➤ L'hypoglycémie :

Les hypoglycémies surviennent chez les patients traités par un apport inapproprié d'insuline. Elles peuvent également survenir au cours d'un effort physique ou un apport glucidique insuffisant. Les symptômes propres à l'hypoglycémie sont : sueurs, vertiges, tremblements, asthénie, troubles de l'attention, nervosité, irritabilité, sensation de faim, palpitations, nausées et une peau froide et moite. Un des moyens pour augmenter sa glycémie rapidement est de consommer des sucres rapides (morceaux de sucres, miel, soda...).

Les complications à long terme du DT1 sont sensiblement les mêmes que celles du DT2 et seront détaillées dans la prochaine partie.

1.2.2 Le diabète de type 2

Ce type de diabète représente la majorité des cas. On estime que 92% des diabétiques en sont atteints (26).

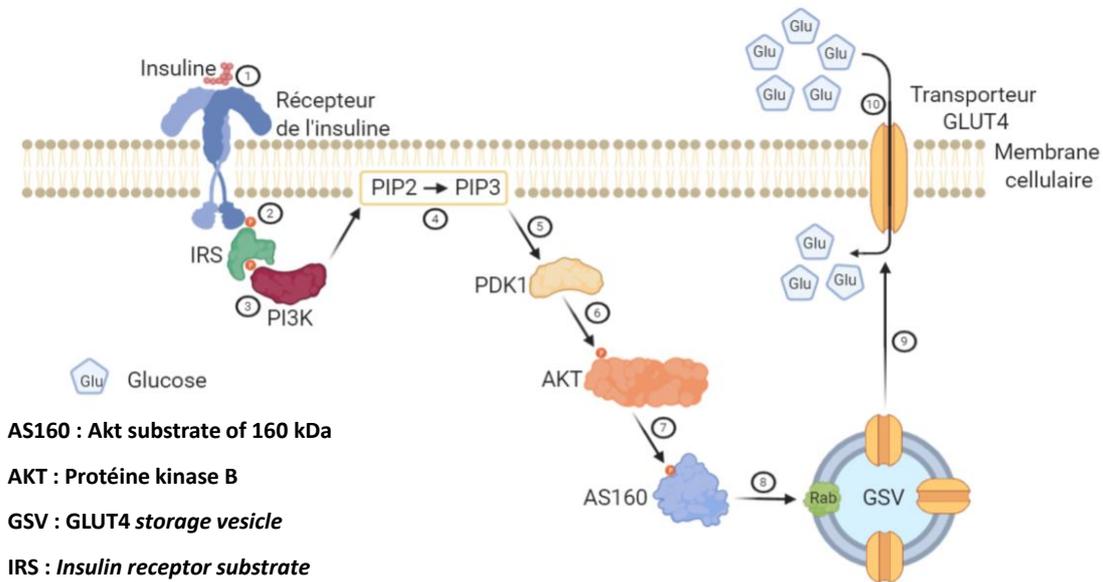
- Étiologie et mécanisme pathologique

Contrairement au DT1, le manque d'insuline n'est pas déterminant dans l'apparition de ce type de diabète. La cause réside dans une diminution de la sensibilité de l'organisme à l'action de l'insuline menant à l'insulinorésistance. On définit l'insulinorésistance comme un état de diminution de la réponse cellulaire et tissulaire à l'insuline. Lorsque l'insulinorésistance est associée à la diminution de la capacité sécrétoire de l'insuline, il y a un risque de développement du DT2.

➤ Les mécanismes cellulaires de l'insulinorésistance

Le premier phénomène rencontré dans l'insulinorésistance est la diminution de la captation du glucose dans les muscles par défaut de la translocation d'un transporteur spécifique, le transporteur de glucose 4 (GLUT4) (27). Physiologiquement, la fixation de l'insuline à son récepteur va entraîner son autophosphorylation. Une fois le récepteur phosphorylé, il y a une stimulation de l'activité tyrosine kinase au niveau intracellulaire des tissus cibles de l'insuline. Les substrats cellulaires comme l'IRS-1 (*insulin receptor substrate-1*) puis l'enzyme phosphatidyl-inositol-3 kinase (PI3K) vont conduire *in fine* à la translocation du transporteur GLUT4.

Les mécanismes de la voie de signalisation cellulaire IRS-1, PI3K et Akt (aussi nommée protéine kinase B) après la fixation de l'insuline à son récepteur sont détaillés dans la **figure 2**.



- AS160 : Akt substrate of 160 kDa
- AKT : Protéine kinase B
- GSV : GLUT4 storage vesicle
- IRS : *Insulin receptor substrate*
- PDK1 : Phosphoinositide-dependent kinase-1
- PI3K : Phosphoinositol-3-kinase
- PIP2 : phosphatidyl-4,5-biphosphonate
- PIP3 : phosphatidylinositol - (3,4,5) - triphosphate

- ① Liaison de l'insuline à son récepteur et activation de son activité tyrosine-kinase
- ② Phosphorylation de l'IRS par le récepteur de l'insuline
- ③ Activation de sous-unité catalytique de PI3K par l'IRS
- ④ La PI3K activée convertie la PIP2 en PIP3 au niveau de la membrane cellulaire
- ⑤ La PIP3 régule à la hausse l'activité de la PDK1
- ⑥ La PDK1 active après phosphorylation la protéine AKT
- ⑦ AKT phosphoryle à son tour l'AS160
- ⑧ AS160 exerce stimule l'activité GTPase de la protéine Rab des vésicules GSV
- ⑨ Exocytose des vésicules GSV et expression du transporteur GLUT4 au niveau de la membrane cellulaire.
- ⑩ Entrée du glucose dans la cellule

Figure 2 : Voie de la signalisation cellulaire suite à la fixation de l'insuline à son récepteur (27)

Le diabète est lié à une diminution de l'entrée du glucose dans les cellules, mais également à une diminution de la phosphorylation du récepteur de l'insuline, de l'IRS-1, de la PI3K et de l' AS160 (Akt substrate of 160 kDa). Chez les patients atteints d'un DT2, il a été démontré que la translocation du GLUT4 induite par l'insuline est nettement réduite au niveau de leur muscle squelettique (28). Cette altération de la translocation du transporteur serait causée par un défaut dans la voie de signalisation cellulaire après l'étape de phosphorylation de l'AKT (voir **figure 2**).

De plus, le niveau d'expression de l'IRS-1 est diminué dans les cellules du tissu adipeux des personnes atteintes d'un DT2. La phosphorylation de l'IRS-1 étant une des premières étapes permettant l'expression membranaire du GLUT4, c'est toute la voie de signalisation de l'insuline qui est déficiente (29). Le niveau d'expression du GLUT4 dans le tissu adipeux s'en trouve réduit. Les défauts de la translocation du transporteur GLUT4 restent un axe majeur de recherche pour le développement de nouveaux principes actifs antidiabétiques (30).

➤ Inflammation et insulino-résistance

L'insulino-résistance est aussi liée à un état inflammatoire créé par une surcharge en tissu adipeux. De nos jours, les êtres humains vivent majoritairement en milieu urbain et mènent un mode de vie sédentaire. Ce mode de vie favorise le stockage de l'énergie dans les tissus adipeux. Une trop forte charge en tissus adipeux induit une augmentation de l'activité du système immunitaire et un état pro-inflammatoire chronique (31). Chez les souris obèses, les cytokines comme le TNF- α (*tumor necrosis factor α*) ainsi que des interleukines sont surexprimées dans le tissu adipeux. Dans les cellules insulinosensibles, le TNF- α phosphoryle le récepteur à l'insuline et l'IRS-1 (31). Ces deux phosphorylations empêchent la fixation de l'insuline à son récepteur et bloquent la cascade de signalisation cellulaire qui en découle (voir **figure 2**). Finalement, les cytokines pro-inflammatoires empêchent l'internalisation du glucose. Bien que ce phénomène soit bien décrit sur des souris, la relation entre le TNF- α et l'insulino-résistance est plus complexe chez l'homme. Une autre cytokine pro-inflammatoire, l'interleukine 6 (IL-6) est aussi sur-exprimée par le tissu adipeux viscéral. La résistance à l'insuline est corrélée au taux d'IL-6 sanguin chez l'homme (32). L'IL-6 diminue l'expression du transporteur du glucose GLUT4 et augmente la production de la protéine SOCS-3 (*suppressor of cytokine signalling-3*). La SOCS-3 après fixation au récepteur de l'insuline empêche son interaction avec l'IRS-1 dans les adipocytes et les cellules musculaires. L'expansion du tissu adipeux induit une pression sur les capillaires sanguins provoquant une hypoxie très localisée. Cette hypoxie est suffisante pour que d'autres médiateurs tels que : le JNK (*c-Jun NH₂-terminal kinase*), l'AP1 (protéine activatrice 1) et l'IKK/NFkappa B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) soient produits. Ces protéines sont impliquées dans la production de cytokines attirant des macrophages qui compliquent l'inflammation (32).

Le lien entre l'inflammation chronique, en réaction à une surcharge en tissu adipeux, et l'insulinorésistance a été démontré sur des souris obèses et invalidées génétiquement (*knock-out*) n'exprimant pas les médiateurs TNF- α , JNK et IKK. Ces souris obèses ont suivi un régime alimentaire enrichi en lipide et n'ont pas développé d'insulinorésistance (33,34). Les liens entre la surcharge en tissu adipeux et l'insulinorésistance sont résumés dans la **figure 3**.

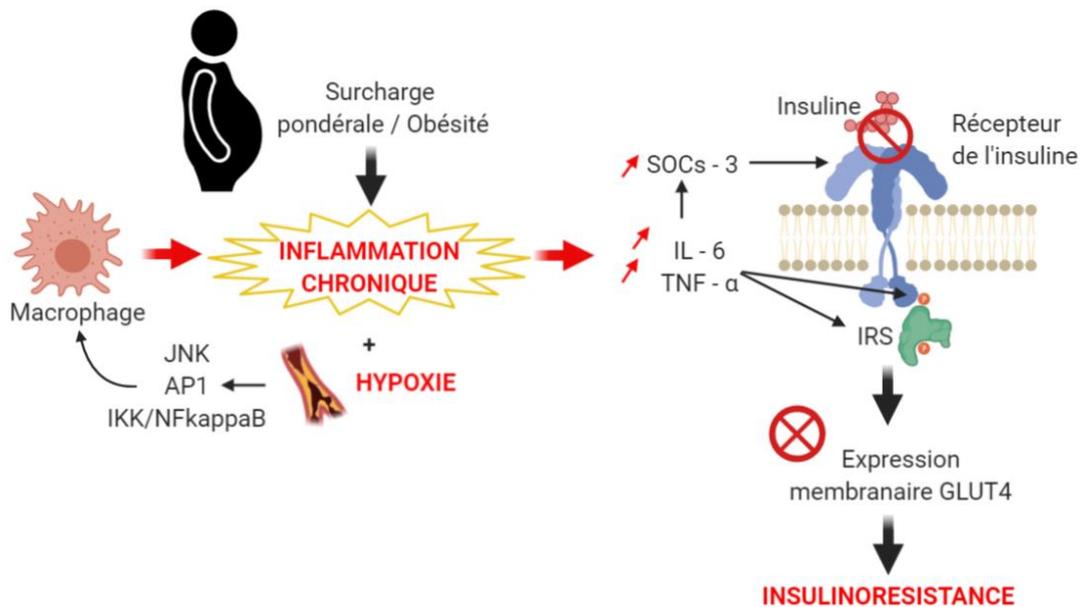


Figure 3 : Surcharge adipeuse, inflammation et insulinorésistance (31 - 33)

➤ Les acides gras non estérifiés et l'insulinorésistance

Le facteur le plus important qui fait le lien entre obésité et insulinorésistance est le taux d'acides gras non estérifiés (AGNE). Il est plus élevé chez les personnes obèses et atteintes d'un DT2 que dans le reste de la population (35,36). Au niveau des muscles, l'oxydation excessive d'acides gras inhibe les mécanismes de la transmission insulinique (27). Les métabolites issus de l'oxydation des acides gras libres musculaires, comme l'acyl-CoA et le diacylglycérol, activent la protéine kinase C (PKC) dont l'un des substrats est l'IRS-1. En phosphorylant l'IRS-1, la PKC diminue la transmission du signal insulinique et par conséquent le transport intracellulaire du glucose (37). Au niveau musculaire, les acides gras libres sont oxydés en priorité pour fournir de l'énergie au détriment du glucose. Au-delà de leur implication dans le développement de l'insulinorésistance musculaire, un taux trop élevé en AGNE va impacter l'ensemble des organes impliqués dans l'homéostasie glucidique.

Au niveau pancréatique, les acides gras ont un rôle de substrat énergétique pour les cellules β des îlots de Langerhans. Une exposition de courte durée entre acides gras et cellules β pancréatiques potentialise la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, mais cet effet est inversé en cas d'exposition prolongée. Un dernier phénomène de lipotoxicité induite par les AGNE a été décrit dans les cellules β pancréatiques. L'accumulation de triglycérides dans les îlots de Langerhans provoque une diminution de l'expression du transporteur GLUT2, une diminution de la sécrétion d'insuline et une accumulation de monoxyde d'azote (NO) (38). Cette accumulation de monoxyde d'azote bloque la chaîne respiratoire mitochondriale. Le cytochrome C est libéré par la mitochondrie et stimule une voie des caspases proapoptotiques (39).

Enfin, dans le foie, un taux d'acide gras libre élevé stimule la synthèse de triglycérides qui sont les carburants de la néoglucogénèse. Cette combinaison de diminution de l'utilisation du glucose par le muscle et de stimulation de la néoglucogénèse concourt à l'installation d'une hyperglycémie (40). Un schéma de synthèse de la lipotoxicité en lien avec le DT2 est présenté dans la **figure 4**.

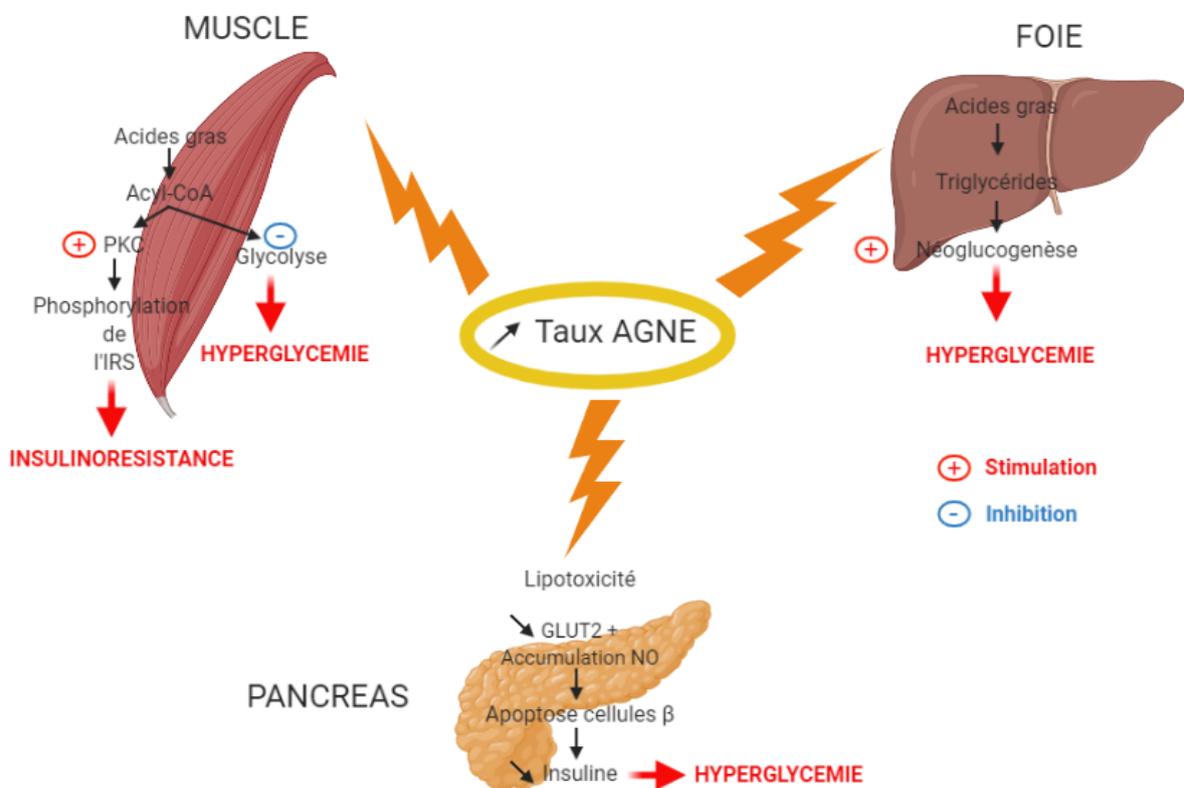


Figure 4 : L'implication des acides gras non estérifiés dans l'insulinorésistance et l'hyperglycémie (35 - 41)

Conjointement à l'insulinorésistance, l'insulinodéficience est aussi en cause dans la genèse du DT2. Des anomalies fonctionnelles des cellules β pancréatiques engendrent une inadaptation de la réponse et de la sécrétion de l'insuline. Une sécrétion déficitaire s'installe et la défaillance s'amplifie de façon inexorable tout au long de la maladie (41). Sur le plan génétique, un contexte héréditaire avec des antécédents familiaux pour la moitié des patients est également observé pour le DT2. Les gènes impliqués dans l'apparition de la pathologie et leur mode de transmission restent peu connus (42).

- Diagnostic

Le développement de la maladie étant lent et insidieux, l'âge autour duquel le diagnostic est établi va au-delà de 35 ans. Dans la moitié des cas, les patients présentent déjà des complications dégénératives liées à leur diabète au moment du dépistage. À l'inverse des patients atteints d'un DT1, qui présente un poids normal ou un amaigrissement, on retrouve une obésité ou une surcharge adipeuse abdominale lors du dépistage d'un DT2. L'hyperglycémie est souvent moins franche chez les patients atteints d'un DT2 (< 2 g/L) en comparaison du DT1 (> 3 g/L) (7).

- Symptomatologie

Bien souvent, les patients sont asymptomatiques du fait de la mise en place insidieuse de l'insulinorésistance et de l'hyperglycémie. Les signes cliniques les plus fréquents sont liés à des décompensations sévères avec une polyurie, une polydipsie, parfois un amaigrissement, des infections uro-génitales ou des infections récidivantes (7).

- Évolution du DT2

Si le diabète de type 2 n'est pas équilibré et devient chronique, des complications cliniques peuvent apparaître notamment au niveau des vaisseaux sanguins par des modifications de leur membrane endothéliale et leur rigidification (43). On parle alors de microangiopathies si ce sont les vaisseaux sanguins principaux qui sont affectés, et de microangiopathies si ce sont les artérioles périphériques. Ces complications apparaissent également dans le cas d'un mauvais suivi d'un DT1.

➤ Les microangiopathies

Les microangiopathies diabétiques se traduisent par une rétinopathie, une néphropathie et/ou des neuropathies (44). La rétinopathie est la complication oculaire la plus grave du diabète et une des premières causes de cécité dans les pays développés (45). La néphropathie correspond à une dilatation des glomérules sous l'augmentation de la pression intraglomérulaire. Au long court, les capacités de filtration du glomérule sont altérées et l'albumine détruit progressivement les segments distaux du néphron. La néphropathie diabétique est la première cause d'insuffisance rénale terminale (46). Pour les neuropathies, on retrouve une atteinte nerveuse au niveau des cellules de Schwann et/ou de l'axone. Un phénomène auto-immun par formation d'auto-anticorps anti-neurones est directement impliqué dans le processus physiopathologique des neuropathies diabétiques (47).

Ces neuropathies se divisent en deux grandes classes : les neuropathies périphériques et les neuropathies autonomes. Les neuropathies périphériques touchent principalement les membres inférieurs et parfois les mains. La composante sensitive des neuropathies périphériques résulte de l'atteinte des grandes fibres myélinisées. Cela a un impact délétère sur la sensibilité proprioceptive et vibratoire. La composante motrice est plus rare. Elle conduit à une atrophie musculaire au niveau des pieds et une diminution de la force de préhension dans les mains. Une conséquence des neuropathies périphériques correspond à l'apparition du « pied diabétique ». Cette pathologie reste la première cause d'hospitalisation prolongée (48). Les diabétiques ont une perte de sensibilité au niveau des membres inférieurs qui conduisent à des déformations ostéo-articulaires. Cela favorise des ulcérations du pied ou mal perforant plantaire. La formation de ces plaies peut dégénérer en nécrose voire en gangrène si une infection survient. La neuropathie autonome, quant à elle, touche le système cardiovasculaire, le système digestif et l'appareil uro-génital. Il y a des répercussions sur le rythme cardiaque avec des tachycardies de repos, mais également des variabilités spontanées de la fréquence cardiaque. Une atteinte des fibres sympathiques provoque une hypotension orthostatique. Les atteintes sur le système digestif se manifestent par des douleurs de l'épigastre, des nausées et des vomissements. Les diarrhées motrices sont aussi un signe de l'apparition d'atteintes neuropathiques. On peut constater une atonie vésicale et des dysfonctions érectiles au niveau de l'appareil urogénital.

➤ Les macroangiopathies

Elles se traduisent par des pathologies coronariennes, des accidents vasculaires cérébraux et/ou de l'artérite des membres inférieurs. Les macroangiopathies sont les premières causes de mortalité chez les patients atteints d'un DT2 (49). Les facteurs de risques de macroangiopathie sont l'hypertension artérielle, la dyslipidémie, l'hypercoagulabilité et l'hyperhomocystéinémie. À ces facteurs de risque viennent s'ajouter les antécédents familiaux de maladies cardio-vasculaires, l'obésité, la sédentarité et la consommation de tabac. Les pathologies coronariennes chez les patients diabétiques apparaissent plus tôt que dans le reste de la population. L'atteinte est plus sévère et le pronostic souvent plus sombre. Sur le plan cardiaque, indépendamment de la macroangiopathie, une cardiomyopathie qui évolue progressivement vers une insuffisance cardiaque vient compléter le tableau clinique. L'ensemble explique une mortalité deux à trois fois plus élevée chez les patients diabétiques développant une pathologie coronarienne (50).

1.2.3 Le diabète gestationnel

Le diabète gestationnel (DG) est défini comme tout degré d'intolérance au glucose pendant la grossesse (51). Selon l'association américaine du diabète, 7% des grossesses aux États-Unis sont compliquées d'un diabète gestationnel. Les complications obstétriques et périnatales du diabète gestationnel augmentent le risque d'une mort intra-utérine durant les 4 à 8 dernières semaines de gestation. La macrosomie fœtale est la complication obstétricale la plus fréquente. La macrosomie trouve son origine dans l'hyperglycémie maternelle qui induit une hyperinsulinémie fœtale. Un grand nombre de femmes, qui ont eu un diabète gestationnel sont plus à risque de développer un DT2 après leur grossesse. On retrouve également une augmentation du risque d'obésité et/ou de DT2 pour les enfants dont la mère a présenté un diabète gravidique.

1.2.4 Résumé

Les principales caractéristiques différenciant les trois types de diabète sont répertoriées dans le **tableau 1**.

Tableau 1 : Principales caractéristiques des différents types de diabète

	DT1	DT2	DG
Etiologie	Complexe et pas totalement élucidée (facteurs environnementaux et prédispositions génétiques)	Insulino-résistance	Dérèglement hormonal
Mécanisme pathologique	Auto-immun	Insulino-résistance	Dérèglement hormonal
Diagnostic	Enfant et jeunes adultes Apparition de symptômes typiques : Amaigrissement, polyurie, polydipsie, polyphagie, xérostomie, asthénie, infections récurrentes Problèmes de cicatrisation	A l'âge adulte Consécutif à l'apparition de complications	24 ^{ème} semaine d'aménorrhée Surveillance glycémique dans un contexte de grossesse

1.3 Les thérapeutiques du diabète

1.3.1 Le traitement du diabète de type 1

La prise en charge médicamenteuse du diabète de type 1 repose sur la supplémentation en insuline, qui n'est plus produite par le pancréas. Avant ces supplémentations en insuline, des mesures diététiques étaient conseillées aux patients diabétiques (jeûne, restriction calorique). Il en résultait des diminutions des cas de coma et des améliorations de la glycosurie et de l'acidose, mais les complications chroniques persistaient (52).

Une observation importante a alors été faite en 1921 par le professeur roumain Nicolas Paulesco. Celui-ci remarqua, après injection d'extraits de pancréas, la normalisation glycémique chez un chien rendu diabétique par pancréatectomie. Suite à cette observation, de nombreux chercheurs se sont intéressés à ces extraits de pancréas pour pouvoir les administrer à l'être humain. En 1922, les premiers extraits de pancréas sont injectés à l'homme. Grâce à ces extraits, Leonard Thompson est le premier diabétique à réchapper d'un coma hyperglycémique (53). En 1923 des laboratoires, comme l'entreprise Eli Lilly, se mettent à produire de l'insuline. Celle-ci est extraite de pancréas de bœuf et de porc, afin de répondre à la demande mondiale.

Il faut attendre les années 1930 et les travaux du chimiste Hans Christian Hagedorn pour assister à la naissance des premières insulines à action prolongée (54). L'addition de protamine sur l'hormone permet un allongement de la durée d'action. Une deuxième manière d'allonger la durée d'action de l'insuline est découverte en 1936 au Canada par addition de zinc. En 1946, l'entreprise danoise Nordisk Insulin Laboratory réussit à former des cristaux de protamine et d'insuline. Ce type d'insuline dénommé Neutre Protamine Hagedorn (NPH) est encore largement utilisé aujourd'hui. Il faut attendre 1955, pour que la séquence d'acides aminés et la structure de l'insuline humaine soit déterminée par le biochimiste anglais Frederick Sanger. Les scientifiques s'aperçoivent qu'il existe des différences entre l'insuline humaine et les insulines animales jusqu'alors utilisées comme traitement. Il y a une différence de trois acides aminés pour l'insuline bovine et d'un acide aminé pour la porcine. La **figure 5** présente les différences entre les insulines humaines, bovines et porcines.

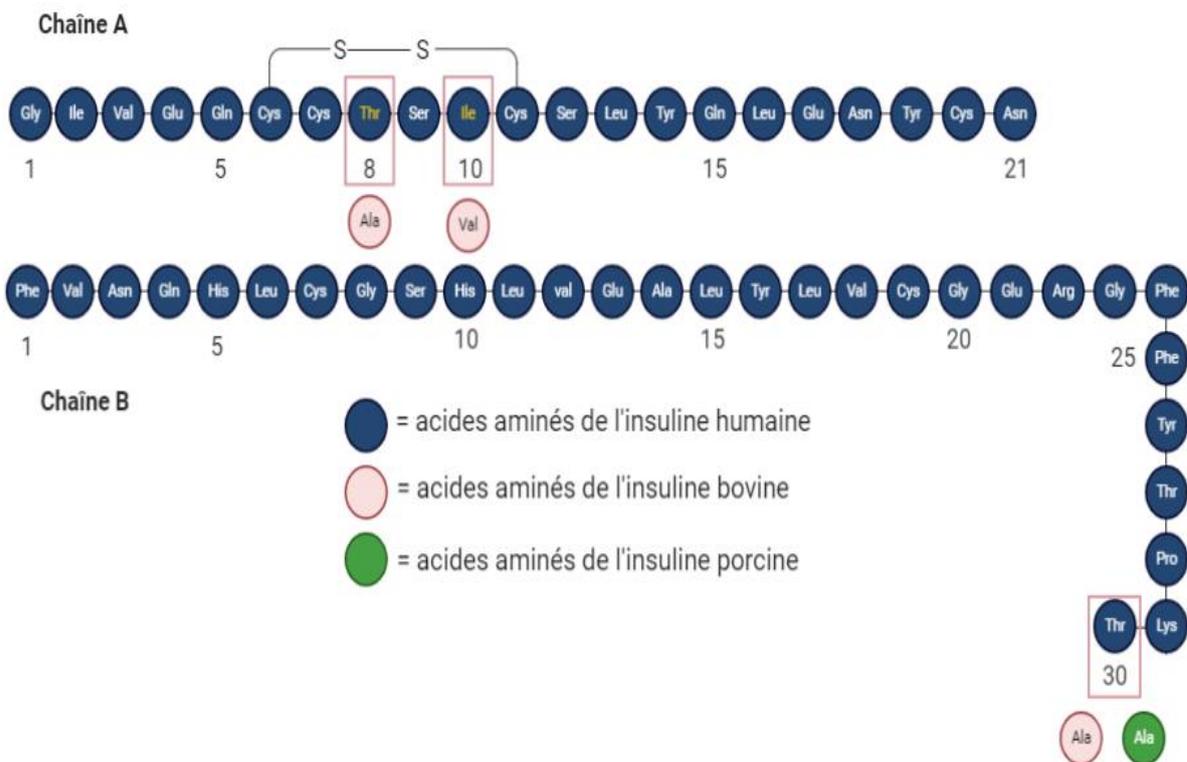


Figure 5 : Différences entre les insulines humaines, bovines et porcines

La qualité de l'insuline va alors s'améliorer et une humanisation des insulines animales est alors envisagée. En 1980, l'insuline de porc est humanisée en modifiant le seul acide aminé qui la distingue de l'insuline humaine. Avec le développement des techniques de génie génétique, la première insuline humaine à ADN recombinant (ADNr) a été produite en utilisant la bactérie *Escherichia coli*.

En 1982, les premières insulines utilisant la technologie de l'ADNr, l'Humulin® R (rapide) et N (NPH, à action intermédiaire), ont été commercialisées. Les analogues de l'insuline à action ultrarapide ont ensuite été développés par des modifications de certains acides aminés de la séquence originelle de l'insuline humaine. Ils présentent une absorption plus rapide après injection sous-cutanée (SC), un délai d'action réduit et une action plus brève (55). Parmi ces produits, on trouve l'insuline lispro, dont les acides aminés 28 et 29 de la chaîne B ont été inversés (56). En 2000, la FDA (*Food and Drug Administration*) approuve la commercialisation d'une autre insuline analogue, l'insuline aspart qui présente un acide aspartique à la place de la proline en position 28 de la chaîne B. Quatre ans plus tard, l'insuline glulisine fait son apparition avec une lysine à la place de l'asparagine en position 3 et un acide glutamique à la place de la lysine en position 29 de la chaîne B.

Afin d'assurer un équilibre glycémique des personnes souffrant d'un DT1 tout au long de la journée, deux analogues de l'insuline avec une action prolongée ont également été développés. Il s'agit de l'insuline glargine, qui contient une glycine au lieu de l'asparagine en position 21 de la chaîne A et deux arginines en plus à la fin de la chaîne B. L'insuline détémir quant à elle ne présente pas de modification dans la séquence peptidique en comparaison à l'insuline humaine. En revanche, une chaîne d'acides gras carbonée a été greffée sur la lysine en position B29 pour que son absorption soit ralentie. La première autorisation sur le marché de l'insuline dégludec par l'*European Medicines Agency* (EMA) date de 2013. Sur le plan chimique, une thréonine a été remplacée par un acide gras à longue chaîne couplé à un acide glutamique et lié à une lysine. Cet analogue de l'insuline est injecté sous forme de dihexamère. Cette formulation permet une libération très lente et continue des monomères d'insuline dans la circulation sanguine. On parle alors d'insuline basale à action ultra-longue qui permet un meilleur contrôle de la glycémie à jeun et une réduction des hypoglycémies nocturnes (57). Les mélanges d'insulines ont apporté un confort dans la prise en charge de certains patients. Ce sont des formulations qui combinent une insuline basale d'action intermédiaire (insulines humaines ou analogues NPH) et une insuline d'action rapide (insuline humaine soluble dans Mixtard® et Humuline profil®, insuline lispro dans Humalog Mix® et une insuline asparte dans Novomix®). L'administration de ces mélanges d'insuline chez certains patients permet une meilleure normalisation glycémique par rapport à l'utilisation d'une seule insuline (58).

En résumé, les insulines actuellement sur le marché forment deux catégories en fonction de leur structure moléculaire : les insulines « humaines » recombinantes dont la séquence peptidique est identique à celle d'un être humain sain, et les insulines analogues, modifiées pour moduler leurs propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques. Ces dernières vont alors avoir des durées d'action variables. Le tableau de l'**Annexe I** répertorie l'ensemble des insulines disponibles sur le marché et leurs caractéristiques principales.

1.3.2 La prise en charge du diabète gestationnel

Le principal objectif de la prise en charge du diabète gestationnel est de réduire les complications périnatales sévères et la macrosomie. Chez la femme enceinte, les objectifs glycémiques sont une glycémie à jeun inférieure à 0,95 g/L et une glycémie postprandiale inférieure à 1,20 g/L (59). Pour atteindre ces objectifs, la première stratégie mise en place repose sur des mesures hygiéno-diététiques. Il est recommandé d'avoir une alimentation variée et équilibrée en quantité raisonnable. La consommation isolée d'aliments riches en sucre est à proscrire. Les différentes catégories d'aliments doivent respecter les proportions suivantes : 40 à 50 % de glucides lents, 30 à 45 % de lipides et 15 à 20 % de protéines (60). L'avis d'un nutritionniste ou d'un diététicien peut être d'un grand secours. Il établira une enquête alimentaire et surveillera attentivement la prise de poids tout au long de la grossesse. Si la patiente est obèse, le niveau énergétique doit être réduit, sans aller en dessous de 1600 kcal/jour (61). Un régime sera mis en place si la prise de poids dépasse 1,8 kg/mois (60). En plus des mesures qui concernent l'alimentation, la pratique d'une activité physique adaptée à la grossesse comme de la gymnastique douce ou de la natation est également conseillée à raison d'environ 30 minutes d'activité quotidienne, 3 à 5 fois par semaine. Si ces mesures hygiéno-diététiques ne suffisent pas à obtenir un contrôle glycémique satisfaisant, l'insulinothérapie reste le traitement de référence. L'insuline ne traverse pas la barrière placentaire et par conséquent n'induit pas d'effet sur le fœtus. Le schéma général dans le cadre du traitement du diabète gestationnel repose sur 4 injections quotidiennes d'insuline. Le collège national des gynécologues et obstétriciens français propose une injection d'insuline avant chaque repas en cas d'hyperglycémies postprandiales et une injection d'insuline basale au coucher s'il y a une hyperglycémie à jeun (62).

Les antidiabétiques oraux (ADO) pourraient être une alternative à une insulinothérapie contraignante, notamment la metformine et le glibenclamide qui sont les molécules les plus étudiées (63,64). Néanmoins, peu de données sur l'utilisation de ces molécules pendant la grossesse sont actuellement disponibles et l'indication n'est pas présente dans leur dossier d'autorisation de mise sur le marché. Les ADO ne sont donc pas recommandés pendant la grossesse (59).

1.3.3 Les traitements du diabète de type 2

1.3.3.1 Les mesures hygiénodiététiques

La première mesure à prendre après le diagnostic d'un DT2 est l'instauration d'une diététique appropriée (65). Cette diététique consiste à rééquilibrer l'alimentation avec des régimes comparables à ceux indiqués dans la prise en charge hygiénodiététique du diabète gestationnel. Selon *l'American Diabetes Association*, les individus en stade de prédiabète ou de diabète établi doivent recevoir des conseils diététiques individualisés de la part d'un diététicien ou d'un nutritionniste (66). Cet entretien nutritionnel a pour objectif d'établir un rééquilibrage alimentaire sur la base de l'évaluation des besoins par rapport aux apports alimentaires. On commence généralement par étudier la consistance des repas, l'apport en glucides et la qualité générale du régime alimentaire du patient (66). Il est acté que les mesures diététiques permettent de prévenir la transformation d'une intolérance au glucose (perte de la sensibilité de l'organisme aux effets de l'insuline, mais sans hyperglycémie franche) en un DT2, et protège les patients déjà sous insuline d'une prise de poids excessive (67,68). Une activité physique et sportive pour les patients atteints d'un DT2 est également conseillée. En fonction des conditions physiques du patient et de son adhésion, il peut s'agir d'activités modérées (marche, escaliers plutôt qu'ascenseur...) voir plus intense comme la marche nordique, le jogging, le vélo, la nage, la danse... à raison de minimum 3 séances par semaine pour conserver les bénéfices cardiométaboliques. En parallèle, des exercices de renforcements musculaires sous la forme d'exercices de musculation en série sont prescrits 2 à 3 fois par semaine.

Chez les patients atteints d'un DT2, il y a une diminution franche de la glycémie lors de l'activité physique. En principe, il y a peu de risque d'hypoglycémie pour les personnes non médicamenteuses atteintes d'un DT2. Néanmoins, il est préférable d'effectuer un exercice physique après la prise alimentaire. Au long cours, l'activité physique entraîne une augmentation de la sensibilité de l'insuline au niveau des tissus insulinosensibles.

Cette amélioration de la tolérance au glucose devient permanente avec la répétition de l'exercice physique dans le temps. La pratique régulière d'une activité physique avec des efforts d'endurance et de renforcement musculaire diminue le risque de progression du diabète et donc d'apparition de complications micro et macrovasculaires. Il a été démontré qu'un régime de restriction calorique, combiné à une activité physique, réduit de moitié le risque de passage entre le stade d'intolérance au glucose et le diabète (69). Les mesures hygiéno-diététiques ont aussi une influence sur l'apparition des facteurs de risque liés au diabète comme les dyslipidémies, l'hypertension artérielle et les troubles de l'hémostase. Le régime et l'activité physique contribuent à la limitation de la progression des complications cardiovasculaires (70). Si l'objectif glycémique n'est pas atteint avec ces mesures hygiéno-diététiques, un traitement pharmacologique sera alors prescrit. Voyons un peu plus en détail ces traitements.

1.3.3.2 Les antidiabétiques oraux et analogues du GLP-1

La prise en charge médicamenteuse du DT2 repose dans un premier temps sur les ADO. Ceux-ci agissent sur différentes cibles clés du maintien de l'homéostasie glucidique. Les effets recherchés sont : la stimulation de la sécrétion d'insuline, la sensibilisation des cellules cibles de l'insuline, l'inhibition de la production hépatique du glucose et le ralentissement de l'absorption du glucose au niveau intestinale. Nous présenterons ici l'histoire du développement des principales familles de molécules faisant partie des ADO.

A) Les biguanides

La metformine fait partie de la famille des biguanides qui sont des principes actifs insulino-sensibilisants. C'est la molécule de première intention pour le traitement médicamenteux du DT2. Elle a été développée sur le modèle d'un alcaloïde de la plante *Galega officinalis* (*Fabaceae*) (71). Déjà au moyen-âge, cette plante était utilisée pour ses vertus hypoglycémiantes (72). Malheureusement, elle contient des analogues de la guanidine qui la rende toxique. Il faut alors attendre l'isolement de la galéguine par le pharmacien français Georges Tanret en 1914 et des tests *in vivo* de son dérivé sulfaté pour entrevoir une utilisation médicamenteuse (73). Suite à de nombreuses études de *drug design* sur la galéguine, des molécules comme la phenformine, la buformine et la metformine ont vu le jour. Ces dernières présentaient un bien meilleur potentiel hypoglycémiant et une faible toxicité en comparaison à la galéguine. La **figure 6** montre l'origine du développement de ces trois molécules ainsi que leurs structures.



Galega officinalis

Wikimedia commons © Kurt Stueber

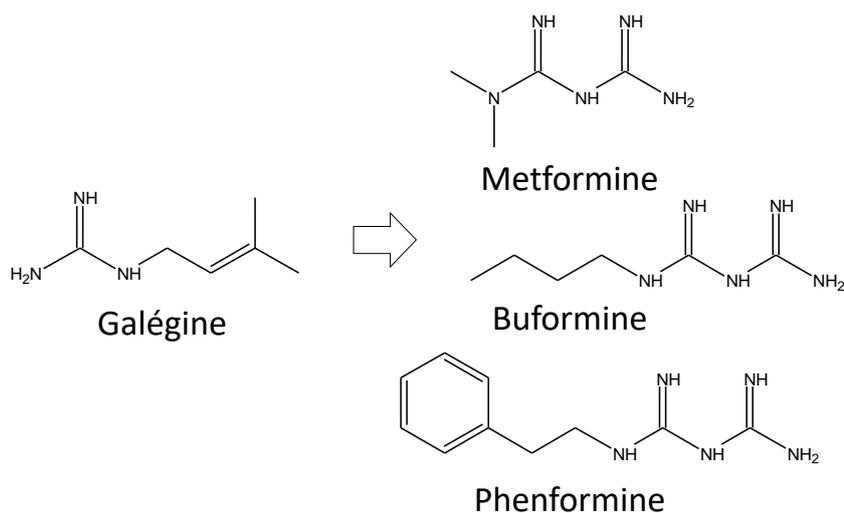


Figure 6 : Origine et développement des trois biguanides : metformine, buformine et phenformine

Néanmoins, la metformine est l'unique principe actif de cette catégorie des biguanides sur le marché en France. Des cas d'acidoses lactiques assez fréquents ont été observés avec la buformine et la phenformine. L'effet majoritaire de la metformine est d'inhiber la production hépatique du glucose. En plus de cette action, elle augmente la sensibilité des cellules musculaires à l'insuline, et donc la mise en réserve du glucose sous la forme de glycogène. Malgré toutes ces actions bénéfiques, ce biguanide engendre des effets indésirables au niveau gastro-intestinal. De rares acidoses lactiques peuvent également survenir au cours de son utilisation (74).

B) Les inhibiteurs de l' α -glucosidase

L'enzyme α -glucosidase a pour rôle de rendre les polysaccharides alimentaires absorbables par la barrière intestinale. Pour ce faire, ces polysaccharides sont dégradés en oligosaccharides et enfin en monosaccharides absorbables. Les inhibiteurs de l' α -glucosidase empêchent la formation de monosaccharides à partir d'oligosaccharides. Les oligosaccharides non absorbés sont ensuite fermentés par le microbiote intestinal ou sont évacués dans les selles. Le premier représentant des inhibiteurs de l' α -glucosidase est l'acarbose. C'est une molécule assimilée à un tétrasaccharide naturellement produit par une bactérie du genre *Actinoplanes*. Sa découverte résulte d'une campagne de criblage menée par la firme pharmaceutique Bayer dans le but de découvrir de nouveaux principes actifs hypoglycémiant. L'acarbose a été identifié comme un inhibiteur de différentes enzymes digestives comme l' α -amylase, α -glucosidase ainsi que des sucrares et maltases.

La similarité structurale de l'acarbose avec les polysaccharides en fait un inhibiteur compétitif réversible de l' α -glucosidase (75). Le second représentant de la famille des inhibiteurs de l' α -glucosidase est le miglitol. Il est d'origine hémisynthétique. À l'instar de l'acarbose, le miglitol est un inhibiteur réversible de l' α -glucosidase. Il présente une bien meilleure absorption systémique que l'acarbose. Sa découverte découle de l'étude des composés issus de microorganismes. Après la découverte de la nojirimycine et de la deoxynojirimycine, produits par des bactéries des genres *Bacillus* et *Streptomyces*, des dérivés hémisynthétiques de ces composés ont été mis au point pour aboutir au miglitol (76). Les principaux effets indésirables provoqués par les inhibiteurs de l' α -glucosidase sont des troubles gastro-intestinaux.

C) Les insulinosécréteurs

Deux groupes de composés sont présents dans cette catégorie : les sulfamides hypoglycémiantes et les glinides.

➤ Les sulfamides hypoglycémiantes :

Cette famille de molécules a tout d'abord été développée dans le cadre de la recherche d'antibactériens pour lutter contre la fièvre typhoïde. Durant les tests cliniques qui cherchaient à prouver leur pouvoir antibiotique, certains patients sont tombés en coma hypoglycémique (77). En synthétisant de nombreuses structures proches du composé testé contre la fièvre typhoïde (le sulfonamide para-amino-benzène-sulfamido-isopropylthiodiazol (2254 RP)), le mécanisme d'action de ces composés sur les cellules β pancréatiques a été mis en évidence. Les sulfamides hypoglycémiantes induisent une sécrétion d'insuline médiée par une entrée de calcium suite à leur fixation sur des canaux potassiques ATP-dépendants (78). Trois générations de cette famille de molécules se sont succédées. La première génération (carbutamide et tolazamide) a été délaissée au profit de la deuxième (glibenclamide, gliclazide, glipizide, glibornuride), car la toxicité était diminuée. Puis le glimépiride a été mis sur le marché, car il présentait de meilleures propriétés pharmacocinétique (durée d'action prolongée) (79). Malgré toutes ces améliorations, les patients traités par sulfamides hypoglycémiantes sont toujours sujets à un risque d'hypoglycémie et à d'autres effets indésirables touchant la peau (prurit, urticaire, érythème), le foie (ictère et hépatite) et le sang (hyponatrémie, thrombopénie, agranulocytose, leucopénie et anémie) (79).

➤ Les glinides :

C'est au cours d'un criblage sur des lignées cellulaires pancréatiques et sur des îlots pancréatiques isolés que les effets hypoglycémiants du répaglinide ont été découverts (80). Ces études exploraient le potentiel antidiabétique d'une banque de molécules dérivées de l'acide benzoïque dont le méglitinide était le chef de file (81). Le mécanisme d'action de ces analogues de l'acide benzoïque est semblable à celui des sulfamides hypoglycémiants. Ils ciblent également des canaux potassiques à la surface des cellules β pancréatiques (82). Les effets indésirables sont moindres qu'avec les sulfamides hypoglycémiants, mais le risque d'hypoglycémie est toujours élevé (83). Le seul représentant des glinides utilisé en France est le répaglinide. Les structures de l'acide benzoïque, du méglitinide et du répaglinide sont représentées dans la **figure 7** ci-dessous.

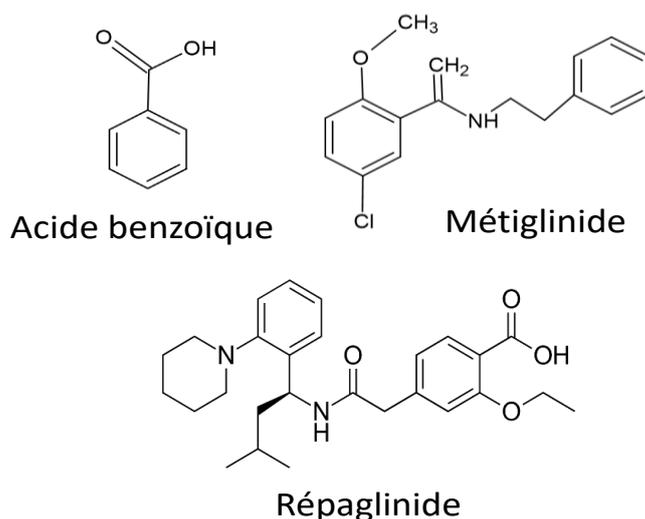


Figure 7 : Structure chimique de l'acide benzoïque, du méglitinide et du répaglinide

D) Les inhibiteurs des *sodium-linked glucose transporters 2*

Les inhibiteurs des canaux transporteurs *sodium-linked glucose transporters 2* (SGLT-2) sont aussi appelés gliflozines. Ces inhibiteurs exercent leur activité pharmacologique au niveau des tubes proximaux des néphrons où les transporteurs SGLT-2 sont responsables de 90% de la réabsorption du glucose. Le premier composé connu pour son action inhibitrice des SGLT-2 est la phlorizine. D'abord étudiée dans le cadre de la recherche sur de nouveaux composés antipyrétiques et dans le traitement du paludisme, la phlorizine est isolée du pommier en 1835. Après la découverte des canaux SGLT-2, les scientifiques ont démontré que l'affinité de fixation de la phlorizine y est 1000 à 3000 fois plus forte que pour le glucose (84). Malgré ces observations, la phlorizine est abandonnée comme candidat médicament.

La molécule présente une trop faible biodisponibilité orale et à des effets indésirables digestifs trop importants. Des études ultérieures ont permis d'aboutir à la modélisation d'un pharmacophore et ainsi à la commercialisation en Europe de trois molécules inhibitrices de SGLT-2 (85). À ce jour, une seule molécule appartenant à la famille des gliflozines est disponible en France, la dapagliflozine (86).

E) Les incrétinomimétiques

Cette classe pharmacologique concentre son action autour des incrétines. Les incrétines sont des hormones gastro-intestinales, qui vont exercer un effet hypoglycémiant après une prise alimentaire. Les incrétines sont le *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) et le *gastric inhibitory polypeptide* (GIP). La physiologie des incrétines et principalement du GLP-1 sera abordée en détail dans le troisième chapitre de ce manuscrit.

Deux catégories d'ADO sont retrouvées au sein des incrétinomimétiques:

- les inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase-4 (DPP4)
- les analogues du GLP-1
 - Les inhibiteurs de la DPP4

Ce sont les seuls ADO développés autour de la restauration des effets bénéfiques des incrétines. Comme l'indique leur classe pharmacologique, leur mécanisme d'action repose sur l'inhibition de l'enzyme DPP4. Physiologiquement, l'enzyme DPP4 dégrade très rapidement le GLP-1. De ce fait, le GLP-1 a une demi-vie extrêmement réduite de 1 à 2 minutes. Après sa dimérisation, les deux sites catalytiques de l'enzyme vont former une poche où le clivage en position N-terminal de la proline et de l'alanine du GLP-1 et du GIP aura lieu (87). En inhibant compétitivement cette enzyme, les inhibiteurs de la DPP4 prolongent la durée de vie du GLP-1 dans l'organisme. Des études montrent que l'administration d'inhibiteurs de la DPP4 multiplie par un facteur 2 à 4 la concentration de GLP-1 dans la circulation sanguine postprandiale (88). Historiquement, des premiers essais ont été réalisés avec la molécule valine-pyrrolidine dont les effets inhibiteurs de la DPP4 ont été démontrés chez des animaux. En effet, après l'administration de cette molécule chez le porc, la concentration et la demi-vie du GLP-1 sont augmentées (89). D'autres inhibiteurs de la DPP4 ont ensuite été étudiés au début des années 1990, comme l'isoleucine-thiazolidine. Ce composé augmentait la sécrétion de l'insuline et prolongeait la demi-vie du GLP-1 chez les rats Zucker obèses (90). Il faut attendre 2002 et la publication des premiers essais cliniques sur l'homme du composé NVP DPP728 pour affirmer l'intérêt de cette stratégie thérapeutique pour le traitement du DT2 (91).

Actuellement il existe trois inhibiteurs de la DPP4 sur le marché en France. La sitagliptine, la vildagliptine et la saxagliptine. Les effets secondaires de ces médicaments ne sont pas spécifiques. Cela vient du fait que l'enzyme DPP4 est une enzyme ubiquitaire. Parmi ces effets secondaires, on peut citer des troubles digestifs en début de traitement, des troubles hépatiques, des pancréatites, des vertiges et des troubles musculosquelettiques (92).

➤ Les analogues du GLP-1 :

Les analogues du GLP-1 sont des peptides dont la séquence d'acides aminés est très proche du GLP-1. Ils sont agonistes des récepteurs du GLP-1 (GLP-1R). Historiquement, le premier représentant des analogues du GLP-1 ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) est l'exénatide. La séquence peptidique de l'exénatide correspond à celle de l'exendine-4, qui a été identifiée pour la première fois dans la salive du Monstre de Gila, *Heloderma suspectum* (93). Le rôle physiologique de ce peptide chez ce reptile d'Amérique centrale n'est pas clairement élucidé. Ce qui est remarquable, c'est que l'exendine-4 présente 53 % d'homologie avec le GLP-1 des mammifères (93). Cette homologie est représentée dans la **figure 8**.

Séquence peptidique du GLP-1 (7-36) -NH₂ des mammifères :
HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGR-NH₂

Séquence peptidique de l'exénatide et de l'exendine - 4 :
H**GE**GTFTSD**LSKQME**EE**AVRLFIE**WL**KN**GPSSGAPPPS-NH₂

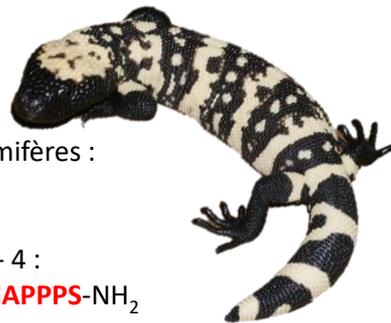


Figure 8 : Le Monstre de Gila (wikimedia commons © H. van der Ploeg) et l'homologie peptidique entre l'exendine-4 de son venin et le GLP-1

L'autre caractéristique importante de l'exendine-4 est qu'il n'est pas dégradé par l'enzyme DPP4 (94). De plus, l'exendine-4 et le GLP-1 partagent de nombreuses actions similaires dans la régulation glycémique comme la stimulation de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques et une réduction de la prise alimentaire (94,95). L'exénatide est commercialisé en France sous forme de stylo-injecteur appelé Byetta[®]. Ce peptide possède une demi-vie de 2,4 heures et une durée d'action de 3 à 8 heures (96). Ces paramètres pharmacocinétiques obligent les patients à répéter les injections deux fois par jour entraînant une observance pas toujours optimale.

Pour remédier à ce problème, d'autres analogues du GLP-1 ont été développés. Le premier d'entre eux fut le liraglutide. La séquence peptidique du liraglutide est en tout point similaire à celle du GLP-1 humain, hormis deux acides aminés. Une chaîne d'acides gras latérale a également été greffée afin d'éviter sa dégradation par la DPP-4 et augmenter sa demi-vie par liaison à l'albumine sérique (97). Ces modifications augmentent sa demi-vie à 12h et permettent ainsi une unique injection quotidienne. Le lixisenatide a ensuite été développé par le laboratoire Sanofi. C'est un autre peptide analogue du GLP-1 qui ne nécessite qu'une seule injection quotidienne (98). Toujours dans le but d'améliorer l'observance, un dimère d'analogues du GLP-1 couplé à une molécule d'albumine a été créé ; l'albiglutide. Cette formulation permet une demi-vie d'environ 5 jours (99). Bien que ces deux derniers analogues soient disponibles sur le marché européen, on ne les retrouve dans aucune spécialité pharmaceutique en France. En revanche, on retrouve en France une préparation galénique innovante de l'exénatide : par encapsulation dans des microsphères polymériques de PLGA (*poly(lactic-co-glycolic acid)*), permettant une seule injection hebdomadaire de cet analogue (100).

Les derniers peptides analogues du GLP-1 à faire leur apparition dans l'arsenal thérapeutique sont le dulaglutide et le sémaglutide. Le dulaglutide est formé des deux analogues du GLP-1 (GLP-1(7-37) ×2) liés de manière covalente à l'immunoglobuline humaine IgG4 (101). Enfin, le sémaglutide présente la substitution de deux acides aminés par rapport au GLP-1 humain et l'ajout, à l'aide d'un espaceur, d'une chaîne d'acide gras à 18 atomes de carbone. Son affinité par rapport au GLP-1R est certes beaucoup moins élevée en comparaison au liraglutide, mais sa fixation à l'albumine est nettement plus élevée. Cette caractéristique augmente sa demi-vie (environ 7 jours) (102). Le dulaglutide et le sémaglutide, commercialisés uniquement sous forme injectable, ne nécessitent qu'une seule injection hebdomadaire. Plus récemment, un essai clinique, qui comparait trois groupes (l'un recevant metformine + sémaglutide par voie orale, l'autre metformine + sémaglutide par voie SC et le dernier metformine + placebo par voie orale) a démontré l'efficacité de la prise orale du sémaglutide (103). Des formes par voie orale des analogues du GLP-1 pourraient voir le jour dans un avenir proche. L'**Annexe II** présente l'ensemble des structures des analogues du GLP-1 commercialisés en France ainsi que leurs homologies avec le GLP-1 et leurs caractéristiques pharmacocinétiques. Les effets indésirables les plus souvent rencontrés dans le cadre de l'utilisation des analogues du GLP-1 sont d'ordre digestif. Les patients présentent notamment des nausées, des vomissements et des diarrhées (104).

L'ensemble des traitements oraux dans la prise en charge du DT2 ainsi que leurs mécanismes d'actions sont résumés dans la **figure 9**.

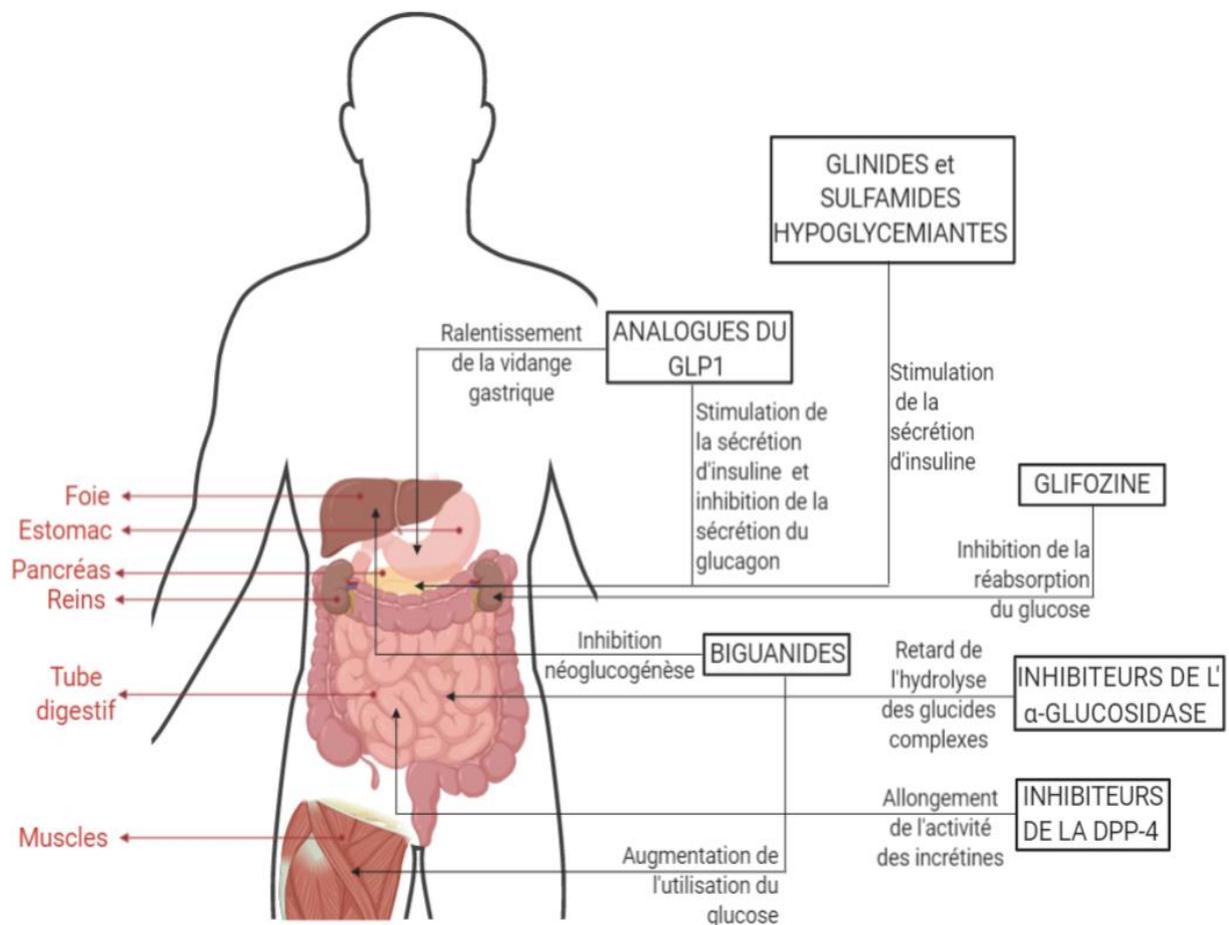


Figure 9 : Ensemble des antidiabétiques utilisés dans le traitement du DT2 et leurs actions pharmacologiques

1.3.3.3 L'insulinothérapie

Malgré l'ensemble des classes pharmacologiques disponibles et la diversité de leurs mécanismes d'actions, il se peut que les objectifs glycémiques ne soient pas atteints. La situation d'échec thérapeutique avec les ADO et/ou les analogues du GLP-1 impose le recours à une insulinothérapie (cf traitement du DT1).

1.3.4 Conclusion

Le diabète est une maladie complexe et d'origine multifactorielle. En s'intéressant de plus près aux traitements du diabète, on constate qu'un grand nombre sont d'origine naturelle. Ils proviennent aussi bien du règne végétal avec la metformine et les gliflozines, microbien avec les inhibiteurs de l' α -glucosidase ou encore animal avec les analogues du GLP-1. Les substances naturelles ont largement contribué à l'inspiration et au développement de nouveaux antidiabétiques. La dernière classe pharmacologique développée pour lutter contre le DT2 est celle des incrétinomimétiques, l'objectif étant de prolonger ou d'imiter l'action des incrélines et surtout du GLP-1 pour un bon maintien de l'homéostasie glucidique. Nous consacrerons la seconde partie de cet ouvrage au GLP-1, en traitant de sa physiologie, et des modèles utilisés en laboratoire pour étudier cette hormone intestinale si singulière.

Chapitre 2

Le GLP-1 et l'ensemble des modèles pour son étude

2.1 Le GLP-1

2.1.1 L'effet incrétine

Avant de rentrer dans les détails de la physiologie du GLP-1, il est fondamental de comprendre ce qu'est l'effet incrétine. Ce terme a été utilisé la première fois pour décrire la différence de sécrétion d'insuline lors d'une administration de glucose par voie orale et d'une administration par voie intraveineuse (IV). En effet, une charge de glucose par voie orale provoque une plus forte insulinosécrétion qu'une administration IV à glycémie équivalente (105). Cette différence de réponse a été attribuée aux hormones dites incrétines qui sont, comme évoqué précédemment, le GIP et le GLP-1. Une diminution de cet effet incrétine chez les patients DT2 a été mise en évidence dans les années 1980 (106). Cette réduction est attribuée à une action défectueuse du GIP couplée à une diminution de la sécrétion du GLP-1 (107,108). Le GIP est un peptide de 42 acides aminés sécrété par les cellules entéro-endocrines K principalement localisées dans le duodénum (109). Un des effets biologiques du GIP est une diminution de la mobilité gastrique. Au niveau pancréatique, il augmente la biosynthèse et l'exocytose de l'insuline (110). Il favorise également la survie des cellules β -pancréatiques. L'inefficacité du GIP est causée par une désensibilisation, combinée à une mauvaise expression de ses récepteurs au niveau de ces cellules cibles pancréatiques (111). Un accroissement de l'activité de l'enzyme DPP4 a également été décrit chez les personnes atteintes d'un DT2 (112). De multiples études ont rapportées une diminution de la sécrétion du GLP-1, hormone favorisant également la synthèse de l'insuline, dans le cas du DT2. Cependant, la cause de ce déficit de sécrétion n'a pas encore été identifiée. Il est possible que des mécanismes impliqués dans la biosynthèse du GLP-1 soient défectueux chez les patients diabétiques.

2.1.2 La biosynthèse du GLP-1

Comme nous l'avons brièvement décrit précédemment, le GLP-1 est une hormone sécrétée au niveau de l'intestin. Cette incrétine appartient à la famille des hormones dérivées du glucagon, qui ont toutes pour origine le proglucagon.

Ainsi, le GLP-1 est formé à partir à partir du proglucagon sous l'action de la prohormone convertase - 1/3 (PC-1/3), et ce de manière spécifique par les cellules L intestinales. Ces cellules entéro-endocrines se trouvent tout au long de l'intestin, principalement dans l'iléon et dans le côlon (113). En plus du GLP-1, ces cellules produisent également le peptide YY (PYY), l'oxyntomoduline et le GLP-2. Le PYY provoque un effet anorexigène par induction de la satiété au niveau hypothalamique (114). L'oxyntomoduline est sécrétée de manière concomitante au GLP-1 après un apport de nutriment. Tout comme le GLP-1, elle a pour origine le proglucagon et induit une réduction de la prise alimentaire (115). Le GLP-2, quant à lui, exerce son action principalement au niveau du tube digestif en ralentissant le transit gastrique et en augmentant les capacités d'absorption des nutriments (116). Le potentiel thérapeutique du GLP-2 est déjà exploité avec l'utilisation d'un analogue, le teduglutide, dans la prise en charge du syndrome du grêle court (117).

2.1.3 La sécrétion du GLP-1

La sécrétion du GLP-1 se fait une fois que les cellules L entrent en contact avec des nutriments et notamment les glucides et les acides gras. La morphologie des cellules L est idéale pour exercer leur fonction endocrine car elles présentent une surface apicale en contact avec la lumière de l'intestin, et une membrane basolatérale proche de la circulation sanguine. En plus de cette morphologie, les cellules intestinales L sont dotées d'une activité électrique (118). Ainsi, les composés situés dans la lumière intestinale stimulent ces cellules entéro-endocrines et provoquent une dépolarisation de leur membrane cellulaire. Cette dépolarisation déclenche un potentiel d'action, débouchant *in fine* à l'exocytose des vésicules contenant le GLP-1. Plus précisément, le glucose provoque la libération du GLP-1 par les cellules L via une voie de signalisation impliquant une hausse de l'ATP et l'ouverture de canaux potassiques K^+ . D'autres glucides provoquent également la sécrétion du GLP-1, mais après interaction avec le co-transporteur Na^+ /glucose SGLT-1 (106).

Des études ont démontré que les acides gras monoinsaturés induisent une plus grande libération du GLP-1 (119). Les lipides interagissent avec différents récepteurs couplés à des protéines G (RCPGs) dont les *free fatty acids receptors* 1, 2 et 3 (FFAR1, FFAR2 et FFAR3), les GPR119 (*G protein-coupled receptor* 119), le GPR40 et GPR120. Ces récepteurs sont situés à la surface apicale des cellules intestinales (dont les cellules L) (106). Le récepteur TRPA1 (*Transient Receptor Potential Ankyrin 1*) est un autre récepteur des acide gras polyinsaturés exprimés par les cellules entéroendocrines (120).

Les derniers nutriments stimulant la sécrétion de GLP-1 par les cellules L sont les hydrolysats de protéines. La glutamine est un acide aminé stimulant la sécrétion du GLP-1 chez des sujets normopondérés et obèses (121). Il semblerait que les acides aminés des protéines sont internalisés dans le milieu intracellulaire des cellules L par un transporteurs dépendant du sodium Na⁺. Cette rentrée de Na⁺ provoque une dépolarisation cellulaire et une augmentation de la concentration en calcium Ca²⁺. Le pouvoir sécrétagogue des acides aminés est beaucoup plus faible que celui des glucides et des acides gras (122).

En dehors des nutriments, des molécules endogènes sont aussi impliquées dans l'induction de la sécrétion du GLP-1. C'est le cas des acides biliaires comme l'acide cholique ou des hormones stéroïdiennes comme la progestérone. Encore une fois, la libération de l'incrétine est alors médiée via des RCPGs : les récepteurs TGR5 (*Takeda G-protein receptor-5*) (123,124). Des référents d'amertumes comme le benzoate de dénatonium et la quinine stimulent également la sécrétion du GLP-1 (125). Ces composés amers se fixent sur des RCPGs de la famille des TAS2R (*taste receptor 2*). D'autres molécules amères sont décrites comme étant des sécrétagogue du GLP-1. Ces composés seront abordés dans la dernière partie de ce manuscrit. Il existe une dernière catégorie de récepteurs impliqués dans la sécrétion du GLP-1. Il s'agit des canaux ionotropiques de la famille des *Transient Receptor Potential* TRP (126). Le TRPV1 (*transient receptor potential vanilloïde 1*) a été colocalisé avec le GLP-1 chez des cellules modèles des cellules L intestinales et au niveau de l'iléon de souris (127). Comme son nom l'indique, ce récepteur est sensible à l'action de molécules appartenant à la famille des vanilloïdes comme la capsaïcine du piment (128). La **figure 10** illustre la morphologie des cellules intestinales L et les mécanismes liés à l'exocytose du GLP-1 décrits dans les paragraphes précédents.

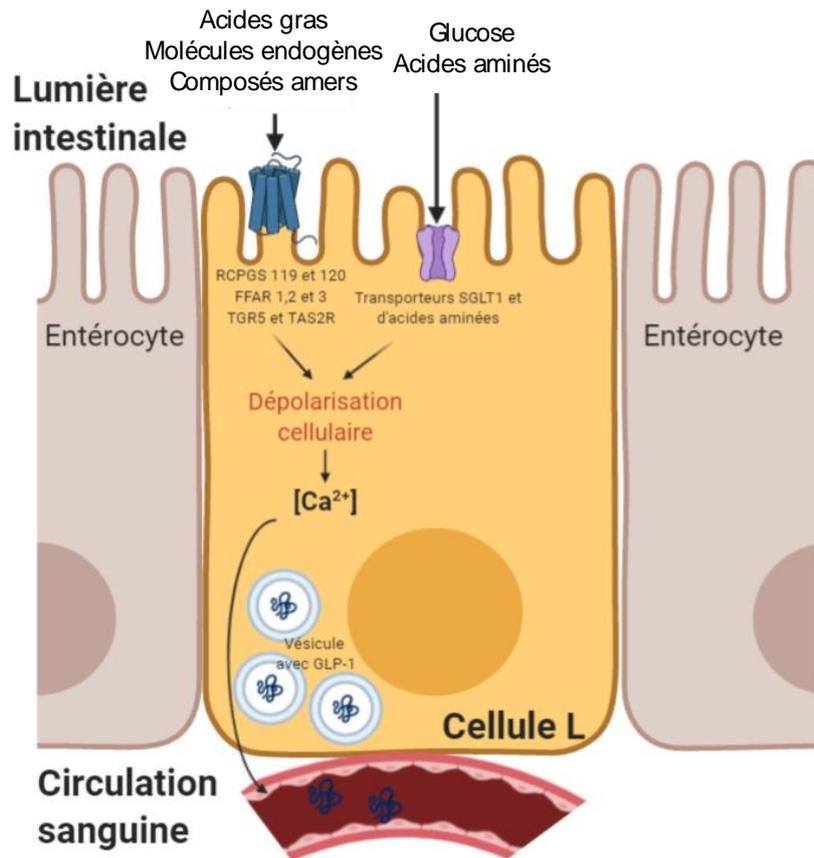


Figure 10 : Les cellules intestinales L et l'exocytose du GLP-1 (118 - 128)

La sécrétion du GLP-1 en réponse à un repas se produit en deux pics (129). Le premier pic a lieu 15 minutes après la prise alimentaire, avant que les nutriments ne puissent atteindre les cellules L intestinales. Il fait intervenir une boucle neuroendocrine. Les nutriments présents dans l'estomac ou dans l'intestin proximal stimulent la libération d'hormones telles que le GIP et la bombésine (130,131). Ces deux hormones ont le pouvoir, via des voies de signalisation vagues, de stimuler les cellules L et la libération du GLP-1. Le système nerveux entérique peut également être impliqué dans ce premier pic de sécrétion. Le deuxième pic de sécrétion est plus tardif et plus long dans le temps. Des contacts directs entre les nutriments et les cellules L en sont la cause. La concentration plasmatique normale du GLP-1, en situation de jeûne, se situe entre 5 et 10 pmol/L. Celle-ci peut être multipliée par 10 après un repas (132). Seulement 10% du GLP-1 sécrété par les cellules L intestinales se retrouvera dans la circulation sanguine et pourra exercer son effet biologique. L'action de l'enzyme DPP4 est la cause de cette faible proportion de GLP-1 circulant. Le clivage des incrétines par l'enzyme DPP4 a lieu au niveau des cellules endothéliales puis au niveau hépatique.

Ces découvertes sur la physiologie des incrétines ont menées au développement pharmaceutiques des inhibiteurs de la DPP4 (123,133). Une autre enzyme, la NEP (*neutral endopeptidase*) 24.11 est également responsable de la dégradation du GLP-1. L'enzyme NEP 24.11 dégrade l'hormone GLP-1 par clivage dans la région C-terminale. Néanmoins, cette voie de dégradation est mineure par rapport à celle de la DPP4. Il a été envisagé de développer des inhibiteurs de la NEP 24.11 à l'image des inhibiteurs de la DPP4. Ces recherches se sont cependant arrêtées à la suite d'apparition d'effets indésirables plus sévères que ceux entraînés par les inhibiteurs de la DPP4 (134). Dans la circulation sanguine, le GLP-1 est présent sous deux formes : le GLP-1 (7-36)amide, qui est la forme circulante majoritaire et le GLP-1 (7-37)amide (135). Ces deux formes circulantes ont une activité agoniste comparable sur les récepteurs du GLP-1 (GLP-1R).

2.1.4 Les récepteurs du GLP-1

Les GLP-1R appartiennent à la famille des RCPGs et plus précisément à celle des récepteurs au glucagon (136). Ces récepteurs sont composés d'un domaine extracellulaire qui se lie à la région C-terminale du GLP-1, et d'un domaine transmembranaire interagissant avec son extrémité N-terminale (137,138). Chez le rat, au niveau du système nerveux central, les GLP-1R sont présents de manière prédominante au niveau de l'hypothalamus en particulier dans les noyaux paraventriculaires et le noyau dorso-médian (139). Une quantité plus faible a été mise en évidence dans le noyau arqué (140). Dans le cerveau humain, des GLP-1R sont retrouvés dans le tronc cérébral et dans le thalamus (141). Au niveau du pancréas humain, les GLP-1R ont été retrouvés à la fois au niveau des îlots et des acini séreux. Leur présence prédomine dans les îlots où ils sont sélectivement exprimés à la surface des cellules β (142). Pour le reste des organes chez l'homme, les GLP-1R sont exprimés dans la glande de Brunner du duodénum, dans le gros et le petit intestin, au niveau des seins, de la thyroïde, des reins et des poumons (143).

2.1.5 Les effets biologiques du GLP-1

Après interaction avec les récepteurs pancréatiques, le GLP-1 stimule l'insulinosécrétion en réponse au glucose (144). En plus de cet effet insulinosécréteur, le GLP-1 active la transcription du gène de l'insuline et sa biosynthèse dans les cellules β (145). À l'inverse, il inhibe la sécrétion du glucagon au niveau des cellules α pancréatiques (144).

Il stimule la néogenèse et la prolifération des cellules β et les protège des effets toxiques provoqués par le glucose et les lipides (146,147). Enfin, il améliore la sensibilité à l'insuline des tissus qui y sont sensibles (148). Le GLP-1 a aussi des effets inhibiteurs sur la vidange gastrique. Cette inhibition est principalement régulée par le système nerveux autonome. Des voies à médiations vagales et des récepteurs centraux sont également impliqués dans cette inhibition (149). En effet, l'injection intra-cérébroventriculaire de l'incrétine inhibe la vidange gastrique par des voies non cholinergiques et non adrénergiques chez le rat (149). Il induit aussi une diminution de la prise alimentaire et par conséquent favorise une réduction du poids. L'induction de la satiété par le GLP-1 s'explique par son action au niveau de l'hypothalamus. L'action centrale du GLP-1 dans l'induction de la satiété a été démontré après des injections directes de l'incrétine dans le cerveau (150). Ces injections ont inhibé la prise alimentaire indépendamment de la présence de nutriments dans l'estomac. Le GLP-1 agit également au niveau périphérique dans la réduction de la prise alimentaire, mais les mécanismes impliqués sont encore à éclaircir. La dégradation rapide du GLP-1 par l'enzyme DPP4 dans les capillaires de la barrière intestinale suggère qu'il agit localement sur des neurones entériques ou vagues (151). Enfin, le GLP-1 module les fonctions motrices intestinales. Il provoque une réduction de la motilité intestinale après qu'il se soit fixé sur les GLP-1R des neurones entériques de la paroi gastro-intestinale (152). L'ensemble des effets biologiques du GLP-1 sur l'homéostasie glucidique sont résumés dans la **figure 11**.

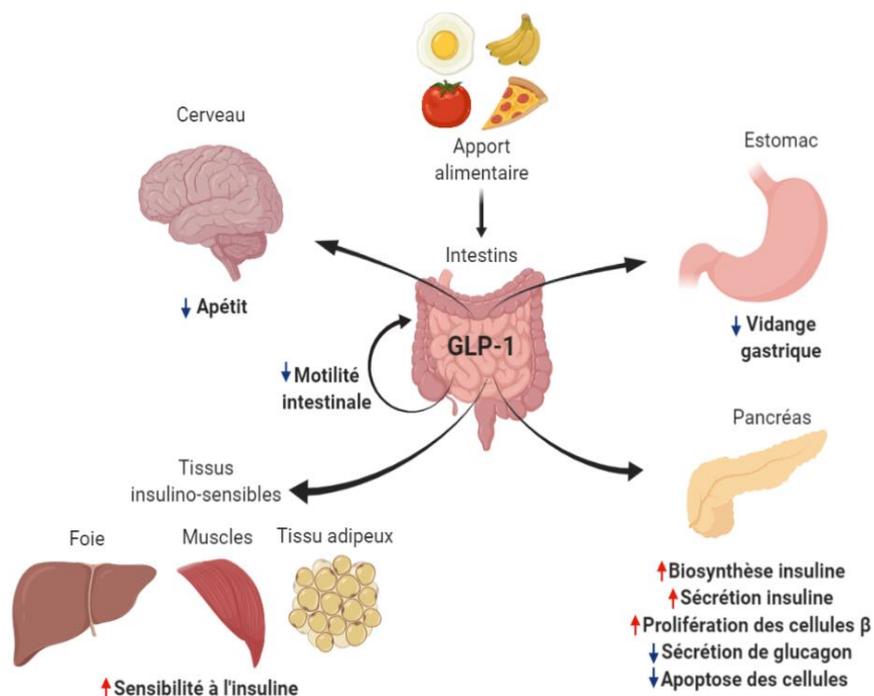


Figure 11 : Les actions biologiques du GLP-1 et leurs répercussions sur l'homéostasie glucidique

Au-delà des actions bénéfiques du GLP-1 sur l'équilibre glycémique, d'autres propriétés lui ont été attribuées. Il réduit par exemple le dépôt des acides gras au sein du tissu adipeux blanc et stimule la lipolyse (88). Sur le système cardiovasculaire, il améliore la dysfonction endothéliale chez les patients DT2 ayant une maladie coronarienne stable. La découverte des incrétines et notamment du GLP-1 a été une révolution dans la recherche de nouveaux médicaments dans la prise en charge du DT2. Toutes ces propriétés bénéfiques en font une cible de choix dans le développement de nouveaux traitements. L'approche de la prolongation de l'effet des incrétines ou l'apport exogène de GLP-1 ont permis d'améliorer l'équilibre glycémique de nombreux patients. Bien que les thérapeutiques développées autour du GLP-1 sont indiquées chez les patients atteints d'un DT2, les effets bénéfiques du GLP-1 sur le pancréas pourraient bénéficier aux personnes atteintes d'un DT1. Un nombre croissant d'études cliniques en diabétologie vont dans ce sens (153,154). Après avoir exposé la physiologie du GLP-1, nous allons décrire maintenant l'ensemble des modèles relatifs à son étude, en commençant par les différentes lignées cellulaires utilisées en laboratoire.

2.2 Les modèles *in vitro* de l'étude du GLP-1

2.2.1 Les cellules STC-1

Ces cellules proviennent d'une tumeur entéro-endocrine d'origine murine. La tumeur s'est développée dans le duodénum d'une souris transgénique (155). Cette lignée est de croissance relativement lente et est connue pour être hétérogène (différences morphologiques entre les cellules). À l'origine, ces cellules étaient utilisées en tant que modèle de cellules I natives produisant la cholécystokinine (CCK), une hormone peptidique gastro-intestinale sécrétée suite à l'arrivée des lipides et protéines alimentaires dans le duodénum. Elle possède une action digestive via la stimulation de la libération d'enzymes pancréatiques et biliaires. L'hormone CCK est également impliquée dans la répression de l'appétit, l'induction de la satiété et la douleur (156). Mise à part la CCK, les cellules STC-1 sécrètent un grand nombre d'hormones intestinales ayant un rôle physiologique dans la régulation de la satiété. On y retrouve le polypeptide GIP, le PYY, le polypeptide pancréatique, le GLP-1 et le GLP-2 (155,156).

Les molécules stimulant sa sécrétion peuvent être classées en quatre catégories :

- les molécules apportées par l'alimentation : les monosaccharides, les acides gras, les acides aminés aromatiques, les composés peptidomimétiques et les agents gustatifs amers (157–161)
- les neurotransmetteurs : l'acide gamma-aminobutyrique, l'acétylcholine, l'orexine, la bombésine (162)
- les hormones : l'apéline, les peptides libérateurs de la gastrine et la leptine (162).
- les acides biliaires (162)

Il y a donc une forte analogie entre les molécules qui stimulent la sécrétion du GLP-1 des cellules STC-1 et celles qui le font physiologiquement sur les cellules L intestinales. Cette sécrétion du GLP-1 et des autres hormones intestinales serait initiée par une augmentation de la concentration cytoplasmique en adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et en ions calciques Ca^{2+} . Les RCPG 40 et 120 ont été distingués comme des récepteurs médiant la sécrétion du GLP-1 chez les cellules STC-1 (163). La production du GLP-1 par les cellules STC-1 se rapproche de celle des cellules intestinales L natives. En effet, la biosynthèse du GLP-1 entraîne en parallèle l'expression du GLP-2 et d'autres peptides dérivés du proglucagon (glicentine et oxyntomoduline) (164). Ces deux molécules sont physiologiquement sécrétées par les cellules α pancréatiques. On peut donc dire que la lignée cellulaire STC-1 transforme le proglucagon d'une manière intermédiaire entre celle des cellules L intestinales et celle des cellules α pancréatiques (164). Le principal désavantage de l'utilisation de cette lignée réside dans la forte variation des niveaux de sécrétions des hormones intestinales. Des écarts ont été signalés entre différents laboratoires pour les mêmes composés sécrétagogues (160,165). L'explication vient probablement du fait que ce sont des cellules hétérogènes. Elles peuvent alors présenter de multiples états de différenciation pendant leur prolifération. De nombreux paramètres de culture comme la densité d'ensemencement, le renouvellement du milieu de culture, les lavages, le nombre de passages (procédé de sous-culture de cellules eucaryotes pour augmenter leur prolifération) ou encore la composition des tampons peuvent justifier ces variations. Il est généralement recommandé un minimum d'une dizaine de passages avant l'utilisation de la lignée STC-1. Une confirmation des résultats obtenus via l'utilisation d'autres modèles d'études des hormones intestinales est conseillée.

Une autre critique qui concerne plus largement l'emploi de lignées cellulaires peut être émise. En effet, en condition physiologique, si la sécrétion des hormones intestinales est directement stimulée par les nutriments dans la lumière intestinale, elle l'est également indirectement par des systèmes nerveux (166). Des phénomènes mécaniques sont aussi engagés. Or, il est aisément compréhensible que tous ces facteurs qui s'appliquent aux cellules intestinales natives ne le soient pas pour les cellules STC-1, qui sont cultivées *in vitro* sur une surface abiotique (plastique...).

Pour conclure, les cellules murines STC-1 sont un modèle *in vitro* d'étude de la sécrétion des hormones intestinales très répandu et largement utilisé. Ceci s'explique par le fait qu'elles produisent une grande variété d'hormones. Néanmoins, leur hétérogénéité et les variabilités de réponse nécessitent une confirmation des observations, via l'emploi d'autres modèles *in vitro* et/ou *in vivo*.

2.2.2 Les cellules GLUTag

Les cellules GLUTag dérivent de tumeurs du côlon de souris transgéniques exprimant l'antigène large T du virus simien 40 (*SV40 large T antigen*) sous le contrôle de promoteur du proglucagon (167). L'antigène large T du virus simien 40 est une oncoprotéine, qui induit des transformations néoplasiques une fois transfecté dans une cellule hôte. Il est utilisé pour l'immortalisation des cellules dans le but de faciliter leur culture *in vitro*. La forme prédominante du GLP-1 sécrétée par cette lignée cellulaire est le GLP-1 (7-36)amide. Comme nous l'avons vu précédemment, c'est la forme majoritairement produite par les cellules L intestinales. Comme les cellules L, les cellules GLUTag expriment un grand nombre de médiateurs et récepteurs impliqués dans la libération du GLP-1. Parmi les lignées cellulaires disponibles, les cellules GLUTag sont les plus spécifiques pour l'étude du GLP-1 par rapport aux autres hormones produites par les cellules entéroendocrines. Elles sont considérées comme le meilleur modèle d'étude des cellules L murines. Au même titre que chez les cellules STC-1, les glucides stimulent la sécrétion de GLP-1 chez les cellules GLUTag. Lorsque du glucose est ajouté à leur milieu de culture, même à des concentrations très faibles, la fréquence des potentiels d'action et l'exocytose de GLP-1 augmente (168). La sécrétion du GLP-1 médiée par les glucides par ce modèle semble impliquer les co-transporteurs sodium-glucose SGLT-1 et SGLT-3. En effet, après un courant entrant d'ions Na⁺, une dépolarisation cellulaire a lieu, conduisant successivement à une libération du GLP-1 (169).

Les lipides et les acides gras libres stimulent la sécrétion du GLP-1 par les cellules GLUTag (170). Un dérivé de l'acide oléique après transformation endogène, l'oléoyléthanoilamide, induit aussi une sécrétion du GLP-1 après interaction avec le RCPG GPR119 (171,172). Enfin, la glutamine est l'acide aminé qui provoque la plus forte sécrétion de GLP-1 par les cellules GLUTag. L'absorption de l'acide aminé au niveau cellulaire est couplée à une entrée de Ca^{2+} (173). L'alanine, la glycine et l'ornithine ont également fait preuve d'une action sécrétagogue du GLP-1 sur les cellules GLUTag, mais moindre que celle de la glutamine (174,175). D'autres molécules, qui ne sont pas en lien avec la nutrition, induisent une sécrétion du GLP-1. C'est le cas du GIP via une activation de la voie de signalisation de la protéine kinase A (176). La leptine et l'insuline sont d'autres hormones stimulant la sécrétion du GLP-1 sur ce modèle cellulaire. Une des singularités de cette lignée cellulaire tient dans le fait qu'elle possède une horloge métabolique interne qui peut être synchronisée (177). Cette caractéristique permet une forte répétabilité et reproductibilité des résultats dans le cadre de tests de sécrétion du GLP-1.

En conclusion, on peut dire que les cellules GLUTag présentent de nombreux avantages dans l'étude de la physiologie des cellules intestinales L et du GLP-1. Elles sont très proches phénotypiquement des cellules L et sont faciles à cultiver en laboratoire.

2.2.3 Les cellules NCI-H716

Cette lignée cellulaire cancéreuse provient du liquide d'ascite d'un patient de 33 ans caucasien atteint d'un cancer colorectal. L'activité endocrine de ces cellules a été étudiée suite à la découverte de granules denses dans le cytoplasme. Des scientifiques ont alors démontré l'expression et la sécrétion du GLP-1 par ces cellules (131). Les cellules NCI-H716 produisent le GLP-1 en grande quantité ce qui le rend plus facilement détectable. Actuellement, il s'agit du seul modèle cellulaire humain disponible pour l'étude *in vitro* du GLP-1. Ces cellules expriment un récepteur à la leptine, qui stimule la sécrétion de GLP-1 (178). Des récepteurs muscariniques M1, M2 et M3 ont également été identifiés par western-blot et immunocytochimie par fluorescence (179). Le récepteur à l'insuline est aussi exprimé par les cellules NCI-H716. C'est en utilisant ce modèle cellulaire que les scientifiques ont observé que l'insuline occasionnait une sécrétion massive de GLP-1.

Plus surprenant encore, après une mise en contact prolongée avec l'insuline, les cellules perdaient leur habileté de réponse à d'autres sécrétagogues du GLP-1 (180). Cette observation a permis d'établir un lien entre l'hyperinsulinisme et la diminution de la sécrétion du GLP-1, une caractéristique retrouvée chez les personnes atteintes d'un DT2. Les cellules NCI-H716 répondent au glucose via des récepteurs de goûts de type 1 et l' α -gustducine, une protéine G jouant un rôle clé dans la voie de transduction du goût (181). Pour ce qui est des lipides et des protéines, une étude a corrélié la stimulation de la sécrétion du GLP-1 et les produits laitiers. La leucine, l'isoleucine, la caséine et le lait écrémé ont ainsi stimulé sa sécrétion (182). Il existe une grande variabilité des résultats entre les différents groupes d'études (131,179). Il y a donc des problèmes de reproductibilité des résultats en utilisant ce modèle cellulaire. Les mêmes causes détaillées dans le chapitre sur les cellules STC-1 peuvent expliquer ces différences. Une autre critique peut être émise sur cette lignée cellulaire. Bien que ce soit la seule lignée cellulaire d'origine humaine pour l'étude du GLP-1, elle dérive d'une cellule tumorale qui est par définition indifférenciée. Il est possible que cette origine pose problème par rapport à l'expression des gènes du proglucagon.

Des composés améliorant l'expression du gène du proglucagon chez les rongeurs n'ont eu aucun impact sur l'expression de ce gène chez cellules NCI-H716 (183). Deux hypothèses ont été formulées à partir de cette observation : soit les cellules NCI-H716 ne régulent pas le gène du proglucagon de la même manière que le font les cellules entéro-endocrines humaines, soit la régulation de l'expression du proglucagon est espèce-dépendante. Bien que les cellules NCI-H716 soient le seul modèle d'étude des cellules L intestinale humaine, son utilisation implique l'utilisation d'autres modèles *in vitro* ou *in vivo* pour confirmer les hypothèses. Elles restent cependant un très bon outil pour l'étude de la régulation de la sécrétion du GLP-1 et de ses voies de signalisation.

2.2.4 Les cellules entéroendocrines L primaires

Les modèles cellulaires que nous venons de décrire sont des cellules transfectées immortelles. Cette caractéristique permet de les cultiver facilement. A l'inverse, les cellules L entéroendocrines primaires ont un nombre de divisions très limité avant de rentrer en sénescence, ce qui fait que le nombre d'études utilisant ces cellules pour la découverte de molécules sécrétagogues du GLP-1 est très réduit (162). L'obtention de cellules entéroendocrines primaires requiert le sacrifice de souris et la dissection des parties intestinales souhaitées.

Après avoir retiré la couche musculaire intestinale et opéré une digestion des tissus intestinaux par une collagénase, les cellules peuvent être cultivées dans des milieux de culture cellulaire classique comme le *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM). Néanmoins, la culture de cellules entéroendocrines primaires nécessite l'utilisation de Matrigel® (solidifiant qui forme une structure semblable à une membrane basale) pour faire adhérer les cellules au support de culture. Les cellules ainsi obtenues sont un mélange de cellules épithéliales et entéroendocrines, contrairement aux autres modèles cellulaires décrits précédemment qui ne sont constitués que d'une population cellulaire (184). Avant de réaliser des tests de sécrétion du GLP-1, il est nécessaire de s'assurer de sa production par les cellules obtenues. Il faut également prendre en considération que les cellules endocrines primaires représentent moins de 1% des cellules intestinales (185). De plus, la durée de vie maximale de ces cellules n'excède pas deux semaines (184).

Les cellules entéroendocrines modèles non primaires (STC1, GLUTag et NCI-H716) restent des modèles incontournables pour l'étude de la sécrétion du GLP-1 et la mise en évidence des mécanismes moléculaires engagés. En plus des tests sur la sécrétion du GLP-1, les investigateurs peuvent évaluer directement la toxicité des extraits ou des molécules testées sur la lignée cellulaire modèle. Parmi les tests de viabilité cellulaire les plus utilisés, on peut citer la réduction du 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT). Après la réduction enzymatique (oxydoréductase dépendante de la NADPH) de ce sel de tétrazolium en formazan de couleur violet, une simple mesure de la densité optique permet d'apprécier de manière relative la proportion de cellules métaboliquement actives. Un autre test de viabilité peut être utilisé par réduction enzymatique de la résazurine en résorufine, qui est ensuite mesurée par fluorimétrie. D'autre part, la technique de cytométrie en image permet un décompte des cellules vivantes ou mortes à l'aide de différents colorants (Hoechst, iodeure de propidium).

Le **tableau 2** récapitule les différents avantages et inconvénients relatifs à l'utilisation des précédentes lignées cellulaires présentées ici.

Tableau 2 : Avantages et inconvénients des différentes lignées cellulaires pour l'étude du GLP-1

	Cellules STC-1	Cellules GLUTag	Cellules NCI-H716	Cellules primaires
Avantages	Physiologie comparable aux cellules L	Bonne reproductibilité des résultats Culture facile et croissance rapide	Origine humaine (GLP-1 humain)	Origine humaine et identiques aux conditions physiologiques
Inconvénients	Origine murine Hétérogénéité (différents stades de différenciation) Problème de reproductibilité des résultats	Origine murine	Régulation du gène du proglucagon différente des cellules L Problèmes de reproductibilité des résultats	Sénescence (durée de vie limitée) Contraintes des conditions de culture

2.3 Les modèles *ex vivo* de l'étude du GLP-1

Les modèles *ex vivo* permettent de réaliser des tests biologiques sur des organes ou des segments d'organes au laboratoire. Les biopsies des parties distales de l'intestin humain sont difficiles à obtenir. L'utilisation de tissus non humains est une solution à cette limite. Au vu des similitudes anatomique et microscopique entre l'intestin humain et porcin, les segments intestinaux de porcs sont privilégiés pour l'étude de la sécrétion des hormones intestinales (186). Les régions de l'intestin les plus concentrées en cellules entéroendocrines L se trouvent au niveau distal du jéjunum, dans l'iléon et le colon (187). Jusqu'à présent, ce modèle *ex vivo* est assez peu utilisé, car sa durée de préservation ne dépasse pas 150 min. On obtient ce modèle de la façon suivante : après le sacrifice des porcs, la collecte des segments intestinaux doit être réalisée dans les 5 minutes. Ainsi, l'intestin est ouvert longitudinalement et les couches musculaires externes sont retirées. On peut aisément détailler les segments en cercle à l'aide d'un pinçon de biopsies pour les répartir dans des puits de culture avec la surface apicale vers le haut. Pour étudier les effets sécrétagogues d'une molécule sur les segments intestinaux, les composés à tester sont dilués dans un milieu approprié sans glucose et exposé pendant une heure à 37°C (162). Après l'exposition entre les échantillons à tester et les segments intestinaux, la teneur du milieu en GLP-1 est mesurée et la viabilité des tissus peut être évaluée selon trois méthodes différentes.

On peut effectuer des observations microscopiques, détecter des marqueurs de l'apoptose, ou encore mesurer la fuite de lactate déshydrogénase (LDH) intracellulaire. La LDH peut rapidement être détectée et une fuite supérieure à 10% par rapport aux segments témoins reflète une altération de l'intégrité des membranes cellulaires (188).

Ce modèle présente plusieurs avantages. En effet, il permet de prendre en compte les communications cellulaires entre les cellules épithéliales et les cellules entéroendocrines. On peut sélectionner des régions spécifiques de l'intestin. Néanmoins, au même titre que pour les cellules primaires, il n'est pas constitué d'une seule population cellulaire homogène. Par conséquent, les segments distaux d'intestin de porcs (SDIP) présentent des variations au niveau de la proportion en cellules entéroendocrines qui les composent (162). On retrouve des variations de la réponse biologique entre les provenances des segments en fonction des états de santé des animaux et surtout de leur régime alimentaire. Aucune étude n'a pris en compte les effets du microbiote quant aux réponses biologiques étudiées.

2.4 Les modèles *in vivo* de l'étude du GLP-1

Les modèles *in vivo* permettent de réaliser des études de la sécrétion du GLP-1 sur des organismes entiers. Le recours à ces modèles permet d'expérimenter différentes voies d'administration des extraits et des molécules à tester. Ils permettent aussi d'avoir des premières indications sur des paramètres pharmacocinétiques, pharmacodynamiques et toxicologiques. L'action du GLP-1 étant dépendante du glucose, un très grand nombre d'études sur les modèles animaux se font à la suite ou en concomitance d'une épreuve d'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) ou un test de tolérance au glucose par voie intrapéritonéale (TGIP). Généralement, une épreuve HGPO consiste en un gavage oral d'une forte dose de glucose (entre 2 et 5g/kg du poids corporel) et un test TGIP en l'injection d'une solution saline de glucose (2 g/kg du poids corporel). Nous présenterons ici les différents modèles murins (souris et rats) que l'on retrouve dans les articles scientifiques qui traitent de l'augmentation de la sécrétion du GLP-1 par des substances d'origine naturelle.

2.4.1 Les souris

2.4.1.1 Les souris *db/db*

Cette lignée de souris également appelée *Lepr^{db/db}* développe un diabète suite à l'inactivation du gène à l'origine du récepteur de la leptine (189).

Cette déficience au récepteur de la leptine leur confère une susceptibilité à l'obésité, au développement d'une résistance à l'insuline et au DT2 (190). Les souris *db/db* deviennent obèses au bout de 3 à 4 semaines et développent une hyperinsulinémie (au bout de 10 à 14 jours) puis un diabète (au bout de 4 à 8 semaines) (191). La gravité du diabète et les complications rénales associées réduisent l'espérance de vie de l'animal à 10 mois. Les souris *db/db* restent le modèle *in vivo* le plus utilisé pour l'étude du DT2 (192).

2.4.1.2 Les souris ddY

Cette lignée de souris tire son nom des origines géographiques de son développement (Deutschland, Denken, and Yoken) (193). Au Japon, la lignée ddY est très utilisée pour des essais précliniques, des tests pharmacologiques, pharmacocinétiques et toxicologiques (194). Par des sélections de reproduction et des modifications de leur régime, il est possible d'induire le diabète chez cette lignée (195,196). On constate des augmentations de l'excrétion urinaire et une glycosurie, ainsi qu'une augmentation de la masse corporelle pour les individus pour lesquels les expérimentateurs ont souhaité induire un diabète. Les souris diabétiques ddY présentent d'abord un syndrome de résistance à l'insuline puis développe des symptômes de la maladie en maintenant seulement une alimentation standard par des granulés (192).

2.4.1.3 Les souris C57BL/6J

Les souris C57BL/6J sont les souris les plus utilisées afin d'opérer des modifications génétiques dans le but de développer des modèles de maladies humaines. Ce sont des souris robustes, très faciles à élever en animalerie et un grand nombre de souches congéniques sont disponibles dans les catalogues car les modifications génétiques souhaitées sont obtenues rapidement et très bien conservées dans la descendance. Il est possible de provoquer le développement du diabète et de l'obésité chez ces souris par une alimentation riche en graisse et en glucides (192).

2.4.1.4 Les souris ICR

Les souris ICR sont des souris albinos originaires de Suisse et sélectionnées par le Dr Hauschka. Le nom provient de l'*Institute of Cancer Research* où elles ont été développées puis exportées dans le monde entier. Cette lignée murine peut développer un diabète consécutivement à des changements dans son alimentation ou l'utilisation d'agents chimiques comme la streptozotocine (198,199). La streptozotocine est un agent alkylant de la famille des nitroso-urées. Elle pénètre dans les cellules des mammifères via les transporteurs GLUT2.

Comme les cellules β pancréatiques sont les cellules qui expriment le plus ce transporteur, la streptozotocine est utilisée pour induire un DT1 chez les modèles animaux. À des doses faibles (~ 20 et 40 mg/kg par jour) et répétées, elle entraîne une diminution de la sécrétion de l'insuline sans détruire les cellules β (200).

2.4.2 Les rats

2.4.2.1 Les rats Wistar

La lignée de rats Wistar est issue du croisement de rats sauvages de l'espèce *Rattus norvegicus* à l'institut de Wistar de l'université de Pennsylvanie. Cette lignée albinos est à l'origine de nombreuses lignées de rats de laboratoires comme les rats Sprague-Dawley évoqués dans le paragraphe suivant. Le diabète chez les rats Wistar peut être observé après une sélection des individus sur la base de leur glycémie après un changement de régime alimentaire (201,202). Comme pour les souris ICR, une induction chimique d'un diabète est également possible via l'utilisation d'agents chimiques comme l'alloxane ou la streptozotocine (203,204). La première induction d'un diabète par l'alloxane chez un animal remonte à 1943 (205). Le mécanisme d'induction du diabète de l'alloxane repose sur la formation de radicaux superoxydes, de radicaux hydrogènes et de peroxyde d'hydrogène. Ces composés oxydants sont toxiques pour l'ensemble des organelles de cellules β . En plus de cette action oxydante, ces dérivés réactifs de l'oxygène vont provoquer des effets délétères directement sur l'ADN. Ces différents processus aboutissent *in fine* à la nécrose des cellules β dans les îlots de Langerhans (206). L'alloxane présente une structure proche de celle du glucose et partage les mêmes propriétés physicochimiques (forte hydrophilie). Le transport de l'alloxane dans le milieu intracellulaire est dépendant des transporteurs GLUT2 au même titre que la streptozotocine (200).

2.4.2.2 Les rats Sprague-Dawley

Les rats Sprague-Dawley (SD) font partie des rats de laboratoire les plus utilisés au monde. Cette popularité est due à une facilité d'élevage et au fait qu'ils puissent être utilisés dans de nombreux domaines de recherche comme la toxicologie, la pharmacologie ou la recherche comportementale. Une combinaison d'une faible dose (15 mg/kg) quotidienne de streptozotocine et d'un régime enrichi en graisse (30% des apports caloriques en gras) pendant deux mois permet d'initier un DT2 très proche de celui retrouvé chez l'homme. On retrouve chez ces animaux une hyperglycémie et une diminution de la sécrétion d'insuline combinée à une insulino-résistance (207).

2.4.2.3 Les rats Goto Kakizaki

Les rats Goto Kakizaki (GK) ont été développés après une sélection sur plusieurs générations de rats Wistar présentant des tolérances anormales au glucose. Ce sont des rats qui développent une hyperglycémie et une hypoinsulinémie sans obésité. L'altération de la tolérance au glucose apparaît dès la deuxième semaine de vie (202). D'un point de vue histologique, il y a une perte de 60% des cellules β pancréatique chez les rats GK adultes. Une perte de la sensibilité des cellules cibles de l'insuline (hépatocytes, adipocytes et cellules musculaires squelettiques) s'ajoute à cette déficience pancréatique (208). Toutes ces caractéristiques font des rats GK l'un des meilleurs modèles d'étude pour le DT2 et ses complications.

2.4.3 Conclusion

Il existe une large diversité de modèles *in vivo* pour la réalisation de tests pharmacologiques dans le cadre de la recherche de sécrétagogues du GLP-1. Le développement du diabète chez ces animaux peut être causé par des modifications génétiques, des changements dans le régime alimentaire ou par l'emploi d'agents chimiques toxiques pour le pancréas. Les rats GK sont les animaux qui présentent le plus de similitudes avec le DT2 chez les humains.

Après avoir décrit pourquoi le GLP-1 est une cible privilégiée pour le développement de nouvelles thérapeutiques antidiabétiques, nous proposons un répertoire des ressources naturelles qui provoquent une augmentation de la sécrétion de cette incrétine. Ce mécanisme d'action pharmacologique est innovant, car les thérapeutiques actuelles visent à prolonger la durée de vie du GLP-1 dans l'organisme (inhibiteurs de la DPP4), ou à apporter des analogues de ce dernier de manière exogène (analogues du GLP-1). Nous allons donc évoquer les plantes, leurs extraits et leurs composés isolés ayant démontré une action sécrétagogue du GLP-1 grâce à l'emploi des différents modèles décrits plus haut.

Chapitre 3

La recherche de sécrétagogues naturels du GLP-1

3.1 Les extraits de plantes sécrétagogues du GLP-1

Nous présenterons dans cette partie les extraits de plantes qui ont fait l'objet d'études sur des modèles *in vitro* et *in vivo* sans que les études n'aient pu permettre l'identification des molécules responsables de l'activité biologique. Un tableau récapitulatif de l'ensemble des activités des extraits de plantes présentés ici peut être consulté en **Annexe III**.

- *Anemarrhena asphodeloides*

A. asphodeloides (*Asparagaceae*) est une plante utilisée en médecine chinoise (209). En Corée, elle est prescrite pour lutter contre le diabète et ses extraits ont déjà démontrés dans la littérature un effet stimulant de l'insulinosécrétion chez des rats Wistar et GK (210). Après une extraction aqueuse de la plante, un fractionnement a été réalisé grâce à des solvants organiques de polarité croissante : Hexane (Hex), dichlorométhane (CH₂Cl₂), butanol (BuOH) et acétate d'éthyle (AcOEt). À une concentration de 100 µg/mL, la fraction AcOEt de l'extrait a provoqué la plus forte sécrétion du GLP-1 sur les cellules NCI-H716 en comparaison des autres fractions. De plus, cette sécrétion s'est révélée dose dépendante (209). Les chercheurs ont ensuite mené des investigations sur la régulation des gènes des cellules après leur exposition à la fraction AcOEt. Elles présentaient une diminution de l'expression des gènes codants pour les canaux potassiques volages dépendants. Les chercheurs supposent que cette modification implique une dépolarisation des cellules, et *in fine* la sécrétion du GLP-1 (211).

Malgré les efforts pour élucider la voie de signalisation de la sécrétion du GLP-1, cette étude n'identifie pas clairement les récepteurs cellulaires mobilisés. Des analyses chimiques permettant d'identifier les composés de la fraction doivent être réalisées. Leur isolement permettra de déterminer la ou les molécules d'*A. asphodeloides* responsables de l'augmentation de la sécrétion du GLP-1 par les cellules NCI-H716.

- *Beta vulgaris*

De précédentes études ont démontré un effet hypoglycémiant d'extrait de betteraves (*Beta vulgaris*, *Amaranthaceae*) sur des lapins sains et diabétiques (212). Une autre étude antérieure à celle-ci a démontré une augmentation du nombre de cellules β pancréatique chez des rats Swiss albinos traités par *B. vulgaris* (213). Les investigateurs ont constaté un pic plasmatique d'insuline 30 min après l'administration d'une fraction aqueuse d'un extrait éthanolique de *B. vulgaris* en concomitance à une HGPO chez des souris *db/db*. Cette insulinosécrétion était corrélée à une diminution de la glycémie (214). Afin de déterminer l'origine de ces variations biologiques, les chercheurs ont tenté de déterminer l'origine de cette insulinosécrétion. Après une administration chronique de 200 mg/kg de la fraction aqueuse pendant huit semaines, différentes hormones insulinosécrétrices ont été dosées dans le sang des animaux. Parmi les 9 hormones insulinosécrétrices dosées, seules les concentrations du GLP-1 et de l'acétylcholine ont été augmentées chez les souris ayant reçu de la betterave (214). Afin de vérifier si la sécrétion de GLP-1 induite par l'administration de la fraction aqueuse de la betterave était bien en lien avec l'augmentation de la sécrétion d'insuline ; les chercheurs ont utilisé un antagoniste des récepteurs GLP-1R : l'exendin 9-39 (300 pmol/kg/min pendant 30 minutes). Cette expérience a permis de montrer que les niveaux de GLP-1 sont comparables entre les souris qui ont reçu à la fois l'exendin 9-39 et la fraction active de la betterave et celles qui ont reçu seulement la fraction. Le taux plasmatique d'insuline est largement diminué chez les souris ayant reçu l'antagoniste. De ce fait, le lien entre l'effet sécrétagogue de la fraction et la stimulation de l'insulinosécrétion a pu être confirmé. Autre point remarquable, l'insulinémie restait supérieure chez les souris traitées avec l'exendin 9-39 par rapport aux souris contrôles. Cela pourrait signifier que des molécules de *B. vulgaris* provoqueraient directement une insulinosécrétion au niveau pancréatique (214). La saxagliptine (10 μ mol/L) a été administrée oralement 4h avant le traitement avec la fraction aqueuse de betterave et un gavage au glucose. La concentration plasmatique du GLP-1 a été multipliée par 2 après un traitement combiné de la fraction et de la saxagliptine par rapport aux souris non traitées (214). Il y a donc un effet synergique entre la fraction de *B. vulgaris* et la saxagliptine sur l'augmentation du GLP-1. Afin de vérifier l'effet insulinosécréteur direct, les chercheurs auraient pu exposer une ligné cellulaire entéroendocrine à la fraction aqueuse de l'extrait. En plus de l'utilisation de la saxagliptine, il aurait été intéressant d'étudier le pouvoir inhibiteur de l'extrait directement sur l'enzyme DPP4. Malgré ces résultats très encourageants, l'étude ne présente pas d'investigation chimique afin de trouver les molécules responsables de l'activité anti-hyperglycémiant de *B. vulgaris*.

- *Bupleurum falcatum*

Bupleurum falcatum (*Apiaceae*), plus connu sous le nom de Buplèvre en faux, fait l'objet d'un usage traditionnel en médecine coréenne. Une de ces indications est le traitement du diabète (215). La méthodologie d'extraction et de fractionnement de cette plante suit la même stratégie que pour la plante *A. asphodeloides*. La fraction hexanique (Hex) s'est montrée la plus active en multipliant par 26 la sécrétion du GLP-1 par rapport au contrôle à une dose de 500 µg/mL sur des cellules NCI-H716. Ces effets sont concentration dépendante (216). Cette sécrétion du GLP-1 semble impliquer la sous unité $G\beta\gamma$ des RCPG et l'activation de la phospholipase C. Le mécanisme de l'exocytose du GLP-1 a pu être déterminé par l'utilisation de différents inhibiteurs des médiateurs spécifiquement impliqués dans cette voie de signalisation. Une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la production de canaux potassiques voltages dépendants a été détectée après exposition des cellules à la fraction active (216). Une étude de la viabilité des cellules par réduction du MTT a été menée après leur exposition à la fraction Hex. Celle-ci a permis d'affirmer que la fraction n'est pas cytotoxique à l'encontre des cellules NCI-H716 même à une dose de 2000 µg/mL (216). Le fait d'évaluer la toxicité d'un extrait sur les cellules modèles permet d'affirmer que l'exocytose du GLP-1 n'est pas consécutive à une détérioration de la membrane cellulaire. Un profil obtenu par spectrométrie de masse de la fraction Hex a montré la présence de flavones telles que l'isosinensetine et de la sinensetine (216). Il n'existe pas encore d'étude sur la sécrétion du GLP-1 provoqué par un extrait de *B. falcatum* sur un modèle *in vivo*. Cependant, la fraction hexanique active *in vitro* a déjà démontré un effet hypoglycémiant sur des souris *db/db* (216). Le lien reste à être établi entre cet effet hypoglycémiant et une augmentation de la sécrétion du GLP-1 par les cellules L intestinales de rongeurs

- *Citrus aurantium*

L'usage traditionnel du bigaradier (*Citrus aurantium*, *Rutaceae*) est documenté dans de nombreuses pharmacologies orientales. Après l'obtention d'un extrait éthanolique de l'écorce, ce dernier a été fractionné selon la même méthodologie décrite pour la plantes *A. asphodeloides*. La fraction Hex de l'extrait éthanolique des écorces de *C. aurantium* s'est révélée la plus active en ce qui concerne la sécrétion du GLP-1 (217). Cette augmentation de la sécrétion est concentration dépendante et 15 fois plus importante en comparaison des cellules contrôles pour une concentration de 100 µg/mL. Pour la même dose, la fraction a provoqué une sécrétion presque trois fois plus importante que celle provoquée par le témoin positif (quinine 2 mM).

Une étude transcriptomique des cellules exposées à cette fraction suggère que la sécrétion du GLP-1 est consécutive à une dépolarisation impliquant les canaux potassiques voltage dépendant et un influx d'ions Ca^{2+} (217). Les investigations phytochimiques sur les extraits ou les fractions de plante n'ont pas permis d'identifier les molécules impliquées dans l'activité biologique.

- *Spergularia marina*

La spergulaire marine (*Spergularia marina*, *Caryophyllaceae*) est une plante halophile. Elle est considérée comme une plante alimentaire, à laquelle on prête des propriétés médicinales en Corée. Des études *in vivo* sur des modèles animaux ont démontré des propriétés hypoglycémiantes de cette plante (218,219). L'extrait hydroalcoolique de *Spergularia marina* a stimulé la sécrétion du GLP-1 chez les cellules NCI-H716 pour des concentrations comprises entre 100 et 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (220). Cette augmentation dose dépendante de la sécrétion est à nuancer en comparaison de celle entraînée par le témoin positif. En effet, l'acide lithocholique a provoqué des réponses comparables à une concentration de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (220). L'augmentation de la sécrétion du GLP-1 par l'extrait de *S. marina* est liée à une augmentation de la concentration intracellulaire des cellules en ions Ca^{2+} et en AMPc. En inhibant l'expression du récepteur membranaire TGR5, les réponses sur la sécrétion du GLP-1 ont été diminuées entre 30 et 60%. Ceci tant à prouver que le récepteur TGR-5 est impliqué dans l'action sécrétagogue de l'extrait de la spergulaire marine (220). Un test de viabilité cellulaire par réduction du MTT a été effectué pour évaluer la toxicité de l'extrait sur les cellules NCI-H716. Aucune atteinte à la viabilité des cellules n'a été détectée jusqu'à des concentrations de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (220). Malgré des analyses chromatographiques par chromatographie liquide haute performance (CLHP), les molécules constitutives de l'extrait n'ont pas été clairement caractérisées.

On constate que les médecines traditionnelles orientales et plus particulièrement asiatiques sont une ressource précieuse dans la recherche de nouveaux principes actifs antidiabétiques. Au vu de ces premières études exposées sur les extraits de plante, les cellules NCI-H716 semblent être un modèle cellulaire d'étude privilégié pour la recherche d'actifs sécrétagogues du GLP-1. Voyons maintenant ensemble l'activité d'extraits de plantes sécrétagogues du GLP-1 parmi lesquels les métabolites bioactifs ont pu être identifiés.

3.2 Les extraits de plantes et leurs métabolites sécrétagogues du GLP-1

À l'inverse de la partie précédente, nous établirons ici un état des lieux des connaissances actuelles concernant les extraits sécrétagogues de certaines plantes pour lesquels les métabolites actifs ont été isolés et identifiés. Les **annexes IV à XI** présentent des tableaux qui résument les doses, les modèles, et le niveau d'augmentation de la sécrétion du GLP-1 des extraits de plantes ainsi que de leurs molécules sécrétagogues.

3.2.1 *Gentiana scabra* et l'acide loganique

La gentiane du Japon (*Gentiana scabra*, *Gentianaceae*) est utilisée dans le traitement du diabète en Chine (221). Elle est traditionnellement prescrite sous la forme d'extraits aqueux de ses racines. L'étude ciblant la sécrétion du GLP-1 de *G. scabra* emprunte une méthodologie similaire à celle décrite avec *A. asphodeloides*. Après une extraction éthanolique de l'écorce de la plante, un fractionnement a été réalisé à l'aide de différents solvants : l'Hex, l'AcOEt, le CH₂Cl₂ et le BuOH. Pour une concentration de 100 µg/mL, c'est la fraction AcOEt qui a induit la plus forte augmentation de la sécrétion du GLP-1 par les cellules NCI-H716 (multiplication par 3). Les fractions CH₂Cl₂ et BuOH ont également provoqué une augmentation de la sécrétion du GLP-1 mais seulement à une concentration de 500 µg/mL (multiplication par 5 pour la fraction CH₂Cl₂ et par 4,5 pour la fraction BuOH) (222). Cette étude présente également des données sur le mécanisme d'action de la fraction AcOEt. En effet, les résultats montrent qu'il y a une activation de la sous unité G α et G $\beta\gamma$ des récepteurs RCPGs. En plus de l'activation de ces sous-unités, des gènes impliqués dans la production de récepteurs couplés aux protéines G ont été surexprimés. À l'inverse, des gènes impliqués dans l'expression de canaux potassiques voltages dépendants ont été sous exprimés suite à l'exposition des cellules avec la fraction AcOEt. Cette diminution de l'expression des gènes codant pour les canaux potassiques voltages dépendants avait également été décrite avec la fraction AcOEt d'*A. asphodeloides*. Ces analyses sur l'expression des gènes supposent que d'autres types de canaux sont impliqués dans la dépolarisation cellulaire liée à l'exocytose du GLP-1 (222). Dans une seconde étude, la même équipe de chercheurs coréens a confirmé l'effet potentiel de molécules de *G. scabra* sur la sécrétion du GLP-1. En utilisant le même modèle cellulaire, les scientifiques ont mis en évidence une augmentation dose-dépendante (entre 100 et 750 µg/mL) de la sécrétion du GLP-1 par l'extrait aqueux des racines de la gentiane japonaise (223). En ce qui concerne le mécanisme d'action, il semble que la sécrétion du GLP-1 fait intervenir la sous-unité $\beta\gamma$ des protéines G et l'inositol triphosphate (IP3).

L'implication des récepteurs aux composés amers a été mise en évidence par l'utilisation de deux inhibiteurs (la galléine et le borate de 2-aminoéthoxydiphényle). Après une activation de ces RCPG à travers leur sous-unité $\beta\gamma$, il y a une mobilisation de l' IP_3 qui va lui-même provoquer l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium Ca^{2+} (224). La dépolarisation des cellules endocrines qui est préalable à l'excrétion du GLP-1, découle de cette augmentation de la concentration intracellulaire du calcium.

Les conclusions tirées des observations sur les cellules ont été confrontées à des études *in vivo* sur des souris *db/db*. Après une administration unique de 300 mg/kg d'extrait aqueux des racines de *G. scabra*, les investigateurs ont collecté le sang des animaux toutes les dix minutes après une épreuve d'HGPO (223). Dix minutes après le début de l'expérience, la concentration en GLP-1 était sept fois plus élevée dans le plasma des souris ayant reçu l'extrait aqueux en comparaison des souris contrôles. Les recherches ont également permis de confirmer que l'extrait aqueux des racines de la gentiane du Japon diminuait la glycémie des rongeurs. Cet effet hypoglycémiant est bien lié à une augmentation importante du GLP-1 et de l'insuline après l'administration de l'extrait aqueux de la plante (223).

L'activité de l'extrait des racines de la plante est liée à l'action de l'acide loganique. Après des études analytiques, l'acide loganique, qui est l'un des constituants principaux de l'extrait, a bien démontré un effet sécrétagogue sur les cellules NCI-H716. Cependant, cet effet est plutôt faible avec une augmentation de 0,4 pM/mg de GLP-1 pour une concentration de 100 μ M (223). À ce jour, aucune étude scientifique n'a vérifié l'activité sécrétagogue de l'acide loganique vis-à-vis du GLP-1 *in vivo*. Il existe d'autres iridoïdes glycosylés dans le règne végétal plus commun que l'acide loganique, comme l'aucubine et la catalpol. Il serait judicieux d'entreprendre des investigations d'analogues de ces molécules afin d'émettre des hypothèses de relation entre leur structure et l'activité sécrétagogue du GLP-1

3.2.2 Les métabolites secondaires d'*Oparanthus teikiteetini*

La plante *Oparanthus teikiteetini* (*Asteraceae*) a fait l'objet pour la première fois d'investigations phytochimiques et d'évaluation des effets sur la sécrétion du GLP-1. Ces investigations ont été menées par une équipe de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg. Un extrait AcOEt des feuilles de cette plante a alors induit une augmentation de la sécrétion du GLP-1 sur la lignée cellulaire STC-1 à une concentration de 30 μ g/mL (224). L'isolement des molécules de l'extrait par différents procédés chromatographiques, a permis de purifier trois molécules sécrétagogues du GLP-1 à une concentration de 100 μ M.

Parmi ces trois molécules, le costunolide, molécule appartenant à la famille des lactones sesquiterpéniques, a eu un effet sécrétagogue du GLP-1 modéré. Le niveau d'augmentation de la sécrétion du GLP-1 était de 156 % par rapport aux cellules contrôles. De plus, le costunolide n'a pas provoqué d'effet toxique sur les cellules après leur comptage par cytométrie en image (224). Le costunolide a récemment entraîné un effet génotoxique sur des cellules ovariennes d'hamster (225). Cependant, de nombreuses études sur des modèles murins n'ont pas fait état d'une quelconque toxicité de cette molécule (226).

Avec le costunolide, deux autres molécules sécrétagogues du GLP-1 ont été isolées à partir de l'extrait AcOEt de feuilles d'*O. teikiteetini*. La 12-hydroxytrémétone, une molécule appartenant à la famille des benzofuranes, et qui a provoqué la plus forte sécrétion du GLP-1 par les cellules STC-1 (224). Le jasopyrane, un dérivé du benzopyrane, a entraîné une augmentation de la sécrétion du GLP-1 moins importante, mais significative. Les niveaux d'augmentation de la sécrétion du GLP-1 étaient respectivement de 305% pour la 12-hydroxytrémétone et de 218% pour la jasopyrane (224). À l'instar du costunolide, les benzofurane et benzopyranes ne se sont pas révélés toxiques vis-à-vis des cellules STC-1 (224). On peut noter que *Oparanthus teikiteetini* n'a pas encore de statut au regard des catégories de l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature). Cependant, comme elle ne se trouve que dans une zone géographique très spécifique, une exploitation industrielle de la plante dans un but médicinal est compromise. Ainsi la poursuite des études impose la recherche d'une autre voie d'approvisionnement en ces 3 composés. La 12-hydroxytrémétone est un des composés majoritaires de l'huile essentielle de l'hélichryse italienne (*Helichrysum italicum*, *Asteraceae*) (227). Le fait que cette plante soit cultivable offre une bonne alternative d'approvisionnement en métabolites bioactifs pour la poursuite des recherches. Néanmoins, la trémétone et d'autres composés proches sont connus pour leurs effets toxiques. Ces molécules sont à l'origine du « mal du lait » : un empoisonnement qui combine des vomissements, des douleurs intestinales et des tremblements (228). Bien que la cytométrie n'ait pas révélé d'effet toxique provoqué par la 12-hydroxytrémétone et le jasopyrane, certaines molécules appartenant aux mêmes classes phytochimiques (benzopyranes et benzofuranes) se sont révélées toxiques chez le singe et l'homme (229,230). Des tests *in vivo* sur la toxicité et le métabolisme de la 12-hydroxytrémétone et le jasopyrane devront être effectués.

Un résumé des informations importantes sur les effets sécrétagogues des extraits de *Gentiana scabra* et d'*Oparanthus teikiteetinii* et de leurs composés est disponible à travers le tableau présenté en **Annexe IV**.

3.2.3 *Momordica charantia* et les cucurbitanes

Le melon amer, *Momordica charantia* (*Cucurbitaceae*), est une plante qui a fait l'objet de nombreuses études de ses propriétés antidiabétiques (231). Une molécule en particulier, la charantine a entraîné des effets hypoglycémiant sur des lapins sains et diabétiques (232). L'ensemble des extraits (aqueux, AcOEt et éthanol) et fractions (fraction enrichie en molécules de bas poids moléculaire, fraction enrichie en molécules de haut poids moléculaire et fraction riche en *insulin - like peptide*) préparés à partir des fruits du melon amer ont entraîné une augmentation de la sécrétion du GLP-1 par les cellules STC-1 de manière dose dépendante. À une concentration de 70 µg/mL, c'est la fraction contenant les molécules de bas poids moléculaire (MBPM) (< 3 kD) qui a entraîné une meilleure potentialisation de la sécrétion du GLP-1. La fraction enrichie en composés amers a également retenu l'attention des chercheurs avec une multiplication par 3 de la sécrétion du GLP-1 par rapport à un niveau basal de sécrétion (233). Afin d'élucider quels mécanismes étaient mis en jeu dans cette augmentation de sécrétion du GLP-1, le probénécide (inhibiteur des récepteurs amers TAS2R16) et le composé U-73122 (inhibiteur de la phospholipase Cβ2) ont été mis en contact avec les cellules en même temps que les deux fractions. Une diminution drastique de la sécrétion du GLP-1 est constatée avec l'utilisation concomitante des inhibiteurs. Cela a permis d'affirmer que les récepteurs amers et la phospholipase Cβ2 sont impliqués dans l'effet sécrétagogue des extraits du melon amer (233).

En plus des tests cellulaires, il existe deux études qui traitent de l'effet sécrétagogue du GLP-1 de *M. charantia in vivo*. La première d'entre elles s'intéresse aux propriétés sécrétagogues de l'extrait aqueux des fruits chez les souris C57BL/6J. L'extrait aqueux en question a été divisé en fractions après filtration. L'une de ces fractions était enrichie en composés amers et une autre en « *peptide-like insuline* » (233). Ces peptides sont semblables à l'insuline et sont produits par certaines plantes (234). La fraction de l'extrait aqueuse contenant les MBPM a augmenté la concentration sérique en GLP-1 chez les souris C57BL/6J. Trente minutes après l'ingestion de 5g/kg de poids corporel de la fraction, la concentration plasmatique de GLP-1 a presque doublé en comparaison de celle des souris ayant reçu le véhicule (233).

De plus, les expérimentateurs n'ont pas mis en évidence d'action inhibitrice de l'enzyme DPP4 chez les souris ayant reçu la fraction. Ces données indiquent que l'effet sécrétagogue du melon amer décrit sur un modèle cellulaire est conservé *in vivo*. La deuxième étude sur l'extrait de *M. charantia* utilise un autre modèle *in vivo* : les rats Wistar sains et diabétiques (235). Vingt minutes après l'administration d'une seule dose de 300 mg/kg d'extrait, la concentration sanguine de GLP-1 augmente significativement chez les rats Wistar non diabétiques traités avec l'extrait par rapport aux rats non diabétiques contrôles. La même augmentation du taux de GLP-1 a été observée entre des rats diabétiques traités et contrôles. Cependant, cette augmentation chez les rats diabétiques n'était pas significative d'un point de vue statistique (235). Le taux de GLP-1 circulant reste supérieur, une heure après l'administration de l'extrait chez les rats diabétiques. Une administration répétée de l'extrait pendant 28 jours a considérablement augmenté le taux de GLP-1 circulant chez les rats diabétiques. Ce taux de GLP-1 sanguin reste plus élevé de 63% chez les rats diabétiques traités 50 minutes après l'administration de la dernière dose de l'extrait (235).

Les effets sécrétagogues d'extraits et de fractions du melon amer sur différents modèles d'études (cellules STC-1, souris C57BL/6J et rats Wistar) seraient causés notamment par des triterpènes de la famille des cucurbitanes (233,235). Deux composés purifiés de cette famille chimique : le 19-nor-cucurbita-5(10),6,8,22-(E),24-pentaen-3 β -ol que nous dénommerons Cucurbitane 1, et la karavilagénine E, ont été isolés à partir d'un extrait AcOEt de la plante (236). Ces deux triterpènes ont augmenté la sécrétion du GLP-1 par les cellules STC-1. Le Cucurbitane 1 a multiplié la sécrétion par 6 à 246 μ M, et la karavilagénine E par 3,5 à 440 μ M (233). Malgré ces résultats encourageants, l'effet sécrétagogue des cucurbitanes n'a pas encore fait l'objet d'étude sur un modèle *in vivo*.

3.2.4 *Fagonia cretica*, l'acide quinovique et ses dérivés

Fagonia cretica (*Zygophyllaceae*) est une plante s'épanouissant dans les climats semi-arides du pourtour méditerranéen. Les parties aériennes de la plante ont été extraites par macération dans un mélange équivalent en volume de chloroforme (CHCl₃) et de méthanol (MeOH) pendant 7 jours. L'extrait total obtenu a multiplié par 55 la sécrétion de GLP-1 à une concentration de 250 μ g/mL chez les cellules STC-1 pGIP/neo (237). Les cellules STC-1 pGIP/neo ont été obtenues par sélection sous clonale de cellules STC-1 produisant des quantités plus élevées de l'incrétine GIP (238).

En plus de l'augmentation de la sécrétion du GLP-1, les gènes spécifiques à la biosynthèse du GLP-1 comme le glucagon et la PC-1/3 ont été surexprimés chez les cellules exposées à l'extrait de *F. cretica*. Pour aller plus loin dans les investigations, l'extrait a été fractionné successivement par de l'Hex puis de l'AcOEt. C'est la fraction AcOEt de l'extrait, qui a présenté les meilleurs résultats sur la sécrétion du GLP-1 par les cellules (237). La toxicité de l'extrait a été évaluée par l'utilisation de bleu d'Alamar (résazurine). Ce test a permis de mettre en évidence que l'extrait de la plante *F. cretica* n'était pas toxique à l'encontre des cellules STC-1. Certains métabolites responsables de l'activité de l'extrait de *F. cretica* ont été isolés (237).

Après un isolement bioguidé, trois molécules : l'acide quinovique, l'acide-3 β -O- β -D-glycopyranoside quinovique (hétéroside acide quinovique 1) et l'ester de l'acide-3 β -O- β -D-glucopyranosyl-(28,1)-D-glucopyranosyl quinovique (hétéroside acide quinovique 2) ont été purifiées de l'extrait actif de *F. cretica*. L'acide quinovique ainsi que ses hétérosides ont significativement stimulé la sécrétion du GLP-1 à une concentration de 50 μ M. Le dérivé estérifié a provoqué la plus forte sécrétion du GLP-1 par les cellules STC-1 pGIP/Neo (\times 20) (237). Les dérivés de l'acide quinovique ont provoqué les mêmes modifications de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse du GLP-1 que l'extrait total (237). Les composés testés n'ont pas provoqué de toxicité sur les cellules STC-1 selon le même test de réduction de la résazurine. La sécrétion du GLP-1 par ces métabolites secondaires de *Fagonia cretica* semble impliquer le récepteur TGR5. Cependant, l'activation du récepteur TGR5 a été mise en évidence sur une autre lignée cellulaire que celle utilisée pour la sécrétion du GLP-1 (237). Après confirmation de l'activation du récepteur TGR5 par l'acide quinovique, de nouveaux dérivés pourraient être développés à partir de ce composé. Puis des études de relation entre la structure et l'activité pourraient permettre d'améliorer la sélectivité et le pouvoir sécrétagogue du GLP-1 de ces composés dans le but de développer de nouveaux principes actifs antidiabétiques.

L'**Annexe V** répertorie les effets sécrétagogues des extraits de *Momordica charantia* et de *Fagonia cretica* et des triterpènes qui ont été isolés de ces espèces végétales.

3.2.5 *Olea europaea*, l'acide oléanolique et ses isomères

Une étude menée par Rafferty *et al.* a démontré que l'extrait dichlorométhane (CH₂Cl₂) des feuilles de l'olivier provoquait une augmentation de la sécrétion du GLP-1 par les cellules STC-1.

Cette augmentation était de 66% en comparaison aux cellules contrôles après une exposition de 3h à des concentrations de 1 mg/mL (augmentation modérée par rapport à celle induite par la glutamine, acide-aminé utilisé comme contrôle positif, qui induit une augmentation de 236% par rapport aux cellules contrôles à une concentration de 40 mM) (239). En plus de déterminer la concentration de GLP-1 sécrétée par les cellules, les chercheurs ont voulu déterminer si une exposition prolongée de 72h avec l'extrait CH₂Cl₂ des feuilles d'olivier avait une influence sur le contenu intracellulaire en GLP-1. Lors de cette expérience, l'extrait n'a pas eu d'influence sur le long terme sur la concentration intracellulaire de l'incrétine (239). Ce résultat suggère que l'extrait provoque une libération du GLP-1 sans avoir d'influence sur l'expression du gène du proglucagon.

Des expériences sur l'effet sécrétagogue de l'extrait CH₂Cl₂ des feuilles d'olivier via l'utilisation des souris C57BL/6J ont été menées afin de vérifier les observations faites sur le modèle *in vitro*. L'extrait a été administré aux souris à une dose de 100 mg/kg en même temps qu'une HGPO. Aucun des produits testés n'a eu d'impact sur le profil glycémique des souris. En revanche, l'extrait des feuilles d'olivier a provoqué une légère augmentation de la concentration du GLP-1 (239). Selon les chercheurs cette augmentation reste trop faible pour réduire efficacement un pic glycémique. À l'inverse de ce qui a été observé sur les cellules STC-1, l'extrait CH₂Cl₂ a induit une sécrétion du GLP-1 *in vivo* à un niveau comparable de celui de la glutamine. Malheureusement, aucune étude phytochimique n'est présentée dans l'étude.

Cependant, l'activité de l'extrait d'*Olea europaea* pourrait être causée par l'acide oléanolique, une des molécules retrouvée dans les fruits et les feuilles de l'olivier et/ou par deux de ses isomères : l'acide bétulinique et l'acide ursolique. L'acide oléanolique est un triterpène très répandu dans le règne végétal. On prête à ce métabolite de nombreuses propriétés médicinales dont des propriétés antidiabétiques (240). Une dose de 10 µM de ce composé a induit une augmentation de la sécrétion du GLP-1 par les cellules STC-1. Avec une dose si infime, la sécrétion du GLP-1 a été multipliée par 4 en comparaison des cellules contrôles (241). Les chercheurs n'ayant testé qu'une seule dose de ce triterpénoïde sur les cellules STC-1, il est impossible de savoir si la sécrétion GLP-1 est concentration dépendante. Ce triterpène est aussi un activateur des récepteurs TGR5, récepteurs induisant une libération de GLP-1 (241). De multiples dérivés chimiques de l'acide oléanolique ont été développés dans le but de réguler la glycémie (242). Néanmoins, ses dérivés synthétiques n'ont pas fait l'objet d'étude sur la sécrétion du GLP-1.

L'acide bétulinique est un triterpène dont la structure chimique est très proche de celle de l'acide oléanolique. À l'instar de l'acide oléanolique, il est très répandu dans la nature, et il est également un agoniste des récepteurs aux acides biliaires TGR5 (243). Les cellules NCI-H716 ont été utilisées comme modèle d'étude *in vitro* pour démontrer l'action sécrétagogue de l'acide bétulinique sur le GLP-1. Pour une gamme de concentration entre 0,1 μM et 10 μM , l'acide bétulinique a exercé une augmentation concentration dépendante de la sécrétion de l'incrétine (244). Pour la plus forte dose testée (10 μM), la quantité de GLP-1 sécrété était plus que doublé en comparaison des cellules contrôles (244). Les chercheurs ont comparé la sécrétion du GLP-1 provoquée par l'acide bétulinique et un de ses sécrétagogues physiologiques, l'acide lithocholique. Pour la même gamme de concentration testée, les niveaux de sécrétion du GLP-1 sont comparables entre l'acide bétulinique et l'acide lithocholique (244).

L'acide ursolique est un autre isomère de l'acide oléanolique. Il est également très répandu dans la nature et est parfois issu des mêmes plantes comme dans le pommier (245). Les propriétés pharmacologiques de l'acide ursolique ont été très étudiées (246). Une étude datant de 2017 a cherché à mettre en évidence l'effet sécrétagogue du GLP-1 de ce triterpène à la fois *in vitro* et *in vivo*. Cette étude démontre que l'acide ursolique est bien un activateur du récepteur TGR5. Sur les cellules NCI-H716, l'acide ursolique a induit une augmentation concentration dépendante de la sécrétion du GLP-1 pour des doses comprises entre 0,03 et 1 μM . A la dose de 1 μM , la sécrétion de GLP-1 était deux fois plus élevée par rapport aux cellules contrôles (247). Cet effet sécrétagogue dose dépendant de l'acide ursolique a été confirmé sur un modèle *in vivo*. Les rats SD rendus diabétiques à la streptozotocine ont été utilisés comme modèle. Des chercheurs ont voulu comparer les concentrations plasmatiques en GLP-1 chez des rats ayant reçu l'acide ursolique seul et avec un traitement concomitant à la sitagliptine (5mg/kg/jour pendant 2 semaines). À la plus forte dose testée (30mg/kg), le taux plasmatique de GLP-1 des rats est supérieur de 12 pg/mL en comparaison des rats contrôles. À la même dose de 30 mg/kg, un traitement simultané avec un inhibiteur de la DPP4 a plus que doublé la concentration plasmatique en GLP-1 (247). Malgré ces résultats, on peut s'interroger sur un des paramètres de l'étude *in vivo*. L'acide ursolique a été administré aux rongeurs par injection intrapéritonéale. Ce mode d'administration parentérale limite l'exposition des cellules L intestinales avec l'acide ursolique.

3.2.6 *Panax ginseng*, les ginsénosides et le composé K

Les racines du ginseng (*Panax ginseng* (*Araliaceae*)) et les ginsénosides contenus dans ses racines sont utilisés depuis des siècles en médecine chinoise dans le traitement du diabète (248). Les ginsénosides sont des triterpènes glycosylés qui sont presque exclusivement retrouvés dans les plantes du genre *Panax*. Des chercheurs de l'université pharmaceutique de Nanjing ont testé un extrait enrichi en ginsénosides. La présence des ginsénosides Rb1, Rb2, Rc, Rd et Re a été déterminé par des analyses chromatographiques et spectrométriques (249). Chez des rats SD diabétiques, un traitement par cet extrait à une dose de 300 mg/kg par jour pendant 4 semaines a provoqué une augmentation de la concentration plasmatique du GLP-1 entre 0 et 30 min après le test HGPO. En plus de cette augmentation plasmatique, une forte dose de l'extrait provoque une augmentation de la concentration du GLP-1 et de l'ARNm du gène du proglucagon dans l'iléon des animaux. D'un point de vue histologique, les iléons des rats qui ont reçu l'extrait enrichi en ginsénoside présentaient plus de cellules L que ceux des rats contrôles (249). Est à noter qu'une très faible proportion des ginsénosides (biodisponibilité < à 1%) est adsorbée dans la circulation sanguine après une administration orale (250). Cette caractéristique suggère que ces composés provoquent un effet antidiabétique après interaction avec les cellules entéroendocrines.

Lors de la même étude, certains ginsénosides ont été testés séparément sur un modèle de cellules entéroendocrines : les cellules NCI-H716 (249). Parmi les cinq ginsénosides majoritaires du *Panax ginseng* (Rb1, Rb2, Rc, Rd et Re), le composé Rb1 a multiplié par 2 la sécrétion du GLP-1 par rapport aux cellules contrôles à une dose de 200 µM. Les ginsénosides Rb2, Rc et Rd ont également augmenté la sécrétion du GLP-1 par des cellules, mais à des niveaux plus faibles que celui du Rb1. De plus, le ginsénoside Rb1 induit une augmentation dose dépendante de la sécrétion du GLP-1. Cette augmentation de la sécrétion est majorée en présence de glucose (249). L'exposition des cellules au ginsénoside Rb1 a induit une augmentation de la production des ARNm des gènes du proglucagon et de la PC-1/3, qui transforme le glucagon en GLP-1 dans les cellules endocrines intestinales. D'un point de vue mécanistique, le Rb1 induit une sécrétion du GLP-1 via une augmentation intracellulaire du Ca²⁺ et une fermeture des canaux potassiques ATP dépendants (250). De plus, le composé Rb1 améliore aussi la pénétration intracellulaire du glucose en réponse à l'insuline par stimulation de la translocation des transporteurs GLUT1 et GLUT4 au niveau de la membrane cellulaire des adipocytes (251).

Les différents ginsénosides ayant des structures chimiques proches, une identification claire du récepteur cible sera une étape clé pour entreprendre des études de relations structure activité et de *drug design*.

Le composé K (20-O- β -D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol) est un des métabolites majoritaires des saponines du ginseng (252). Ce métabolite a démontré certaines propriétés antidiabétiques (253). Il a notamment un effet anti-apoptotique sur les cellules β pancréatiques et stimule leur capacité insulinosécrétrice (254,255). Des chercheurs ont voulu démontrer que le composé K a un effet antidiabétique via des interactions avec les cellules entéroendocrines. Au niveau intestinal, le microbiote transforme les ginsénosides en composé K avant son passage dans la circulation sanguine. Le composé K a induit une augmentation de la sécrétion du GLP-1 de façon concentration dépendante sur la lignée cellulaire NCI-H716. À 100 μ M, le niveau de sécrétion du GLP-1 était huit fois supérieures en comparaison aux cellules contrôles. L'acide lithocholique a été utilisé comme témoin positif de la sécrétion du GLP-1. En comparaison d'une dose de 30 μ M de l'acide biliaire, la sécrétion entraînée par le composé K reste multipliée par deux (256). Cette étude met également en évidence que le récepteur TGR5 est impliqué dans la sécrétion de GLP-1 induite par le composé K. De plus, le composé K a été caractérisé comme agoniste spécifique du récepteur TGR5. Un test d'évaluation de la viabilité cellulaire a permis de déterminer que des concentrations inférieures ou égales à 100 μ M du composé K n'ont pas provoqué d'altération des cellules NCI-H716. Cette absence d'effet délétère sur l'intégrité cellulaire prouve que le GLP-1 est bien sécrété par les cellules et non pas libéré à la suite de lésions au niveau de la membrane cellulaire (256).

L'**Annexe VI** présente les effets sécrétagogues des extraits des plantes *Olea europaea* et de *Panax ginseng* ainsi que leurs triterpènes.

3.2.7 Les stéroïdes des *Apocynaceae*

Hoodia gordonii (*Apocynaceae*) est une plante cactiforme utilisée depuis des millénaires pour ces propriétés anorexigènes par le peuple San (257). Les chasseurs de ce peuple d'Afrique australe consomment cette plante avant de longues traques de plusieurs jours. Cette utilisation traditionnelle avait popularisé l'usage de la plante comme complément alimentaire contre le surpoids (258). *H. gordonii* produit des métabolites de type prégnanes glycosylés dont le P57.

Ce stéroïde glycosylé de type oxyprégnane fut le premier étudié pour ces propriétés anti-obésité (259). Puis d'autres molécules de la même famille dont les gordonosides et les hoodigosides ont été isolées. Ces molécules sont considérées comme des anorexigènes et ont fait l'objet d'études approfondies dans le traitement de l'obésité et d'autres maladies métaboliques dont le DT2. Les spécialistes du domaine cherchaient à faire le lien entre l'effet anorexigène de la plante et le GLP-1, qui induit une sensation de satiété au niveau du système nerveux central. Après un criblage de plus de 4400 produits naturels, il a été mis en évidence que le gordonoside F était un activateur puissant et sélectif du récepteur GPR119 (260). Ce récepteur est exprimé à la surface des cellules β pancréatiques et des cellules L intestinales. Les agonistes du récepteur GPR119 induisent *in vitro* une sécrétion de l'insuline et une sécrétion du GLP-1 (261). Des expériences *in vivo* sur des souris C57BL/6J ont été menées afin d'évaluer l'effet d'un extrait commercial d'*H. gordonii* et du gordonoside F sur l'homéostasie glucidique. Après un test d'HGPO, le gordonoside F (200 mg/kg) et l'extrait de la plante (1000 mg/kg) ont provoqué une diminution de la glycémie et une augmentation de la concentration plasmatique de GLP-1 et d'insuline (260). Néanmoins, l'augmentation de la concentration du GLP-1 plasmatique provoquée par le gordonoside F était plus faible que celle induite par le témoin positif : l'AR231453, un agoniste synthétique des récepteurs GPR119 (260). Aucune toxicité de l'extrait d'*H. gordonii* n'a été mise en évidence sur des modèles murins, même à de très fortes doses (~ 3g/kg). Cette étude a permis de mettre en évidence une activité forte et sélective du gordonoside F sur le récepteur GPR119 en comparaison d'autres prégnanes glycosylés. Cependant la synthèse chimique totale de ce composé est complexe et la faible teneur en gordonoside F dans la plante limite les possibilités de développement du principe actif antidiabétique (262).

D'autres prégnanes glycosylées ont été isolés dans des plantes appartenant au genre *Cynanchum* (*Apocynaceae*). Sur la base d'un criblage biologique, l'extrait éthanolique des parties aériennes de *C. menarandrense* a provoqué une augmentation de la sécrétion du GLP-1 par les cellules STC-1 (263). Cette augmentation est concentration dépendante avec une augmentation de 204% à 30 $\mu\text{g/mL}$ et 245% à 100 $\mu\text{g/mL}$. L'extrait actif a ensuite été partagé par extraction liquide-liquide avec de l'AcOEt. La purification des composés de ladite fraction a mené à l'isolement de 8 composés : les ménarandrosides A, B, C, D et E, les carumbellosides I et II, et le pregnenolone-3-*O*-gentiobioside (263). Lorsqu'ils sont testés séparément, aucun des composés isolés n'a provoqué une augmentation de la sécrétion du GLP-1 sur les cellules STC-1.

Cependant la fraction AcOEt enrichie en prégnanes glycosylés a doublé la sécrétion du GLP-1 sur des cellules entériques primaires. Ce résultat traduit une activité synergique des différentes prégnanes de la plante *C. menarandrense* (263).

À la suite d'un criblage d'extraits de plantes, l'extrait EtOH d'une autre espèce du genre *Cynanchum*, *C. marnierianum* a augmenté de manière dose dépendante la sécrétion de GLP-1 par des cellules STC-1 (133% à 10 µg/mL, 190% à 30 µg/mL et 272% à 100 µg/mL) (264). Après un isolement bioguidé, les marniéranosides A et B se sont révélés être les métabolites les plus actifs de la plante quant à l'augmentation de la sécrétion du GLP-1. À une concentration de 100 µM, les marniéranoside A et B ont augmenté la sécrétion de GLP-1 de 129% et 133% respectivement (264). En parallèle de ce criblage basé sur l'augmentation de la sécrétion du GLP-1, des tests de viabilité cellulaire par réduction du MTT ont été entrepris. L'exposition des cellules à l'extrait de la plante n'a pas d'effet sur la viabilité par rapport aux cellules non traitées (265) Le prégnane P57, précédemment évoqué, a été utilisé comme témoin positif au cours de l'étude sur les marniéranosides. Le P57 a entraîné une réponse comparable aux marniéranosides avec une augmentation de 130% de la sécrétion du GLP-1 (264). Pour aller plus loin dans l'évaluation de la cytotoxicité des composés et écarter les faux positifs, des expérimentations de cytométrie en image et en flux ont été menées. Il est possible que l'augmentation du GLP-1 dans le milieu extracellulaire soit la conséquence d'une lyse de la cellule et non d'un relargage actif provoqué par les molécules testées. Consécutivement à ces expérimentations, les marniéranosides A et B ne se sont pas révélés cytotoxiques. En revanche le P57 a eu un effet pro-apoptotique sur les cellules STC-1 (264).

Nous venons de décrire plusieurs études qui rapportent une activité sécrétagogue du GLP-1 de prégnanes glycosylés sur différents modèles (260,263,264). Une autre étude s'est intéressée à établir des relations structures activités en comparant les effets de 16 prégnanes de structures proches sur la sécrétion du GLP-1. Parmi ces 16 molécules isolées de différentes espèces de la famille des *Apocynaceae*, trois ont doublées le niveau d'excrétion du GLP-1 dans le milieu extra cellulaire par rapport aux cellules contrôles. Les tests sur la sécrétion du GLP-1 ont été effectués avec une concentration de 100 µM pour chaque composé. Les trois prégnanes les plus actifs étaient : l'otophylloside A, le wilfoside C3N et le wilfoside C1N avec un doublement de la sécrétion de l'incrétine sur les cellules STC-1 (**Figure 12**) (265).

Les prégnanes avec un bon niveau d'activité biologique possèdent tous une estérification avec un groupement *p*-hydroxybenzoyle ou un groupement ikemaoyl au niveau du carbone numéro 12 (R_2 **figure 12**). Néanmoins, cette seule estérification en position 12 doit être combinée à une chaîne glycosidique en position 3. Cette constatation a été faite par l'absence d'activité des composés aglycones (R_1 **figure 12**). La chaîne glycosidique des prégnanes actifs comporte entre 3 et 4 fragments saccharidiques de nature 2,6-dideoxysaccharides. Le premier sucre en lien avec la génine est déterminant pour l'activité. Le 3-D-cymaropyranose est le premier ose chez les composés ayant doublé la sécrétion du GLP-1 (265). Les éléments structuraux importants dans l'activité des prégnanes sont illustrés dans la **figure 12**.

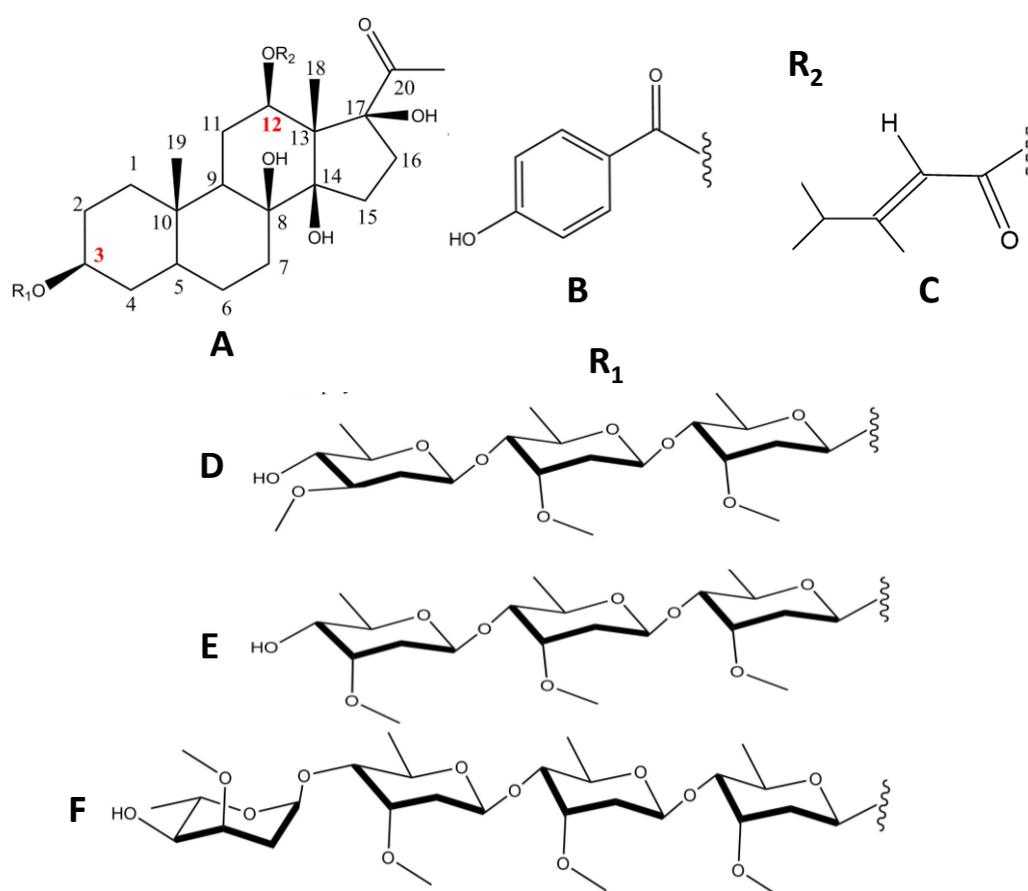


Figure 12 : Le noyau commun des 16 prégnanes étudiés (**A**), le groupement *p*-hydroxybenzoyle (**B**), le groupement ikemaoyl (**C**) et les chaînes osidique de l'otophylloside A (**D**), du wilfoside C3N (**E**) et du wilfoside C1N (**F**)

La viabilité cellulaire des cellules STC-1 a été évaluée par cytométrie en image à la suite de leur exposition avec les prégnanes, et aucune des molécules testées n'a eu d'impact sur la viabilité cellulaire (265).

Ces premières hypothèses de relation entre la structure des prégnanes glycosylés et leur activité sécrétagogue du GLP-1 sont à nuancer dans la mesure où la cible et les mécanismes cellulaires impliqués dans cette sécrétion ne sont pas clairement identifiés. Néanmoins, la mise en parallèle de l'activité et de la structure permet d'envisager une ébauche de pharmacophore dans la poursuite de recherche de nouveaux principes actifs antidiabétiques. Compte tenu de la nature stéroïdique de ces composés, il est probable que ceux-ci provoquent des perturbations endocriniennes sur le long terme. La sécurité d'utilisation et la toxicité des prégnanes doivent faire l'objet d'étude sur un modèle *in vivo*.

L'**Annexe VII** reprend les effets sécrétagogues des extraits de *Hoodia gordonii*, *Cynanchum* spp. et des stéroïdes de type prégnane étudiés.

3.2.8 *Ribes nigrum* et ses anthocyanes

Une étude épidémiologique a démontré que la consommation de baies riches en anthocyanes augmente la sensibilité à l'insuline et diminue le risque de développement d'un DT2 (266). Des chercheurs ont voulu étudier l'effet d'un extrait commercial enrichi en anthocyanes de cassissier (*Ribes nigrum*, *Grossulariaceae*), sur la sécrétion du GLP-1 *in vivo*. L'extrait en question, dont le nom commercial est BCE (Blackcurrant Polyphenol Extract 75), est enrichi en delphinidine-3-rutinoside, l'anthocyane majoritaire du cassis (les anthocyanes appartenant à la grande catégorie des polyphénols). Cette étude démontre que l'extrait stimule la sécrétion de GLP-1 chez les rats SD sains. La concentration plasmatique de GLP-1 est 2,5 fois plus élevée chez les rats qui ont reçu l'extrait BCE à une dose de 5 mg/kg par rapport aux animaux contrôles 30 minutes après une TGIP. L'augmentation de la sécrétion du GLP-1 est corrélée à une augmentation de l'insulinémie et à une réduction de la glycémie (267).

Suite aux investigations sur l'extrait BCE, les chercheurs se sont intéressés à l'action sécrétagogue de la delphinidine et ses métabolites (267). Au niveau intestinal, la delphinidine-3-rutinoside est hydrolysée par les microorganismes du microbiote en delphinidine. La delphinidine est elle-même transformée en acide gallique et en aldéhyde de phloroglucinol (268). L'ensemble de ces molécules ont été dosées par CLHP dans le contenu intestinal des rats après l'expérimentation. Ces dosages ont prouvé que la delphinidine-3-rutinoside n'est quasiment pas transformée une heure après son administration orale (267).

Afin de savoir si l'activité de l'extrait repose sur la delphinidine-3-rutoside et/ou ses métabolites intestinaux, ces molécules ont été testées directement sur des cellules GLUTag. Les métabolites n'ont pas provoqué d'augmentation de la sécrétion du GLP-1 sur le modèle cellulaire. En revanche, la delphinidine-3-rutoside a multiplié par 2 la sécrétion du GLP-1 par les cellules GLUTag en comparaison aux cellules contrôles (269). La même équipe de scientifiques a procédé au criblage de 9 anthocyanes différentes ainsi que de leurs aglycones. Parmi ces composés, la delphinidine-3-rutinoside a provoqué la plus forte sécrétion du GLP-1 par les cellules GLUTag. Elle exerce une sécrétion concentration dépendante détectable dès 10 μM . La cyanidine-3-rutinoside, l'autre constituant majoritaire de l'extrait BCE, n'a pas induit d'augmentation de la sécrétion du GLP-1 *in vitro* (269). Au vu des résultats de ce criblage, les auteurs suggèrent que certains éléments structuraux des anthocyanes sont capitaux pour entraîner une activité sécrétagogue du GLP-1. Au niveau des cycles du squelette 2-phénylchromane, le deuxième cycle (cycle B **figure 13**) doit comporter 3 fonctions hydroxyles. Le rutinoside doit être associé à cette partie aglycone pour que l'action sécrétagogue soit potentialisée. La **figure 13** présente la structure chimique du delphinidine-3-rutoside et ses éléments structuraux essentiels à l'activité sécrétagogue (en rouge).

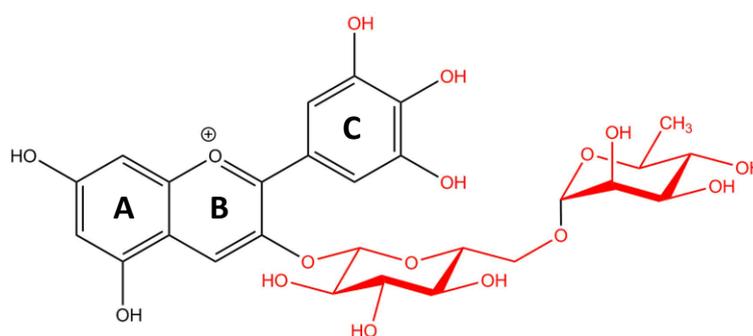


Figure 13: Structure chimique de la delphinidine-3-rutinoside et éléments structuraux essentiels à l'activité sécrétagogue (en rouge).

L'exposition de 2h entre les différents anthocyanes et les cellules GLUTag n'a pas provoqué de toxicité cellulaire. Cette étude a également permis de mettre en évidence que la delphinidine-3-rutinoside est un agoniste des récepteurs GPR40/120 à la surface des cellules endoendocrines. Après l'activation de ces récepteurs, une libération de Ca^{2+} survient après activation de l'IP3R (récepteur à l'inositol triphosphate). Suite à cette augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} , une mobilisation de la CaMKII (*Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II*) provoque l'excrétion du GLP-1 (269).

3.2.9 Glycine max et ses polyphénols

Le Meju est une préparation fermentée de graines de soja (*Glycine max*, *Fabaceae*) utilisée dans la gastronomie coréenne. Une étude a cherché à prouver que le Meju est un aliment fonctionnel dans la prévention du diabète. Cette préparation de graines de la plante *Glycine max* contient des isoflavonoïdes et certaines études scientifiques ont mis en évidence une action préventive de ces molécules à l'égard de certaines maladies métaboliques (270). Une étude rapporte une augmentation de la sécrétion du GLP-1 par les cellules NCI-H716 en contact avec les extraits MeOH de Meju fermenté pendant 20 et 60 jours à une très faible concentration de 5 µg/mL (271). Cependant, les réponses quant à la sécrétion du GLP-1 sont fortement dépendantes du milieu de culture cellulaire et notamment de sa concentration en glucose. Il semble que ce seraient les composés de l'extrait MeOH de Meju obtenu après deux mois de fermentation, qui seraient les plus actifs (271). Les extraits du Meju et certaines molécules qui les composent ont fait l'objet de recherches plus approfondies sur des modèles cellulaires et murins. Il se trouve qu'après la fermentation des graines de soja pour la préparation du Meju, les dérivés malonyl, acétyl et glycoside des isoflavones sont décomposés. Il en résulte une augmentation de la teneur en isoflavones comme la daidzéine et la génistéine (272). Ces deux composés ont stimulé la sécrétion du GLP-1 par les cellules NCI-H716 à des concentrations différentes. La sécrétion du GLP-1 a été presque doublée par la daidzéine à une très faible concentration de 5 µM (271). Pour la génistéine, une concentration de 100 µM a induit une augmentation de la sécrétion du GLP-1 par 1,5 par rapport aux cellules contrôles (271). D'après ces observations sur un modèle *in vitro*, des chercheurs ont voulu confirmer l'action sécrétagogue des isoflavones sur un modèle de rats diabétiques.

Ainsi, après avoir rendu des rats diabétiques par injection d'alloxane, des chercheurs ont voulu évaluer l'effet de la génistéine sur la sécrétion de GLP-1. Dans cette étude, les expérimentateurs ont comparé l'effet de l'isoflavone seule ou coadministré à de la metformine (en effet, un effet sécrétagogue du GLP-1 de la metformine a été précédemment mis en évidence sur un petit groupe de patients atteints d'un DT2) (273). Les rats ayant reçu à la fois la génistéine (20 mg/kg/j) et la metformine (50 mg/kg/j) ou la metformine seule présentaient des taux sériques en GLP-1 plus élevés que les rats diabétiques témoins. Un traitement avec la génistéine seule à une dose de 20 mg/kg/j pendant 30 jours a démontré la meilleure efficacité.

La teneur en GLP-1 des tissus intestinaux a été plus que doublé chez les rats traités à la génistéine pendant 30 jours (274).

Selon les chercheurs, la génistéine induit une augmentation des concentrations plasmatiques du GLP-1 chez les rats diabétiques via un effet anti-inflammatoire. En réduisant la concentration intestinale de marqueurs pro-inflammatoires, tels que l'IL-6 et le TNF- α , la génistéine limite la destruction des cellules L intestinales (274). À ce jour, il n'existe pas d'étude sur l'effet *in vivo* de la daidzéine sur le GLP-1. Il serait intéressant de tester cette isoflavone, car elle a induit une plus forte sécrétion du GLP-1 *in vitro* que la génistéine. Il semblerait que les isoflavones exercent plusieurs actions différentes qui aboutissent à une amélioration du taux de GLP-1. Elles exercent un effet sécrétagogue sur le GLP-1 *in vitro* et limitent la destruction des cellules L intestinales chez les rats diabétiques via un effet anti-inflammatoire (271,274). Enfin, une autre étude a démontré une activité inhibitrice *in vivo* de certaines isoflavones sur l'enzyme DPP4 (275).

Les graines de soja noir sont aussi à la base de produits alimentaires considérés comme ayant des propriétés bénéfiques pour la santé. Dans la médecine traditionnelle chinoise, on prête aux graines de cette variété de soja des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, détoxifiantes et anti-obésité (276). Sur l'homéostasie glucidique des souris, les anthocyanines et les procyanidines provenant des téguments de graines de soja noires ont réduit la glycémie et augmentent la sensibilité des tissus cibles de l'insuline (277). Après avoir retiré les coques des graines de soja, des investigateurs ont extrait les parties tégumentaires des graines avec de l'éthanol (EtOH) et de l'eau. Puis, un extrait enrichi en polyphénols (anthocyanines et procyanidines) a été obtenu suite à l'utilisation d'une résine adsorbante. Cet extrait a été administré à une dose quotidienne de 20 mg/kg pendant 8 semaines chez des rats SD. Les rats en question ont été préalablement rendus diabétiques par l'utilisation de la streptozotocine. La farine totale tégumentaire des graines de soja a été testée sur la même période à une dose de 1 g/kg de poids corporel. Une administration chronique de la farine et de l'extrait polyphénolique des graines de soja noires ont augmenté le taux de GLP-1 chez les rongeurs à des niveaux similaires. La restauration du taux de GLP-1 circulant était comparable à celui des rats non diabétiques contrôles et à celui de rats traités par la sitagliptine à une dose de 20 mg/kg (278). Selon les auteurs, le processus d'extraction des anthocyanines et des procyanidines des graines de soja noir est difficilement industrialisable (coût élevé et faible rendement d'extraction). Malgré l'utilisation d'une résine pour enrichir l'extrait tégumentaire en polyphénols, des traces d'amidon et de fibres ont été retrouvées dans l'extrait (278). Il est possible que les autres composés de la farine de soja noire soient

également impliqués dans la restauration d'une concentration plasmatique physiologique en GLP-1.

Il existe un dernier type de flavonoïdes issu des graines de soja dont le potentiel sécrétagogue du GLP-1 est prometteur. Il s'agit des ptéocarpanes de type glycéollines qui sont des molécules dérivées des isoflavonoïdes (279). Elles sont produites dans les graines de soja en réponse à une agression fongique (280). Des chercheurs ont voulu mettre en évidence les actions antidiabétiques de ces composés via des tests de sécrétions du GLP-1 sur une lignée cellulaire entéroendocrine (281). Pour stimuler leur production par les graines de soja, ces dernières sont fermentées en présence d'un champignon : *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*. Après cette étape de fermentation, les graines ont été extraites au MeOH. La présence de trois glycéollines ; les glycéollines I, II et III a été prouvée par analyses CLHP. Un mélange des glycéollines isolées a ensuite été mis en contact avec des cellules NCI-H716. Deux doses : 0,5 et 5 μ M du mélange ont été testées en présence de 20 mM de glucose dans le milieu de culture (281). La plus faible dose a provoqué une légère stimulation de la sécrétion du GLP-1. À 5 μ M, la sécrétion du GLP-1 a été multipliée par 2 (281). On peut cependant noter que le test a été réalisé en présence d'une grande quantité de glucose dans le milieu de culture. Or, une forte concentration de glucose peut à elle seule stimuler la sécrétion du GLP-1. La concentration de 20 mM de glucose seule n'a pas été testée sur les cellules afin de comparer la sécrétion avec ou sans les glycéollines.

L'**Annexe VIII** synthétise les principales caractéristiques du potentiel sécrétagogue des anthocyanes de *Ribes nigrum* et des flavonoïdes issus du soja et de ses préparations.

3.2.10 *Ipomoea batatas*, *Ilex paraguariensis* et les dérivés de l'acide chlorogénique

Assez peu d'études finalement décrivent à ce jour l'investigation d'un potentiel sécrétagogue d'extrait de plante via l'utilisation des cellules GLUTag. L'une d'entre elles concerne la plante *Ipomoea batatas* (*Convolvulaceae*), qui est plus connue sous le nom de patate douce. Le tubercule de cette plante rentre dans la composition de nombreuses recettes culinaires. Un extrait hydroalcoolique (60% d'éthanol) des parties aériennes de la plante (tiges et feuilles) a été préparé (282). Les cellules GLUTag ont ensuite été exposées à cet extrait à une concentration de 10 mg/mL. L'extrait d'*I. batatas* a multiplié par 15 la sécrétion du GLP-1 chez les cellules GLUTag par rapport aux cellules contrôles (282). En comparaison à la sécrétion entraînée par la glutamine, qui a été utilisée comme témoin positif, la sécrétion du GLP-1 de l'extrait a été multipliée par 3 (282). Il semblerait que l'effet sécrétagogue de l'extrait soit causé par des composés polyphénoliques. De nombreuses études scientifiques

ont démontré des effets bénéfiques des polyphénols pour le maintien d'un bon équilibre glycémique (283). Il se trouve que les parties aériennes de la patate douce en sont riches.

Dans le même article, les investigateurs ont cherché à confirmer l'effet *in vitro* sur des rats SD (282). Les chercheurs ont d'abord constaté que la glycémie était significativement plus faible chez les rats ayant subi un régime avec l'extrait de patate douce à une dose de 2g/kg de poids corporel après 4 à 5 semaines. Quinze minutes après l'absorption d'une dose unique de 2g/kg de l'extrait suite à un TGIP, l'insulinémie des rats SD était plus que doublée en comparaison avec celle du groupe contrôle. Cette augmentation de l'insulinémie est bien liée à une augmentation du taux plasmatique de GLP-1 actif. En effet, le taux de GLP-1 est 2 fois plus élevé chez les rats ayant reçu l'extrait et ayant subi un TGIP par rapport aux rats contrôle (282). Les chercheurs ont ensuite voulu comparer le pouvoir d'insulinosécrétion de l'extrait de patate douce indépendamment de l'administration de glucose. Le gliclazide a été utilisé en tant que témoin positif. Ils se sont aperçus que l'extrait stimulait bien la sécrétion d'insuline sans entraîner d'hypoglycémie comme avec l'utilisation du gliclazide (282). Certains composés polyphénoliques et notamment des dérivés de l'acide caféoylquinique ont été détectés dans l'extrait par CLHP. Sur les cellules GLUTag, tous les composés polyphénoliques testés ont entraîné une augmentation de la sécrétion du GLP-1 à une concentration de 10 mM. L'acide tricaféoylquinique (*3,4,5-tricaffeoylquinic acid*) a provoqué la plus forte sécrétion du GLP-1 en multipliant par 12 sa sécrétion (282). La structure chimique de l'acide tricaféoylquinique est présenté en **figure 14** avec les fonctions caféoyls en rouge.

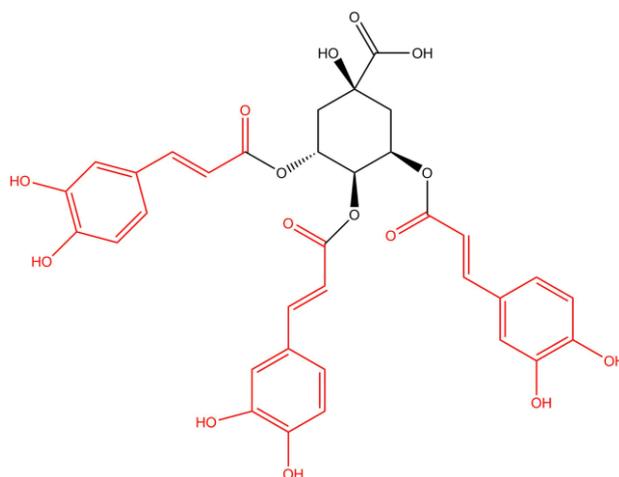


Figure 14: Structure chimique de l'acide tricaféoylquinique

Les composés polyphénoliques retrouvés dans les parties aériennes de la patate douce sont communs à une autre espèce végétale : *Ilex paraguariensis* (*Aquifoliaceae*) (plante aussi

nommée Maté). Les feuilles de Maté sont couramment infusées pour la préparation d'une boisson très populaire dans tout le continent sud-américain.

Il a été prouvé que le Maté réduit l'hyperglycémie et augmente la sécrétion et la sensibilité à l'insuline chez des souris atteintes d'un syndrome métabolique (284). Les scientifiques se sont intéressés à l'action du Maté vis-à-vis du GLP-1 *in vivo*, car il est aussi considéré comme anorexigène (285). Pour ce faire, un extrait aqueux sec des feuilles de Maté a été produit par la compagnie Tamura Pharmaceutical Co., Ltd. (Nara, Japan). Celui-ci consiste en une extraction aqueuse par infusion des feuilles de la plante. Une fois l'extrait séché, ce dernier a été administré à des souris ddY dont l'alimentation a été enrichie en graisse. Deux doses différentes de l'extrait à deux groupes différents de souris ont été administrées. Le premier groupe a reçu une dose de 50 mg/kg/j et le second une dose de 100 mg/kg/j (284). Après une période de 21 jours, la consommation d'extrait de Maté chez les souris ddY a considérablement augmenté la concentration plasmatique du GLP-1. En effet, cette concentration a plus que doublé à une dose de 50 mg/kg/j d'extrait par jour et même près de quadruplé à une dose de 100 mg/kg/j. La surveillance de la prise de masse corporelle des animaux a permis de mettre en évidence une diminution du poids chez les souris ayant reçu l'extrait à 100 mg/kg pendant 21 jours. Cet effet amaigrissant est lié à une diminution de la prise alimentaire quotidienne chez les souris traitées (284). Les composés majoritaires de l'extrait de cette plante ont été identifiés : acide chlorogénique, matéaponine, acide 3,5-O-dicafféoyl-D-quinique, caféine et testés sur les souris ddY. Ces composés majoritaires ont été administrés à une dose unique de 100 mg/kg chez les souris afin d'étudier leur effet sécrétagogue. L'acide α -linoléique a été utilisé comme témoin positif lors de cette expérience à une dose de 20 mg/kg. Parmi ces molécules, l'acide dicafféoylquinique (3,5-O-dicafféoyl-D-quinique) est le composé de la classe des acides-phénols qui a entraîné la plus forte augmentation de la concentration du GLP-1 plasmatique chez les animaux. La teneur plasmatique en GLP-1 a été presque doublée chez les souris l'ayant reçu. Ce niveau de sécrétion est équivalent à celui provoqué par l'acide α -linoléique à une dose de 20 mg/kg. L'acide dicafféoylquinique a également diminué la prise alimentaire à des niveaux comparables à celui du témoin positif (284). De plus, les composés majoritaires de l'extrait d'*I. paraguariensis* n'exercent qu'une faible voire une absence d'action inhibitrice sur l'enzyme DPP4. Cette analyse est très importante, car elle permet de justifier un réel effet sécrétagogue du GLP-1 des molécules du Maté (284)

Les dernières molécules exposées ci-dessus sont des dérivés de l'acide chlorogénique. Dans une autre étude sur un modèle *in vitro*, l'acide chlorogénique a exercé une augmentation de 236% de la sécrétion du GLP-1. Cette franche augmentation de la sécrétion a été décrite pour une dose de 40 mM après une exposition de 3h sur des cellules STC-1 (239).

En plus de déterminer la concentration de GLP-1 sécrétée par les cellules, les chercheurs ont voulu déterminer si une exposition prolongée de 72h avec l'acide chlorogénique avait une influence sur le contenu intracellulaire en GLP-1. L'acide chlorogénique a multiplié la concentration intracellulaire du GLP-1 par 4 (239). Cependant, on peut se poser des questions sur la pertinence de ce dernier test en sachant que les molécules ne restent pas aussi longtemps en contact avec les cellules entéroendocrines *in vivo*. D'autre part, l'acide chlorogénique n'a pas induit d'augmentation de la sécrétion du GLP-1 *in vivo*, alors qu'il induit une sécrétion du GLP-1 par les cellules GLUTag et STC-1 (239).

3.2.11 *Arctium lappa* et les lignanes

Le "Niubangzi" est une préparation chinoise des fruits secs de la plante *Arctium lappa* L. (*Asteraceae*) aussi nommée grande bardane (286). On retrouve le terme « *Fructus Arctii* » pour désigner les fruits séchés des bardanes en médecine traditionnelle chinoise. C'est un ingrédient de certaines préparations pour le traitement du DT2 et ses complications (287). Dans une étude de 2006, huit molécules de la famille des lignanes ont été isolés à partir de « *Fructus Arctii* ». Il s'agissait du matairesinol, de l'arctigénine, des lappaol A, F et C, de l'arctignane E, de l'arctiine et du lappaol H. Une fraction enrichie en lignanes a induit des effets antidiabétiques *in vivo* chez des rongeurs rendus diabétiques à l'alloxane (288). Afin de poursuivre les investigations, les chercheurs ont étudié les effets des lignanes de la grande bardane sur la sécrétion du GLP-1 *in vivo* chez des rats GK. L'obtention de la fraction totale des lignanes (FTL) se fait en 4 étapes. Après une double extraction à l'EtOH, le solvant organique est évaporé. L'extrait est ensuite débarrassé des lipides à l'aide d'éther de pétrole et extrait avec de l'AcOEt. Cet extrait AcOEt contient les lignanes totaux. À la suite d'une période d'acclimatation, des rats ont été divisés dans quatre différents groupes. Le premier groupe, qui était constitué de rats Wistar sains, a reçu une simple solution saline. Le second groupe, ou groupe modèle, qui était constitué de rats GK, ont reçu le véhicule utilisé pour le gavage des produits à tester (289). Le troisième groupe qui était le groupe contrôle positif, constitué de rats GK, a reçu de la natéglinide à une dose de 50 mg/kg de poids corporels. Enfin, le dernier groupe de rats GK s'est vu administrer la FTL à une dose de 300 mg/kg de poids corporel. Les différents produits (solution saline, véhicule, natéglinide et FTL) ont été

administrés aux animaux avant chaque repas, deux fois par jour pendant une période de 12 semaines (289).

La concentration sérique en GLP-1 a été mesurée chez les rats des différents groupes en période de jeûne et après un test d'HGPO. Au bout de la dixième semaine d'expérimentation, le taux de GLP-1 postprandial circulant dans le groupe s'ayant vu administrer la FTL était deux fois plus faible que chez les autres groupes de rats. Le taux de GLP-1 circulant après l'HGPO était supérieur chez les rats GK traités par la natéglinide et la FTL en comparaison des rats contrôles Wistars (289). Cette étude démontre un effet sécrétagogue des lignanes et de la natéglinide *in vivo*. Les effets des lignanes de la grande bardane sont en faveur d'une possible utilisation de la plante pour le traitement du diabète. La fraction étant composée d'au moins huit lignanes différents, il s'agira d'identifier le ou lesquels sont les plus actifs sur la sécrétion du GLP-1. On pourrait envisager le développement d'une fraction enrichie en lignanes après évaluation de leur toxicité sur une période prolongée.

3.2.12 *Angelica dahurica* et ses coumarines

Un criblage de plus de 1500 extraits de plantes visant à trouver un effet agoniste sur le récepteur GPR119, a permis de sélectionner un extrait de la plante *Angelica dahurica* (*Apiaceae*) pour poursuivre des investigations sur son potentiel hypoglycémiant (290). Pour une concentration de 100 µg, l'extrait d'*A. dahurica* a provoqué une augmentation notable ($\times 1,8$) de la sécrétion du GLP-1 sur des cellules GLUTag après 30 minutes d'exposition. Après fractionnement de l'extrait brut, la fraction hexanique obtenue présentait le meilleur profil d'activité par rapport à la stimulation du GPR119 et de la sécrétion du GLP-1 (290). Les scientifiques coréens ont ensuite purifié certaines molécules de la fraction hexanique. Celle-ci contenait des molécules appartenant à la famille des coumarines, telle que l'impérorine, l'isoimpérorine et la phélloptérine (290). Une fois les coumarines isolées, celles-ci ont été testées une nouvelle fois sur l'activation du GPR119 et de la sécrétion du GLP-1. Il a été mis en lumière que l'impérorine et la phélloptérine ont fortement stimulé la sécrétion du GLP-1 à 100 µM. Cette action sécrétagogue du GLP-1 est bien corrélée à une augmentation de l'activation du récepteur GPR119 (290). Malgré ces résultats encourageants, quelques problèmes liés à la nature des composés isolés sont une limite à un futur développement de principe actif. En effet, l'impérorine et la phélloptérine sont des furanocoumarines qui sont des inhibiteurs irréversibles du cytochrome P450 3A4 au niveau

intestinal (291). Cette propriété pharmacocinétique provoque des interactions médicamenteuses dont l'issue peut être gravissime (292).

L'action sécrétagogue des extraits et composés d'*Ipomoea batatas*, d'*Ilex paraguariensis*, de l'extrait enrichi en lignanes d'*Arctium lappa* et des coumarines de la plante *Angelica dahurica* sont présentés dans l'**Annexe IX**.

D'après les études que nous venons de présenter dans cette partie, il existe une grande diversité de molécules qui ont la propriété d'augmenter la sécrétion du GLP-1. Encore une fois, les médecines traditionnelles asiatiques sont bien représentées dans cette démarche de recherche de nouveaux principes actifs antidiabétiques. Les cibles pharmacologiques de certaines familles de composés, comme les triterpènes et des stéroïdes, sont mieux identifiés que pour les autres classes de métabolites secondaires. Selon les premières données, le récepteur TGR-5 est impliqué dans la sécrétion provoquée par certains triterpènes et le récepteur GPR119 pour certains stéroïdes de type prégnane.

3.3 Autres exemples de molécules naturelles sécrétagogues du GLP-1 classées par catégories chimiques

Cette partie du manuscrit sera consacrée à d'autres exemples de molécules naturelles sécrétagogues du GLP-1 mais cette fois classés par catégories chimiques d'appartenance. L'**Annexe X** consigne l'ensemble des données sur ces molécules sécrétagogues.

3.3.1 Monoterpènes

- Le carvacrol

Un exemple de monoterpène peut être le carvacrol. Cette molécule est retrouvée au sein de plantes aromatiques comme le thym ou l'origan. Ce composé a une action agoniste partielle par liaison non covalente avec le récepteur TRPA1, un récepteur présent sur les cellules intestinales L (293,294). Le carvacrol a induit une légère augmentation de la libération du GLP-1 en multipliant par 1,6 sa sécrétion par des cellules entéroendocrines primaires. L'implication du canal TRPA1 dans la sécrétion du GLP-1 induite par ce monoterpénoïde a été prouvée. D'un point de vue fonctionnel, l'activation de ce canal provoque une dépolarisation des cellules, qui provoque une entrée de Ca^{2+} et *in fine* la sécrétion du GLP-1 (295). Malheureusement, le carvacrol présente une toxicité et sa faible biodisponibilité impose des améliorations galéniques de sa formulation pour une utilisation thérapeutique (296).

3.3.2 Les diterpènes

- Le rebaudioside A

Les composés sucrants non caloriques sont de plus en plus utilisés dans l'industrie agroalimentaire. Les feuilles de *Stevia rebaudiana* (*Asteraceae*) contiennent des hétérosides de diterpènes de la famille des stéviols, dont le pouvoir sucrant est particulièrement apprécié.

Cependant, très peu de données scientifiques sont disponibles sur l'impact de la consommation de ces produits sur l'intestin. Des chercheurs ont voulu explorer l'effet de ces composés sur différentes hormones intestinales, dont le GLP-1 (297). Le fait que la consommation de stévia induit une sensation de satiété est un autre argument en faveur de l'étude de son interaction avec les cellules intestinales et la sécrétion des incrétines (298). Ce qui fait l'originalité de cette étude, c'est le modèle utilisé pour détecter la sécrétion du GLP-1. Les expérimentateurs ont utilisé différents segments d'intestin de porcs afin de mesurer le pouvoir sécrétagogue de l'un des hétérosides de diterpènes majoritaires des feuilles de *S. rebaudiana* : le rebaudioside A (297). Il s'est avéré que le rebaudioside A a provoqué une augmentation de la sécrétion du GLP-1 dans toutes les parties de l'iléon provenant des intestins de porcs. Une réponse significative de cette sécrétion a été mise en évidence dès la plus faible concentration testée avec une multiplication de la sécrétion qui a plus que doublé pour une concentration de 2,5 mM. C'est dans la partie distale de l'iléon que la sécrétion du GLP-1 a été la plus élevée. Cette différence de sécrétion en fonction des parties de l'intestin s'explique par le fait que la partie distale de l'iléon est la plus abondante en cellules L. Toujours dans la partie distale de l'iléon, le rebaudioside A a provoqué une plus forte stimulation de la sécrétion du GLP-1 par rapport au saccharose (molécule utilisée comme contrôle positif) (297).

Le modèle d'étude *ex vivo* utilisé pour cette étude est très pertinent. En effet, l'anatomie macro et microscopique de l'intestin de porc est très ressemblante à celle de l'être humain. En comparaison à une lignée cellulaire, ce modèle *ex vivo* a l'avantage de réunir l'ensemble des tissus qui composent l'intestin. Malgré ces considérations, une confirmation de l'étude de la sécrétion du GLP-1 sur un modèle *in vivo* s'impose. La viabilité des SDIP a été évaluée postérieurement à la mise en contact avec le rebaudioside A. Les fuites de LDH n'ont pas excédé 10%, ce qui indique une bonne viabilité des tissus modèles (297). De nouvelles recherches doivent se concentrer sur le mécanisme d'action et les interactions entre le rebaudioside A et les cellules intestinales. Il semblerait que les récepteurs aux saveurs sucrées TAS1R2/TASR3 soient une piste à creuser (299).

3.3.3 Les sesquiterpènes

- La déoxynivalénol

La déoxynivalénol est une mycotoxine produite par les champignons *Fusarium graminearum* (300). D'un point de vue chimique, elle appartient à la famille des sesquiterpènes.

Les manifestations cliniques de cette toxine sur des modèles animaux comprennent une anorexie et une forte perte de poids (301). L'implication des mécanismes centraux de l'effet anorexigène de la déoxynivalénol est bien décrite (302). Certains chercheurs supputent qu'une augmentation de la sécrétion d'hormones intestinales par les cellules entéroendocrines est impliquée dans l'action anorexigène de la déoxynivalénol. Ainsi, la sécrétion du GLP-1 par les cellules STC-1 a été évaluée après une mise en contact avec des doses croissantes de la mycotoxine (303). La sécrétion du GLP-1 a été augmentée de manière concentration dépendante après une exposition de 45 minutes avec différentes doses de déoxynivalénol (0,5 à 5 mM). À 2 mM, la sécrétion du GLP-1 a été multipliée par 3 en comparaison aux cellules contrôles. Cette étude décrit l'implication des récepteurs RCPG *Ca²⁺-sensing receptor* (CaSR) ainsi que des récepteurs *transient receptor potential melastatin-5 ion channel* (TRPM5) et TRPA1 (303). Un test de viabilité cellulaire au MTT a permis de déterminer que 2 mM de la toxine n'a pas altéré la viabilité des cellules STC-1 après 45 minutes d'exposition (303). La forte toxicité de déoxynivalénole exclut son usage thérapeutique. Néanmoins, certains composés toxiques sont utilisés aujourd'hui dans différentes spécialités médicales (les curares ou plus récemment le ziconotide) (304). Des études de *drug design* sur la déoxynivalénole pourraient aboutir à la conception d'un principe actif anorexigène sécrétagogue du GLP-1 dont la toxicité serait limitée.

3.3.4 Les stilbénoides

- Le resvératrol

Le resvératrol est un composé polyphénolique de la catégorie des stilbénoides qui joue le rôle de phytoalexine chez certaines plantes (305). Il est connu pour ces propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antitumorales (306). Les effets bénéfiques du resvératrol sur l'homéostasie glucidique ont été mis en lumière dans différentes études (307). Les scientifiques ont étudié l'influence d'une nouvelle formulation du resvératrol sur la sécrétion du GLP-1 de souris ayant une alimentation riche en graisse. Après un régime riche en graisse pendant 5 semaines, les souris C57BL/6J développent un DT2 avant l'apparition d'une

obésité. Le plan de l'étude repose sur l'administration de 60 mg/kg de poids corporel tous les jours pendant 5 semaines d'une nouvelle formulation du trans-resvératrol. Le trans-resvératrol naturel a été mélangé à la nourriture dans une formulation contenant deux tensioactifs : le polysorbate 20 et le polyglyceryl-3dioleate (308).

Les chercheurs ont également mis en place un groupe de souris où un inhibiteur de la DPP4 (sitagliptine 5 mg/kg/jour) a été administré en concomitance du resvératrol. Après 5 semaines de ce régime, la quantité de GLP-1 a été dosée dans la veine portale des souris ainsi que dans un segment de leur colon. Les souris n'ayant pas reçu de resvératrol au cours de leur régime riche en graisse ont vu leur niveau de GLP-1 diminué. La concentration de GLP-1 circulant a été triplée chez les souris ayant reçu le resvératrol en comparaison des souris contrôles. Le dosage du GLP-1 au niveau du colon était également multiplié par 1,8 chez les souris traitées au resvératrol. La co-administration de sitagliptine et du resvératrol a provoqué une augmentation plus marquée de la concentration de GLP-1 par rapport au resvératrol seul (308). Cette étude ne met pas en évidence le mécanisme qui fait le lien entre le resvératrol et l'augmentation du GLP-1. Néanmoins, les investigateurs pensent que l'effet du resvératrol sur le microbiote intestinal et son action anti-inflammatoire pourraient être impliqués dans l'augmentation de la sécrétion du GLP-1 chez les souris. Une évaluation de l'action sécrétagogue du resvératrol sur un modèle de lignée cellulaire entéroendocrine est souhaitable pour explorer le mécanisme d'action de ce stilbénoloïde. On regrette l'absence d'un groupe de souris comparatif traité avec du resvératrol brut. Le fait d'inclure le traitement par le resvératrol dans une réelle stratégie thérapeutique avec l'utilisation d'un inhibiteur de la DPP-4 est très intéressant. Ceci permet d'ouvrir des pistes d'investigations sur la place des sécrétagogues du GLP-1 dans l'arsenal thérapeutique pour le traitement du DT2.

3.3.5 Les alcaloïdes isoquinoléïques

- La berbérine

La berbérine est l'un des constituants amers majeurs de nombreuses plantes utilisées dans la médecine traditionnelle chinoise. Cet alcaloïde isoquinoléïque est notamment présent dans le rhizome de la plante *Coptis chinensis* (*Ranunculaceae*) (309). Dans l'ouvrage intitulé « Note of Elite Physicians », le médecin chinois Hongjing Tao décrit cette plante comme un remède contre le diabète (310). Une étude clinique menée sur l'efficacité de la berbérine dans le traitement du DT2 a démontré un certain potentiel antidiabétique (311). Cependant, les mécanismes impliqués dans l'effet hypoglycémiant de cet alcaloïde ne sont pas clairement décrits. De nombreuses études ont été publiées afin d'investiguer l'action de la berbérine sur la sécrétion du GLP-1 à la fois sur des modèles *in vitro* et *in vivo*. Dans la partie concernant la

physiologie des cellules entéroendocrines, nous avons expliqué que certains composés amers seraient responsables de la sécrétion du GLP-1 via la stimulation des récepteurs TAS2R.

En effet, une étude menée sur cellules NCI-H716 démontre que la berbérine est responsable de la sécrétion du GLP-1 via activation des récepteurs TAS2R38. En comparaison des cellules contrôles, une concentration de 100 μ M de berbérine a presque doublé la sécrétion de l'incrétine (312). En revanche, la sécrétion provoquée par 100 μ M de berbérine est inférieure de 77% en comparaison de celle du phénylthiocarbamide (PTC) à 10 mM. Ce composé amer agoniste des récepteurs TAS2Rs a été utilisé en tant que témoin positif (313). Nous reviendrons sur l'effet sécrétagogue du PTC en fin de manuscrit. En plus de cette action sécrétagogue, la berbérine a également stimulé l'expression du récepteur TAS2R38 (100 μ M après 24h de mise en contact). Néanmoins, d'autres récepteurs et d'autres voies de signalisation cellulaires semblent être en jeu dans la sécrétion du GLP-1 provoqué par la berbérine. En effet, lors de l'annulation de l'expression du récepteur, les cellules exposées à la berbérine ont quand même sécrété du GLP-1 (312). Un autre point positif de cette étude est à souligner. En plus de l'évaluation de l'activité sécrétagogue sur les cellules NCI-H716, les chercheurs ont évalué la viabilité de cellules après leur exposition. Ce test de cytotoxicité permet d'affirmer que la berbérine n'est pas toxique pour les cellules entéroendocrines (312).

Une seconde étude fait état de l'évaluation de l'activité sécrétagogue de la berbérine par les cellules NCI-H716. Sur le modèle cellulaire, des concentrations de 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M et 100 μ M de berbérine ont été mis en contact avec les cellules pendant 2h afin d'étudier un potentiel effet sécrétagogue sur le GLP-1. Les chercheurs ont constaté une augmentation concentration dépendante de la sécrétion du GLP-1 induit par la berbérine. En plus de cela, les cellules exposées à la berbérine contenaient plus de GLP-1 dans leur cytoplasme (314). Les investigateurs ont également étudié l'effet de l'exposition des cellules à 100 μ M de berbérine sur la transcription des gènes du proglucagon et de la PC-1/3, deux éléments clés de la biosynthèse du GLP-1. Les cellules ayant été exposées à une concentration de 100 μ M de berbérine ont multiplié par 1,5 leur production d'ARNm pour le proglucagon et la PC-1/3 par rapport aux cellules contrôles. Via l'utilisation de différents inhibiteurs de certaines voies de signalisation cellulaires, cette étude démontre que la sécrétion du GLP-1 médiée par la berbérine fait intervenir l'enzyme PKC dans les cellules NCI-H716. Encore une fois, aucune toxicité vis-à-vis des cellules n'a été détectée après un test de réduction vitale du MTT (314).

Dans la même étude, l'effet de la berbérine a été évalué *in vivo* chez des rats SD. Deux doses différentes de berbérine ; 60 mg/kg ou 120 mg/kg, ont été administrées aux animaux sur une période de 5 semaines.

Sur ce modèle *in vivo*, une consommation prolongée de berbérine sur 5 semaines induit une augmentation de la concentration plasmatique du GLP-1 après une absorption de glucose. En revanche, cet effet est significatif seulement avec une forte dose de berbérine (120 mg/kg). L'augmentation de la concentration plasmatique du GLP-1 est associée à une diminution de la glycémie à jeun et la prise alimentaire chez les animaux. Au niveau du pancréas, une forte dose de berbérine induit une multiplication par deux de la production d'insuline suite à un gavage au glucose. Au niveau intestinal, une exposition prolongée à la berbérine augmente la prolifération des cellules L. Cette augmentation de la prolifération est 1,5 fois plus importante avec une dose de 60 mg/kg et 2,3 fois plus importante avec une dose de 120 mg/kg (314).

Une dernière étude sur la berbérine fait état de son action sécrétagogue *in vivo* chez des rats SD rendus diabétiques par la streptozotocine. Après une administration hebdomadaire de 120 mg/kg de berbérine sur une période de 8 semaines, la teneur plasmatique en GLP-1 était légèrement plus élevée chez les rats diabétiques traités en comparaison des rats diabétiques contrôles. Bien que le taux de GLP-1 plasmatique soit plus élevé chez les rats ayant reçu de la berbérine, celle-ci n'a pas restauré le niveau de sécrétion du GLP-1 en comparaison au groupe de rat non diabétique (315). Ces résultats sur la berbérine sont très encourageants. Ces études ont permis d'identifier une cible sur des modèles *in vitro* et de confirmer une action sécrétagogue *in vivo*. Un certain nombre de molécules appartenant à la famille des alcaloïdes isoquinoléiques et structurellement proches de la berbérine ont déjà été identifiées (316). Cependant, les résultats sont discordants par rapport à l'évaluation de sa toxicité en fonction de la lignée cellulaire utilisée. De plus amples investigations en testant des analogues permettraient de mettre en évidence un squelette moléculaire pour le développement de nouveaux principes actifs antidiabétiques.

3.3.6 Les alcaloïdes quinoléiques

- Quinine

En 1820, Joseph Pelletier et Joseph Caventou isolent pour la première fois les alcaloïdes de l'écorce du quinquina rouge (*Cinchona pubescens*) et jaune (*Cinchona calisaya*) (317). Parmi eux, la quinine, un alcaloïde amer quinoléique toujours utilisé en thérapeutique pour sa propriété antimalarique (318). Serait-il possible que la quinine provoque une sécrétion du

GLP-1 par les cellules entéroendocrines ? Des scientifiques de l'université de Tokyo ont voulu explorer cette question. Les chercheurs tkyoïtes ont pu démontrer que la quinine augmentait de manière concentration dépendante la concentration intracellulaire en Ca^{2+} .

Deux phénomènes sont à l'origine de cette augmentation. Le premier concerne la voie de cascade de signalisation cellulaire impliquant les récepteurs TAS2R, et l'autre l'inhibition des canaux K_{ATP} . L'inhibition des canaux potassiques ATP dépendant provoque une dépolarisation puis une ouverture des canaux Ca^{2+} dépendant du voltage. Or, on sait qu'une élévation du Ca^{2+} au niveau intracellulaire est à l'origine d'une exocytose de GLP-1 chez les cellules entéroendocrines (319). Cependant, une concentration de 300 μ M de quinine n'a pas suffi à stimuler la sécrétion du GLP-1 chez les cellules GLUTag. En utilisant un marqueur fluorescent, les chercheurs ont pu déterminer que la quinine participe au recrutement des vésicules contenant le GLP-1 au niveau de la membrane plasmique (319). Dans une autre publication, trois concentrations différentes de quinines ont été exposées aux cellules NCI-H716. Une augmentation significative de la sécrétion de GLP-1 s'est produite à 1 mM (réponse multipliée par 4) et 2 mM (réponse multipliée par 8). Des investigations complémentaires de transcriptomique ont permis de mettre en évidence que l'ARNm codant pour des récepteurs de la saveur amère sont surexprimés chez les cellules après une exposition de la quinine (2 mM). En parallèle des récepteurs amers de la famille des TAS2R, l'augmentation d'effecteurs intracellulaires impliqués dans la sécrétion du GLP-1 tels que des PDE (phosphodiesterase) et l' IP_3 , a aussi été constatée. Ces données semblent indiquer que l'action sécrétagogue du GLP-1 sur les cellules intestinales implique les récepteurs à la saveur amère et les cascades de signalisation des récepteurs aux protéines G qui y sont associées (320). Cependant la quinine présente une toxicité cardiaque, hématologique et hépatique (321). Il semble peu probable qu'un traitement d'une maladie chronique comme le diabète puisse inclure cet alcaloïde. D'autres alcaloïdes quinoléiques et les dérivés de la quinine n'ont pas encore fait l'objet d'étude sur la sécrétion du GLP-1. Les études présentées sur la quinine reflètent bien les différences de réponses biologiques en fonction de la lignée cellulaire utilisée.

3.3.7 Les pseudo-alcaloïdes aromatiques

- Capsaïcine

La capsaïcine est un des ingrédients majeurs du piment. Ce composé régule la sécrétion d'insuline et équilibre l'homéostasie glucidique aussi bien chez les animaux que chez l'humain (127,322). Cependant, peu de recherche sur les interactions entre le capsaïcine et les cellules entéroendocrines ont été réalisées. Après avoir confirmé que le récepteur TRPV1 est

exprimé par les cellules STC-1 et par certaines cellules de l'iléon de souris, des scientifiques ont hypothétisé un lien entre une augmentation de la sécrétion du GLP-1 et la capsaïcine (323). Il se trouve que la capsaïcine a une action agoniste sélective du récepteur TRPV1.

Sur les cellules STC-1, une dose de 1 μM de capsaïcine a provoqué une multiplication par 3 de la sécrétion du GLP-1. Cette sécrétion est liée au calcium et découle de l'activation du récepteur TRPV1. Ceci a été prouvé suite à l'utilisation d'antagonistes spécifiques du récepteur TRPV1 (capsazépine et iRTX), qui ont annulé l'effet sécrétagogue de la capsaïcine (127). *In vivo*, une dose de capsaïcine de 1 $\mu\text{mol/L}$ par voie orale, induit une augmentation de la concentration plasmatique en GLP-1 chez des souris C57BL/6J de phénotype sauvage. Cette augmentation de la sécrétion du GLP-1 est démultiplié ($\times 6$) après une HGPO. L'action sécrétagogue de la capsaïcine sur l'incrétine est absente chez les souris n'exprimant pas le récepteur TRPV1. Après une administration chronique de capsaïcine (1 $\mu\text{mol/L}$ quotidiennement pendant 24 semaines), les scientifiques ont constaté une augmentation de la concentration de GLP-1 plasmatique et dans l'iléon des animaux (127). D'un point de vue pharmacocinétique, la capsaïcine est un inhibiteur du cytochrome P450 (CYP 3A4/A5) (324). Cette inhibition peut entraîner des interactions médicamenteuses et affecté le métabolisme d'autre molécules utilisées dans le traitement du DT2.

3.3.8 Les composés soufrés

- Isothiocyanate d'allyle

L'isothiocyanate d'allyle est un composé organosulfuré responsable du goût piquant de condiments tels que la moutarde, le raifort et le wasabi. Il est en réalité un produit de dégradation de glucosinolates par une enzyme, la myrosinase (325). À une concentration de 100 $\mu\text{mol/L}$, l'isothiocyanate d'allyle multiplie par deux la sécrétion du GLP-1 chez les cellules GLUTag, et provoque un niveau de sécrétion similaire sur des cellules entéroendocrines primaires de souris (295). La sécrétion du GLP-1 par ce métabolite soufré fait intervenir le canal TRPA1. Le rôle de ce canal a été prouvé par inhibition de la sécrétion chez des cellules n'exprimant pas le récepteur et par l'utilisation d'antagonistes pharmacologiques (295). Chez des souris C57BL/6J, un gavage par 15 mg/kg de poids corporel d'isothiocyanate d'allyle provoque une augmentation de la concentration veineuse de GLP-1. Cette augmentation de la sécrétion a été retrouvée aussi bien chez les souris sauvages que chez les souris n'exprimant pas le TRPA1 (295). Cette observation ouvre de nouvelles hypothèses quant au mécanisme d'action de l'isothiocyanate d'allyle vis-à-vis du GLP-1 *in vivo* avec l'implication d'une autre voie de signalisation ou une inhibition des enzymes qui dégradent le GLP-1.

- Phénylthiocarbamide

L'activation des senseurs de la saveur amère est associée physiologiquement à la détection d'un empoisonnement. Cela permet au corps d'activer des mécanismes qui limite l'absorption au niveau du tractus digestif et la diminution de la vidange gastrique. Ces mécanismes physiologiques seraient médiés par différentes hormones dont le PYY, le CCK, la ghréline et le GLP-1 (326,327). Parmi les composés les plus amers, on trouve le phénylthiocarbamide (PTC). Il est produit par différentes plantes appartenant au genre *Brassica* (328). Il semblerait que ce composé soit synthétisé par les plantes comme mécanisme de défense contre les herbivores. Le PTC est un puissant agoniste des récepteurs TAS2R38, qui sont des senseurs de la saveur amère. Après avoir procédé à des biopsies d'iléon humain, des chercheurs ont prouvé que le GLP-1 est colocalisé avec le récepteur TAS2R8 dans les cellules L intestinales (328). Malheureusement cette publication ne fait pas état de l'effet sécrétagogue du PTC sur les cellules entéroendocrines. Or, nous avons précédemment présenté une étude sur la berbérine où le PTC a été utilisé comme témoin positif pour la sécrétion du GLP-1. Dans cette étude, le PTC induit bien une augmentation dose-dépendante de la sécrétion du GLP-1 sur les cellules NCI-H716 (313). La sécrétion de l'incrétine était multipliée par plus de deux ($\times 2,6$) par rapport aux cellules témoins pour une dose de 10 mM. La toxicité du PTC reste sujette à controverse (329). Une meilleure étude de son métabolisme *in vivo* permettrait d'évaluer son utilisation sur le long terme pour traiter des maladies chroniques comme le diabète.

3.4 Etudes d'extraits de plantes sur l'homme

- *Camellia sinensis*

Les composés de la famille des flavonoïdes du théier (*Camellia sinensis*, *Theaceae*) comme la catéchine, l'épigallocatechine gallate et l'épicatéchine gallate seraient impliqués dans l'amélioration de l'équilibre glycémique et lipidique des patients diabétiques (330). Une étude clinique randomisée en double aveugle versus placebo a été menée auprès de 77 patients atteints d'un DT2 dans le but de vérifier les propriétés antidiabétiques de cette plante. Le protocole de l'étude se fondait sur l'administration d'un extrait de thé vert décaféiné dont les teneurs en catéchine et ses dérivés ont été standardisées. La posologie était de 500 mg d'extrait de thé vert trois fois par jour pendant 16 semaines après les repas (331). Cette étude

clinique a démontré que la prise d'un extrait de thé vert augmente la concentration plasmatique de GLP-1. Il n'y a pas eu d'effets indésirables détectés au cours de l'étude.

Malheureusement l'augmentation de la sécrétion du GLP-1 n'était pas significative entre les différents groupes de l'étude. Les expérimentateurs ne savent pas si ce niveau de GLP-1 est suffisant pour induire des effets bénéfiques sur l'homéostasie glucidique (331). En dehors de la sécrétion du GLP-1, la consommation de l'extrait de thé vert n'a pas eu d'impact sur la glycémie à jeûne ou sur l'hémoglobine glyquée (HbA1c, marqueur biologique de l'équilibre glycémique sur une période de deux à trois mois). D'autres études cliniques doivent confirmer ces résultats en incluant un plus grand nombre de patients et en tenant compte du stade d'évolution du DT2. Il serait sage d'évaluer l'effet des flavonoïdes de l'extrait directement sur une lignée cellulaire productrice de GLP-1. L'effet de ces molécules sur l'inhibition de la DPP4 doit également faire l'objet d'expérimentations pour confirmer une réelle action sécrétagogue.

- *Cinnamomum cassia*

La cannelle est une épice préparée à partir de l'écorce du cannelier, en latin *Cinnamomum spp.* (*Lauraceae*). Les propriétés pharmacologiques de cette plante sont bien étudiées et de nombreuses études scientifiques valident son utilisation traditionnelle (332). Deux études sur les rats ont permis d'établir que la cannelle améliore la fonction du récepteur à l'insuline et par conséquent l'utilisation ou le stockage intracellulaire du glucose (333). Chez l'homme, une étude sur 60 sujets diabétiques a conclu qu'une consommation de 1, 3 ou 6 grammes de cannelles par jour sur une période de 40 jours permet de réduire efficacement la glycémie (334). Les mécanismes de ces effets bénéfiques ne sont pas encore totalement élucidés. Une équipe de chercheurs suédois a cherché à faire le lien entre la consommation de cannelles et la sécrétion du GIP et du GLP-1 (335). Seulement 15 sujets sains ont été inclus dans cette étude. Le design de l'étude a consisté en la consommation d'un repas standardisé (riz au lait 300 g), auquel 1 g ou 3 g de poudre de cannelle (*C. cassia*) ont été adjoints. Pour les sujets contrôles, le repas consommé était le même sans la cannelle. Ces trois différents repas ont été consommés aléatoirement par les sujets avec un changement de repas toutes les semaines. L'expérimentation a duré au maximum deux mois. Les résultats montrent que la consommation du repas avec 3 g de poudre de cannelle a induit une légère augmentation de la concentration maximale (*Cmax*) en GLP-1. Par rapport au repas témoin, les 3 g de cannelle ont augmenté la *Cmax* du GLP-1 de 10%.

L'écart maximal de la concentration en GLP-1 par rapport à la ligne de base a été plus que doublé chez les sujets ayant consommé le repas adjoint de 2 g de poudre de cannelle (335). Le trop petit nombre de participants vient contraster les résultats de l'étude. De plus amples investigations doivent être menées pour savoir si la cannelle a un réel effet sur la sécrétion des incrétines. D'autres études de la consommation de cannelle chez l'homme n'ont pas permis de mettre en évidence d'effet bénéfique sur le contrôle du diabète (336,337). Les études approfondies de la sécrétion du GLP-1 par des extraits ou des poudres de plantes sur l'homme sont très rares.

3.5 Conclusion

La dernière partie de ce travail se concentre sur les molécules naturelles qui ont provoqué une augmentation de la sécrétion du GLP-1 tous modèles d'études confondus. Il est indubitable que les molécules sécrétagogues du GLP-1 sont d'une grande diversité chimique. Les tableaux des **Annexes I à IX** font le bilan de l'activité de toutes les molécules naturelles présentées dans la dernière partie. Certains sont des composés très répandus dans le règne végétal comme les composés polyphénoliques. D'autres sont plus spécifiques à une famille comme les ginsénosides des plantes du genre *Panax* ou bien encore les prégnanes glycosylés chez les *Apocynaceae*.

Certaines molécules actives des extraits ont pu être isolées. Parmi celles-ci, on trouve l'acide loganique de *G. scabra*, les cucurbitanes de *M. charantia*, l'acide quinovique et ses dérivés chez *F. cretica* ou encore les acides-phénols d'*I. batatas* et *I. paraguariensis*. Certaines cibles pharmacologiques ont été clairement identifiées dans la sécrétion du GLP-1 pour ces métabolites de plantes. On peut citer les récepteurs de la famille TAS2R pour les composés amers comme les alcaloïdes et les composés soufrés ou encore le récepteur des acides biliaires TGR5, par lequel les triterpènes induisent leur action sécrétagogue. Cependant, aucun récepteur n'a encore été identifié pour expliquer l'activité des molécules de la famille des acides-phénols ou de certains flavonoïdes. Des composés de classes chimiques différentes peuvent agir sur le même type de récepteur. C'est le cas pour certains prégnanes et certaines coumarines qui agissent sur le récepteur GPR119.

Conclusion

Le diabète est une maladie métabolique complexe dont l'évolution épidémiologique est préoccupante. De plus en plus de patients sont diagnostiqués avec un DT2 et la progression de la prévalence est très inquiétante dans les pays en développement. Depuis les insulines, la découverte du GLP-1 est la dernière révolution dans un contexte de prise en charge du diabète. Cette hormone intestinale joue un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie glucidique. Les dernières thérapeutiques développées autour de cette hormone consistent en un apport exogène d'analogues du GLP-1 ou l'inhibition des enzymes responsables de sa dégradation.

Une autre approche innovante autour du GLP-1 est à la base de ce travail bibliographique. Ce manuscrit répertorie l'ensemble des extraits des plantes et des molécules naturelles ayant la capacité de stimuler la sécrétion du GLP-1. Cette stratégie permettrait d'enrichir l'arsenal antidiabétique et d'améliorer l'observance des patients par la voie d'administration *per os*.

L'étude du potentiel sécrétagogue du GLP-1 peut être effectué sur des modèles cellulaires ou animaux. Parmi les modèles cellulaires, les cellules NCI-H716 sont les plus utilisées. Ce sont les seules cellules d'origine humaine pour l'étude des incrétines. Les modèles cellulaires permettent d'étudier en détail les mécanismes pharmacologiques impliqués dans la sécrétion du GLP-1. Ils permettent également de recueillir facilement des indications sur la toxicité des extraits ou des molécules testées. Malheureusement, les modèles d'études cellulaires ont montré leur limite à travers les exemples de la berbérine où des résultats discordants ont été obtenus entre la lignée NCI-H716 et la lignée STC-1.

Dans l'optique de développer de nouveaux médicaments, les résultats obtenus sur les cellules doivent être confirmés sur un modèle *in vivo*. En ce qui concerne les modèles murins, les rats GK sont le meilleur modèle d'étude pour le DT2. Malheureusement peu de chercheurs utilisent ces animaux. Dans la majorité des études présentées dans ce manuscrit, les animaux ne sont pas diabétiques ou bien le diabète est induit par l'utilisation d'agents chimiques toxiques. Cette induction chimique du diabète est plus proche de ce qui se produit lors d'un DT1 et les thérapeutiques développées autour du GLP-1 sont à destination des patients atteints d'un DT2.

Les médecines traditionnelles asiatiques sont à l'origine de nombreuses études sur la sécrétion du GLP-1. On peut envisager l'utilisation d'extraits des plantes décrites sous forme de compléments alimentaires ou de médicaments si le dépistage du DT2 est précoce et sans complication. Les extraits de plantes ont l'avantage de contenir plusieurs molécules qui ne vont pas agir uniquement sur la sécrétion du GLP-1 mais aussi sur d'autres organes impliqués dans la régulation de l'homéostasie glucidique. Concernant les molécules pures sécrétagogues du GLP-1, elles sont d'une grande diversité chimique et certaines cibles pharmacologiques ont pu être identifiées. Néanmoins, il y a un manque cruel d'études sur l'homme pour confirmer le potentiel antidiabétique de ces extraits et molécules.

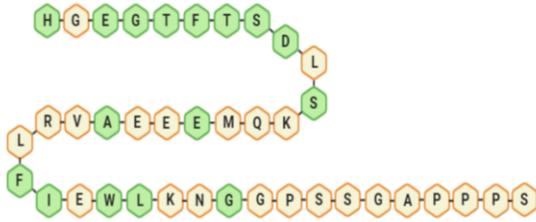
Annexes

Annexe I : Les différentes insulines actuellement sur le marché

Type d'insuline		Spécialité pharmaceutique	Type d'action	Délai d'action	Durée d'action
Analogues	Lispro	HUMALOG®	Ultrarapide (ou brève)	15 min	2 à 5h
	Aspartate	FIASP® NOVORAPID®			
	Glulisine	APIDRA®			
Ordinaire		ACTRAPID® UMULINE Rapide® INSUMAN®	Rapide	30 min	5 à 8h
Insuline isophane ou NPH		INSULATARD® UMULINE NPH®	Intermédiaire	1 à 4h	12 à 14h
Analogues	Glargine	LANTUS®	Lente	2 à 4h	24h à 42h
		TOUJEO®			
		ABASAGLAR®			
	Détémir	LEVEMIR®			
	Dégludec	TRESIBA®			
Mélanges	Analogues d'insuline d'action intermédiaire + insuline rapide	HUMALOG MIX®	Intermédiaire + Rapide	15 min	14 à 20h
		NOVOMIX®			
	Insuline ordinaire d'action intermédiaire à début d'action rapide	MIXTARD® UMULINE Profil®		30 min	18 à 20h

Annexe II : Structures, homologies et demi-vie des analogues du GLP-1 sur le marché français

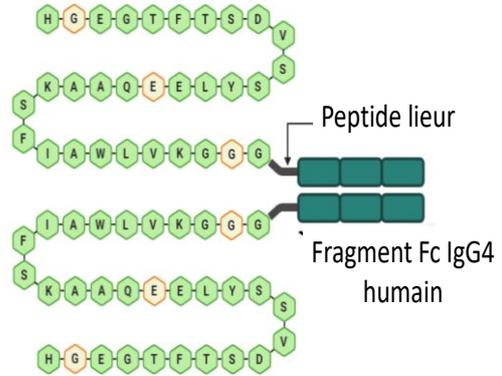
Exenatide



53% d'homologie GLP-1 humain

$t_{1/2} = 2,4 \text{ h}$

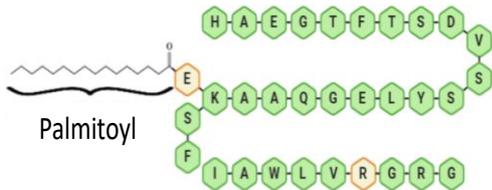
Dulaglutide



90% d'homologie GLP-1 humain

$t_{1/2} = 5 \text{ j}$

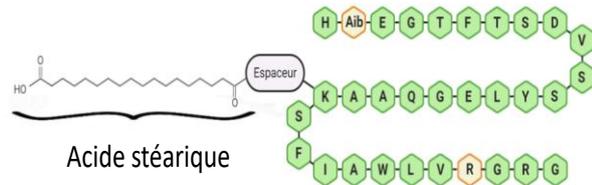
Liraglutide



97% d'homologie GLP-1 humain

$t_{1/2} = 8 \text{ à } 12 \text{ h}$

Sémaglutide



94% d'homologie GLP-1 humain

$t_{1/2} = 7 \text{ j}$

 Acide aminé différent du GLP-1 humain

 Acide aminé identique au GLP-1 humain

Annexe III : Action sécrétagogue du GLP-1 d'extraits de plantes sans identification des métabolites actifs

Plante	Extrait (→ fraction)	Modèle d'étude	Dose	Réponse sécrétion du GLP-1		Cible ou voie de signalisation cellulaire	Référence
				Contrôle	Témoin positif		
<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	Aqueux (→ AcOEt)	Cellules NCI-H716	100 µg/mL	× 22	/	↘ Expression des canaux K ⁺	(211)
<i>Beta vulgaris</i>	Ethanolique (→aqueuse)	Souris diabétiques (<i>db/db</i>)	Dose unique de 200 mg/kg av. HGPO	× 1,5 (30 min ap. HGPO)	/	n/a	(214)
<i>Bupleurum falcatum</i>	Aqueux (→ hexane)	Cellules NCI-H716	500 µg/mL	× 26	× 14,4 (Quinine 2mM)	↘ Expression des canaux K ⁺ + RCPG et l'activation de la phospholipase C	(216)
<i>Citrus aurantium</i>	Ethanol (→ hexane)	Cellules NCI-H716	100 µg/mL	× 15	× 3 (Quinine 2 mM)	Implication des canaux K ⁺ et influx Ca ²⁺	(217)
<i>Spergularia marina</i>	Hydroalcoolique	Cellules NCI-H716	500 µg/mL	× 5	≈ l'acide lithocholique à 10 µg/mL	Récepteur TGR-5	(220)

/ : pas d'utilisation de témoin positif lors de l'étude ; ↘ : diminution ; ap. : après ; av. : avant ; ≈ : niveau de sécrétion équivalent

Annexe IV : Action sécrétogogue du GLP-1 des extraits de *Gentiana scabra*, d'*Oparanthus teikiteetini* et de leurs composés

Plante	Extrait (→ fraction)	Modèle d'étude	Dose	Réponse sécrétion du GLP-1		Cible ou voie de signalisation cellulaire	Référence
				Contrôle	Témoin positif		
<i>Gentiana scabra</i>	Ethanol des écorces (→ AcOEt)	Cellules NCI-H716	100 µg/mL	× 3	/	RCPG + ↘ Expression des canaux K ⁺ IP ₃ et récepteurs aux composés amers	(222)
	Ethanol des racines (→ AcOEt)		750 µg/mL	× 3	/		(223)
	Aqueux des racines	Souris diabétiques (<i>db/db</i>)	Dose unique de 300 mg/kg av. HGPO	× 7 (10 min ap. adm.)	/	n/a	
→ Métabolite actif = Acide loganique		Cellules NCI-H716	100 µM	× 1,4	/		
<i>Oparanthus teikiteetini</i>	AcOEt des feuilles	Cellules STC-1	30 µg/mL	× 2,5	/	n/a	(224)
→ Métabolite actif = Costunolide			100 µM	× 1,6	/	n/a	
→ Métabolite actif = 12-hydroxytrémétone			100 µM	× 3	/	n/a	
→ Métabolite actif = Jasopyrane			100 µM	× 2	/	n/a	

/ : pas d'utilisation de témoin positif lors de l'étude ; ↘ : diminution ; n/a : données manquantes, ap. : après ; av. : avant ; adm. : administration

Annexe V : Action sécrétagogue du GLP-1 des extraits de *Momordica charantia*, de *Fagonia cretica* et de leurs composés

Plante	Extrait (→ fraction)	Modèle d'étude	Dose	Réponse sécrétion du GLP-1		Cible ou voie de signalisation cellulaire	Référence
				Contrôle	Témoin positif		
<i>Momordica charantia</i>	→ Fraction enrichie en MBPM	Cellules STC-1	70 µg/mL	× 2	/	Récepteurs aux composés amers + phospholipase Cβ2	(233)
	→ Fraction enrichie en composés amers		100 µg/mL	× 3	/		
	Fraction enrichie en MBPM	Souris C57BL/6J saines	Dose unique 5 g/kg	×1,7 (30 min ap. adm)	/	n/a	
	Aqueux	Rats Wistar diabétiques	Dose unique 300 mg/kg	× 1,6 (20 min ap. adm)	/	n/a	(235)
→ Métabolite actif = <u>Cucurbitane 1</u>		Cellules STC-1	246 µM	× 6	/	n/a	(233)
→ Métabolite actif = <u>Karavilagénine E</u>			440 µM	× 3,5	/	n/a	
<i>Fagonia cretica</i>	CHCl ₃ / MeOH	Cellules STC-1	250 µg/mL	× 55	/	⬆ Expression des gènes glucagon et la PC-1/3 (Possible implication récepteur TGR-5)	(237)
→ Métabolite actif = <u>Acide quinovique</u>			50 µg/mL	× 6	/		
→ Métabolite actif = <u>Hétéroside acide quinovique 1</u>			50 µg/mL	× 11	/		
→ Métabolite actif = <u>Hétéroside acide quinovique 2</u>			50 µg/mL	× 20	/		

/ : pas d'utilisation de témoin positif lors de l'étude ; ⬆ : augmentation n/a : données manquantes, ap. : après ; adm : administration ; ≈ : niveau de sécrétion équivalent

Annexe VI : Action sécrétagogue du GLP-1 des extraits d'*Olea europaea*, de *Panax ginseng* et de leurs triterpènes

Plante	Extrait (→ fraction)	Modèle d'étude	Dose	Réponse sécrétion du GLP-1		Cible ou voie de signalisation cellulaire	Référence
				Contrôle	Témoin positif		
<i>Olea europaea</i>	CH ₂ Cl ₂	Cellules STC-1	1 mg/mL	× 1,5	< glutamine (40 mM)	n/a	(239)
		Souris C57BL/6J saines	Dose unique de 100 mg/kg avec HGPO	× 1,5 (10 minute ap. adm)	Comparable à la glutamine (1g/kg)		
→ Métabolite actif = <u>Acide oléanolique</u>		Cellules STC-1	10 µM	× 4	/	Récepteur TGR-5	(241)
→ Métabolite actif = <u>Acide bétulinique</u>		Cellules NCI-H716	10 µM	× 2,3	≈ l'acide lithocholique à 10 µM		(244)
→ Métabolite actif = <u>Acide ursolique</u>		Cellules NCI-H716	1 µM	× 2,3	/		(247)
		Rats SD diabétiques	30 mg/kg (dose unique)	× 1,5	/	n/a	
<i>Panax ginseng</i>	Extrait enrichi en ginsénosides	Rats SD diabétiques	Dose quotidienne de 300 mg/kg pdt 4 sem	× 3,8 (30 min ap. adm + HGPO)	/	↑ ARNm du gène du proglucagon et cellules L dans l'iléon	(249)
→ Métabolite actif = <u>Ginsénoside Rb1</u>		Cellules NCI-H716	200 µM	× 2	/	n/a	
→ Métabolite actif = <u>Composé K</u>			100 µM	× 8	× 2 (acide lithocholique à 30 µM)	Récepteur TGR-5	(256)

/ : pas d'utilisation de témoin positif lors de l'étude ; ↑ : augmentation ; n/a : données manquantes, ap. : après ; adm : administration ; pdt : pendant ; ≈ : niveau de sécrétion équivalent

Annexe VII : Action sécrétagogue du GLP-1 des extraits des plantes de la famille des *Apocynaceae* et des prégnanes

Plante	Extrait (→ fraction)	Modèle d'étude	Dose	Réponse sécrétion du GLP-1		Cible ou voie de signalisation cellulaire	Référence
				Contrôle	Témoin positif		
<i>Hoodia gordonii</i>							
→ Métabolite actif = <u>Gordonoside F</u>		Souris C57BL/6J	200 mg/kg (dose unique)	× 2	< AR231453 (20 mg/kg)	Récepteur GPR119	(260)
<i>Cynanchum menarandrense</i>	Ethanolique (→ AcOEt)	Cellules STC-1	100 µg/mL	× 2,5	/	n/a	(263)
<i>Cynanchum marnierianum</i>	Ethanolique		100 µg/mL	× 2,7	/	n/a	(264)
Métabolite actif = <u>Marnieranoside A</u>			100 µM	× 1,3	/	n/a	
Métabolite actif = <u>Marnieranoside B</u>			100 µM	× 1,3	/	n/a	
<i>Hoodia gordonii</i> et <i>Apocynaceae spp.</i>							
→ Métabolite actif = <u>P57</u>		Cellules STC-1	100 µM	× 1,3	Témoin positif dans l'étude	n/a	(265)
→ Métabolite actif = <u>Otophylloside A</u>			100 µM	× 2	/	n/a	
→ Métabolite actif = <u>Wilfoside C3N</u>			100 µM	× 2	/	n/a	
→ Métabolite actif = <u>Wilfoside C1N</u>			100 µM	× 2	/	n/a	

/ : pas d'utilisation de témoin positif lors de l'étude ; n/a : données manquantes ; < = sécrétion inférieure à

Annexe VIII : Action sécrétagogue du GLP-1 des anthocyanes de *Ribes nigrum* et des flavonoïdes de *Glycine max* et de ses préparations

Plante	Extrait (→ fraction)	Modèle d'étude	Dose	Réponse sécrétion du GLP-1		Cible ou voie de signalisation cellulaire	Référence
				Contrôle	Témoin positif		
<i>Ribes nigrum</i>	Commercial (enrichi en anthocyanes)	Rats SD sains	Dose unique 5 mg/kg av. TGIP	× 2,5 (15 min ap. TGIP)	/	n/a	(267)
→ Métabolite actif = <u>Delphinidine-3-rutoside</u>		Cellules GLUTag	100 µM	× 2	/	Récepteurs GPR40/120	(269)
<i>Glycine max</i>	MeOH de Meju	Cellules NCI-H716	5 µg/mL (60 j de fermentation)	× 2	/	n/a	(271)
→ Métabolite actif = <u>Daidzéine</u>			5 µM	× 1,9	/	n/a	
→ Métabolite actif = <u>Génistéine</u>			100 µM	× 1,5	/	n/a	
		Rats Wistar diabétiques	20 mg/kg/j pdt 30 j	× 2	/	n/a	(275)
<i>Glycine max</i>	Extrait enrichi en polyphénols	Rats SD diabétiques	Dose quotidienne de 20 mg/kg pdt 8 sem	× 1,8 (30 min ap. adm)	Comparable sitgliptine (20 mg/kg pdt 8 sem)	n/a	(278)
	Farine tégumentaire		Dose quotidienne de 1 g/kg pdt 8 sem				
<i>Glycine max</i>	Extrait MeOH (graines ap. fermentation fongique)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	(281)
→ Métabolite actif = <u>Glycéollines I, II et III</u>		Cellules NCI-H716	5 µM	× 2	/	n/a	

/ : pas d'utilisation de témoin positif lors de l'étude ; n/a : données manquantes, ap. : après ; av. : avant ; adm : administration

Annexe IX : Action sécrétagogue du GLP-1 des plantes *Ipomoea batatas*, *Ilex paraguariensis*, *Arctium lappa* et *Angelica dahurica* et de leurs métabolites actifs

Plante	Extrait (→ fraction)	Modèle d'étude	Dose	Réponse sécrétion du GLP-1		Cible ou voie de signalisation cellulaire	Référence
				Contrôle	Témoin positif		
<i>Ipomoea batatas</i>	Hydro - alcoolique	Cellules GLUTag	10 mg/mL	× 15	× 3 (Glutamine 10mM)	n/a	(282)
		Rats SD sains	Dose unique 2 g/kg av. TGIP	× 2 (15 min ap. TGIP)	/	n/a	
→ Métabolite actif = <u>Acide tricaféoylquinique</u>		Cellules GLUTag	10 mM	× 12	/	n/a	
<i>Ilex paraguariensis</i>	Aqueux	Souris ddY saines	100 mg/kg/j pdt 3 sem	× 3,7	/	n/a	(284)
→ Métabolite actif = <u>Acide dicaféoylquinique</u>		Souris ddY saines	100 mg/kg (dose unique)	× 1,7	≈ l'acide α-linolénique (20 mg/kg)	n/a	
→ Métabolite actif = <u>Acide chlorogénique</u>		Cellules STC-1	40 mM	× 2,4	/	n/a	(239)
<i>Arctium lappa</i>	→ Fraction enrichie en liganes	Rats GK diabétiques	2 doses / j de 100 mg/kg av. repas	× 2 (30 min ap. HGPO)	× 1,1 (30 min ap. HGPO + 50 mg/kg de natéglinide)	n/a	(289)
<i>Angelica dahurica</i>	MeOH (racine)	Cellules GLUTag	100 µg/mL	× 1,8		GPR 119	(290)
→ Métabolite actif = <u>Impératorine</u>			100 µM	× 4	/		
→ Métabolite actif = <u>Phélloptérine</u>			100 µM	× 4,5	/		

/ : pas d'utilisation de témoin positif lors de l'étude ; n/a : données manquantes ; ap. : après ; av. : avant ; j : jour ; pdt : pendant ; sem : semaine ; ≈ : niveau de sécrétion équivalent

Annexe X: Action sécrétagogue du GLP-1 de molécules naturelles

Famille de métabolite secondaire	Molécule	Modèle d'étude	Dose (modalités d'adm)	Réponse sécrétion du GLP-1		Cible	Référence
				Modèle contrôle	Témoin positif		
Monoterpène	Carvacrol	Cellules primaires (iléon murin)	50 µM	× 1,6	/	Canal TRPA1	(295)
Diterpènes	Rebaudioside A	SDIP	2,5 mM	× 2,3	× 2,3 (saccharose 2,5 mM)	n/a	(297)
Sesquiterpènes	Déoxynivalénol	Cellules STC-1	2 mM	× 3	/	RCPG CaSR TRPM5 et TRPA1	(303)
Stilbénoïde	Resvératrol	Souris C57BL/6J diabétiques	60 mg/kg/j pdt 5 sem	× 3	/	n/a	(308)
Alcaloïde isoquinoléïque	Berbérine	Cellules NCI-H716	100 µM	× 1,9	< PTC (10 mM)	Récepteur TAS2R38	(312)
		Rats SD sains	120 mg/kg/j pdt 5 sem	× 1,7	/		(314)
		Rats SD diabétiques	120 mg/kg 1 prise/sem pdt 8 sem	× 1,5	/		(315)
Alcaloïde quinoléïque	Quinine	Cellules NCI-H716	2 mM	× 8	/	Récepteur TAS2R	(319)
Pseudo-alcaloïde aromatique	Capsaïcine	Cellules STC-1	1 µM	× 3	/	Récepteur TRPV1	(127)
		Souris C57BL/6J saine	1 µmol/L (dose unique + HGPO)	× 6	/		
Composé soufré	Isothiocyanate d'allyle	Cellules GLUTag	100 µM	× 2	/	Récepteur TRPA1	(295)
		Cellules L primaires	100 µM	× 1,6	/		
		Souris C57BL/6J	15 mg/kg (dose unique)	× 2	/		
	Phénylthiocarbamide	Cellules NCI-H716	10 mM	× 2,6	/	n/a	(328)

/ : pas d'utilisation de témoin positif lors de l'étude ; n/a : données manquantes ; ap. : après ; av. : avant ; pdt : pendant ; sem : semaine ; < : niveau de sécrétion inférieur à

Références bibliographiques

1. OMS | Rapport mondial sur le diabète [Internet]. WHO. [cité le 30 mai 2018]. Disponible sur : <http://www.who.int/diabetes/global-report/fr/>
2. CDC. Type 2 Diabetes [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2019 [cité 27 sept 2020]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/diabetes/basics/type2.html>
3. Rolfe DF, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev.* 1997 ; 77(3) : 731-58.
4. Gerich JE. Physiology of glucose homeostasis. *Diabetes Obes Metab.* 2000 ; 2(6) : 345-50.
5. Marwood SF. Diabetes mellitus-some reflections. *J R Coll Gen Pract.* 1973 ; 23(126) : 38-45.
6. Histoire de diabète [Internet]. News-Medical.net. 2009 [cité 27 sept 2020]. Disponible sur : [https://www.news-medical.net/health/History-of-Diabetes-\(French\).aspx](https://www.news-medical.net/health/History-of-Diabetes-(French).aspx)
7. Haute Autorité de Santé - Prévention et dépistage du diabète de type 2 et des maladies liées au diabète [Internet]. [cité le 3 juin 2018]. Disponible sur : https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2012494/fr/prevention-et-depistage-du-diabete-de-type-2-et-des-maladies-liees-au-diabete
8. Pociot F, Akolkar B, Concannon P, Erlich HA, Julier C, Morahan G, et al. Genetics of Type 1 Diabetes: What's Next? *Diabetes.* 2010 ; 59(7) : 1561-71.
9. Wolf E, Spencer KM, Cudworth AG. The genetic susceptibility to type 1 (insulin-dependent) diabetes: Analysis of the HLA-DR association. *Diabetologia.* 1983 ; 24(4):224-30.
10. Afonso G, Mallone R. Infectious triggers in type 1 diabetes: is there a case for epitope mimicry? *Diabetes Obes Metab.* 2013 ; 15 Suppl 3 : 82-8.
11. Stene LC, Rewers M. Immunology in the clinic review series ; focus on type 1 diabetes and viruses: the enterovirus link to type 1 diabetes: critical review of human studies. *Clin Exp Immunol.* 2012 ; 168(1) : 12-23.
12. Viskari H, Knip M, Tauriainen S, Huhtala H, Veijola R, Ilonen J, et al. Maternal enterovirus infection as a risk factor for type 1 diabetes in the exposed offspring. *Diabetes Care.* 2012 ; 35(6) : 1328-32.
13. Krogvold L, Edwin B, Buanes T, Frisk G, Skog O, Anagandula M, et al. Detection of a low-grade enteroviral infection in the islets of langerhans of living patients newly diagnosed with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2015 ; 64(5) : 1682-7.
14. Verge CF, Howard NJ, Irwig L, Simpson JM, Mackerras D, Silink M. Environmental factors in childhood IDDM. A population-based, case-control study. *Diabetes Care.* 1994 ; 17(12) : 1381-9.
15. Chia JSJ, McRae JL, Enjapoori AK, Lefèvre CM, Kukuljan S, Dwyer KM. Dietary cows' milk protein A1 β -casein increases the incidence of T1D in NOD mice. *Nutrients.* 2018 ; 10(9).
16. Åkerblom HK, Vaarala O, Hyöty H, Ilonen J, Knip M. Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. *Am J Med Genet.* 2002 ; 115(1) : 18-29.
17. Hoorfar J, Buschard K, Dagnaes-Hansen F. Prophylactic nutritional modification of the incidence of diabetes in autoimmune non-obese diabetic (NOD) mice. *Br J Nutr.* 1993 ; 69(2) : 597-607.

18. Virtanen SM, Jaakkola L, Räsänen L, Ylönen K, Aro A, Lounamaa R, et al. Nitrate and nitrite intake and the risk for type 1 diabetes in Finnish children. *Diabet Med.* 1994 ; 11(7) : 656-62.
19. Graham S, Courtois P, Malaisse WJ, Rozing J, Scott FW, Mowat AMI. Enteropathy precedes type 1 diabetes in the BB rat. *Gut.* 2004 ; 53(10) : 1437-44.
20. Secondulfo M, Iafusco D, Carratù R, deMagistris L, Sapone A, Generoso M, et al. Ultrastructural mucosal alterations and increased intestinal permeability in non-celiac, type I diabetic patients. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver.* 2004 ; 36(1) : 35-45.
21. Jalonen T, Isolauri E, Heyman M, Crain-Denoyelle AM, Sillanaukee P, Koivula T. Increased beta-lactoglobulin absorption during rotavirus enteritis in infants : relationship to sugar permeability. *Pediatr Res.* 1991 ; 30(3) : 290-3.
22. Coyne CB, Bergelson JM. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell.* 2006 ; 124(1) : 119-31.
23. Karczewski J, Troost FJ, Konings I, Dekker J, Kleerebezem M, Brummer R-JM, et al. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010 ; 298(6) : 851-9.
24. Larousse É. Définitions : cétose - Dictionnaire de français Larousse [Internet]. Disponible sur: <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/c%C3%A9tose/14376>
25. Universalis . Révélation du diabète sucré [Internet]. Encyclopædia Universalis. Disponible sur: <https://www.universalis.fr/encyclopedie/diabete>
26. Isabelle LP. Haute Autorité de santé. 2014 ; 71.
27. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000 ; 106(2) : 171-6.
28. Zierath JR, Krook A, Wallberg-Henriksson H. Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetologia.* 2000 ; 43(7) : 821-35.
29. Rondinone CM, Wang L-M, Lonroth P, Wesslau C, Pierce JH, Smith U. Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 ; 94(8) : 4171-5.
30. Morgan BJ, Chai SY, Albiston AL. GLUT4 associated proteins as therapeutic targets for diabetes. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov.* 2011 ; 5(1) : 25-32.
31. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005 ; 115(5) : 1111-9.
32. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol-Endocrinol Metab.* 2001 ; 280(5) : 745-51.
33. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest.* 2008 ; 118(9) : 2992-3002.
34. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li Z-W, Long JM, et al. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med.* 2005 ; 11(2) : 191-8.

35. Reaven GM, Hollenbeck C, Jeng CY, Wu MS, Chen YD. Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes*. 1988 ; 37(8) : 1020-4.
36. Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*. 1997 ; 46(1) : 3-10.
37. Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest*. 1996 ; 97(12) : 2859-65.
38. Paolisso G, Gambardella A, Amato L, Tortoriello R, D'Amore A, Varricchio M, et al. Opposite effects of short- and long-term fatty acid infusion on insulin secretion in healthy subjects. *Diabetologia*. 1995 ; 38(11) : 1295-9.
39. Unger RH. Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med*. 2002 ; 53 : 319-36.
40. Boden G. Free fatty acids, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Proc Assoc Am Physicians*. 1999 ; 111(3) : 241-8.
41. Kim C-H, Kim H-K, Kim EH, Bae SJ, Park J-Y. Relative contributions of insulin resistance and β -cell dysfunction to the development of Type 2 diabetes in Koreans. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 2013 ; 30(9) : 1075-9.
42. Barroso I. Genetics of Type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2005 ; 22(5) : 517-35.
43. Schlienger J-L. Complications du diabète de type 2. *Presse Médicale*. 2013 ; 42(5) : 839-48.
44. Andrès E, Blicklé JF. Microangiopathie diabétique : de la physiopathologie au traitement. 1999 ; 7.
45. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *The Lancet*. 2010 ; 376(9735) : 124-36.
46. 11-Néphrologie 8^e édition chap11.pdf [Internet]. [cité le 28 oct 2020]. Disponible sur: http://cuen.fr/manuel/IMG/pdf/11-nephrologie_8e-edition_chap11.pdf
47. Quarles RH, Weiss MD. Autoantibodies associated with peripheral neuropathy. *Muscle Nerve*. 1999 ; 22(7) : 800-22.
48. Rapport pied diabétique.pdf [Internet]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/rapport_pied_diabetique.pdf
49. Laight DW, Carrier MJ, Änggård EE. Endothelial cell dysfunction and the pathogenesis of diabetic macroangiopathy. *Diabetes Metab Res Rev*. 1999 ; 15(4) : 274-82.
50. Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Woodward M, Billot L, et al. Effects of a fixed combination of perindopril and indapamide on macrovascular and microvascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus (the ADVANCE trial) : a randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 2007 ; 370 (9590) : 829-40.
51. Proceedings of the 4th International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. Chicago, Illinois, USA. 14-16 March 1997. *Diabetes Care*. 1998 ; 21 Suppl 2 : B1-167.
52. Mazur A. Why were « starvation diets » promoted for diabetes in the pre-insulin period ? *Nutr J*. 2011 ; 10:23.
53. Rosenfeld L. Insulin: Discovery and controversy. *Clin Chem*. 2002 ; 48(12) : 2270-88.

54. Bliss M. The history of insulin. *Diabetes Care*. 1993 ; 16 Suppl 3 : 4-7.
55. Hirsch IB. Insulin analogues. *N Engl J Med*. 2005 ; 352(2) : 174-83.
56. Holleman F, Hoekstra JBL. Insulin Lispro. *N Engl J Med*. 1997 ; 337(3) : 176-83.
57. Scheen A, Mathieu C. Le médicament du mois. Insuline basale degludec (Tresiba®). *Rev Med Liege [Internet]*. 2019 [cité 28 oct 2020] ; 74(4). Disponible sur : <https://orbi.uliege.be/handle/2268/235348>
58. Association AD. Insulin administration. *Diabetes Care*. 2004 ; 27(suppl 1) : 106-7.
59. Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod*. 2005 ; 34(5) : 513.
60. Combre F. Prise en charge du diabète gestationnel en prénatal : connaissances et place de la sage-femme suite aux nouvelles recommandations de 2010. :96.
61. Université Médicale Virtuelle Francophone. Item 17 : Diabète et grossesse. 2008.
62. Netgen. Prise en charge du diabète gestationnel : nouvelles connaissances et perspectives futures [Internet]. *Revue Médicale Suisse*. [cité le 29 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.revmed.ch/RMS/2011/RMS-298/Prise-en-charge-du-diabete-gestationnel-nouvelles-connaissances-et-perspectives-futures>
63. Rowan JA, Hague WM, Gao W, Battin MR, Moore MP. Metformin versus insulin for the treatment of gestational diabetes. *N Engl J Med*. 2008 ; 358(19) : 2003-15.
64. Ramos GA, Jacobson GF, Kirby RS, Ching JY, Field DR. Comparison of glyburide and insulin for the management of gestational diabetics with markedly elevated oral glucose challenge test and fasting hyperglycemia. *J Perinatol Off J Calif Perinat Assoc*. 2007 ; 27(5) : 262-7.
65. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes : a patient-centered approach : position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*. 2012 ; 35(6) : 1364-79.
66. Morris SF, Wylie-Rosett J. Medical Nutrition Therapy: A Key to Diabetes Management and Prevention. *Clin Diabetes*. 2010 ; 28:12-8.
67. Duclos M, Sanz C, Gautier J-F. Activité physique et prévention du diabète de type 2. *Médecine Mal Métaboliques*. 2010 ; 4 (2) : 147-51.
68. Schulz LO, Bennett PH, Ravussin E, Kidd JR, Kidd KK, Esparza J, et al. Effects of traditional and western environments on prevalence of type 2 diabetes in Pima Indians in Mexico and the U.S. *Diabetes Care*. 2006 ; 29(8) :1866-71.
69. Myers J, Prakash M, Froelicher V, Do D, Partington S, Atwood JE. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. *N Engl J Med*. 2002 ; 346(11) : 793-801.
70. Hamman RF. Genetic and environmental determinants of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Diabetes Metab Rev*. 1992 ; 8(4) :287-338.
71. Bailey CJ. Metformin: historical overview. *Diabetologia*. 2017 ; 60(9) : 1566-76.
72. Bailey CJ, Day C. Metformin: its botanical background. *Pract Diabetes Int*. 2004 ; 21(3) : 115-7.

73. Rea P, Tien A. Metformin: Out of backwaters and into the mainstream. *Am Sci.* 2017 ; 105 : 102.
74. Campbell RK, White JR, Saulie BA. Metformin: a new oral biguanide. *Clin Ther.* 1996 ; 18(3) : 360-71.
75. Laube H. Acarbose : An update of its therapeutic use on diabetic treatment . *Clin Drug Investig.* 2002 ; 22(3) : 141-56.
76. Naik SR, Kokil GR. Chapter 12 - Development and discovery avenues in bioactive natural products for glycemic novel therapeutics. In : Atta-ur-Rahman, éditeur. *Studies in Natural Products Chemistry.* Elsevier; 2013. p. 431-66. (*Studies in Natural Products Chemistry*; vol. 39).
77. Loubatières-Mariani M-M. The discovery of hypoglycemic sulfonamides. *J Soc Biol.* 2007 ; 201(2) :121-5.
78. Loubatieres A. The mechanism of action of the hypoglycemic sulfonamides ; a concept based on investigations in animals and in man. *Diabetes.* 1957 ; 6(5) : 408-17.
79. Guillausseau PJ. Sulfamides hypoglycémiants et apparentés et leur utilisation [Internet]. *Réalités Cardiologiques.* 2011 [cité 5 oct 2021]. Disponible sur : <https://www.realites-cardiologiques.com/2011/06/10/sulfamides-hypoglycemiants-et-apparentes-et-leur-utilisation/>
80. Mark M, Grell W. Hypoglycaemic effects of the novel antidiabetic agent repaglinide in rats and dogs. *Br J Pharmacol.* 1997;121(8):1597-604.
81. Panten U, Burgfeld J, Goerke F, Rennie M, Schwanstecher M, Wallasch A, et al. Control of insulin secretion by sulfonylureas, meglitinide and diazoxide in relation to their binding to the sulfonylurea receptor in pancreatic islets. *Biochem Pharmacol.* 1989 ; 38(8) : 1217-29.
82. Scott LJ. Repaglinide. *Drugs.* 2012 ; 72(2) : 249-72.
83. Culy CR, Jarvis B. Repaglinide : A review of its therapeutical use in type 2 diabetes mellitus. *Drugs.* 2001 ; 61(11) : 1625-60.
84. Vick H, Diedrich DF, Baumann K. Reevaluation of renal tubular glucose transport inhibition by phlorizin analogs. *Am J Physiol.* 1973 ; 224(3) : 552-7.
85. Wielert-Badt S, Lin J-T, Lorenz M, Fritz S, Kinne RK-H. Probing the conformation of the sugar transport inhibitor phlorizin by 2D-NMR, molecular dynamics studies, and pharmacophore analysis. *J Med Chem.* 2000 ; 43(9) : 1692-8.
86. Bauduceau B, Bordier L. La dapagliflozine (Forxiga® et Xigduo®). *Médecine Mal Métaboliques.* 2020 ; 14(8) : 744-53.
87. Ludwig K, Yan S, Fan H, Reutter W, Böttcher C. The 3D structure of rat DPPIV/CD26 as obtained by cryo-TEM and single particle analysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 ;304(1) : 73-7.
88. Pabreja K, Mohd MA, Koole C, Wootten D, Furness SGB. Molecular mechanisms underlying physiological and receptor pleiotropic effects mediated by GLP-1R activation. *Br J Pharmacol.* 2014 ; 171(5) : 1114-28.
89. Deacon CF, Hughes TE, Holst JJ. Dipeptidyl peptidase IV inhibition potentiates the insulinotropic effect of glucagon-like peptide 1 in the anesthetized pig. *Diabetes.* 1998 ; 47(5) : 764-9.

90. Pederson RA, White HA, Schlenzig D, Pauly RP, McIntosh CH, Demuth HU. Improved glucose tolerance in Zucker fatty rats by oral administration of the dipeptidyl peptidase IV inhibitor isoleucine thiazolidide. *Diabetes*. 1998 ; 47(8) : 1253-8.
91. Ahrén B, Simonsson E, Larsson H, Landin-Olsson M, Torgeirsson H, Jansson P-A, et al. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV improves metabolic control over a 4-week study period in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2002 ; 25(5) : 869-75.
92. VIGINEWS n°4 des CRPV d'Angers et de Nantes. Les incrétinomimétiques : mécanisme d'action et effets indésirables [Internet]. Réseau français des centres régionaux de pharmacovigilance. 2018 [cité le 1 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.rfcrpv.fr/incrétinomimétiques-mécanisme-daction-effets-indésirables/>
93. Eng J, Kleinman WA, Singh L, Singh G, Raufman JP. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J Biol Chem*. 1992 ; 267(11) : 7402-5.
94. Kieffer TJ, McIntosh CH, Pederson RA. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology*. 1995 ; 136(8) : 3585-96.
95. Park S, Dong X, Fisher TL, Dunn S, Omer AK, Weir G, et al. Exendin-4 uses Irs2 signaling to mediate pancreatic β cell growth and function. *J Biol Chem*. 2006 ; 281(2) : 1159-68.
96. Cvetković RS, Plosker GL. Exenatide : a review of its use in patients with type 2 diabetes mellitus (as an adjunct to metformin and/or a sulfonylurea). *Drugs*. 2007 ; 67(6) : 935-54.
97. Lovshin JA, Drucker DJ. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2009 ; 5(5) : 262-9.
98. Christensen M, Miossec P, Larsen BD, Werner U, Knop FK. The design and discovery of lixisenatide for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert Opin Drug Discov*. 2014 ; 9(10) : 1223-51.
99. Rosenstock J, Reusch J, Bush M, Yang F, Stewart M. Potential of Albiglutide, a long-acting GLP-1 receptor agonist, in type 2 diabetes : a randomized controlled trial exploring weekly, biweekly and monthly dosing. *Diabetes Care*. 2009 ; 32(10) : 1880-6.
100. Qi F, Wu J, Fan Q, He F, Tian G, Yang T, et al. Preparation of uniform-sized exenatide-loaded PLGA microspheres as long-effective release system with high encapsulation efficiency and bio-stability. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013 ; 112 : 492-8.
101. Sanford M. Dulaglutide : First global approval. *Drugs*. 2014 ; 74(17) : 2097-103.
102. Lau J, Bloch P, Schäffer L, Pettersson I, Spetzler J, Kofoed J, et al. Discovery of the once-weekly Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) analogue Semaglutide. *J Med Chem*. 2015 ; 58(18) : 7370-80.
103. Davies M, Pieber TR, Hartoft-Nielsen M-L, Hansen OKH, Jabbour S, Rosenstock J. Effect of oral Semaglutide compared with placebo and subcutaneous Semaglutide on glycemic control in patients with type 2 diabetes: A randomized clinical trial. *JAMA*. 2017 ; 318(15) : 1460-70.
104. Consoli A, Formoso G. Potential side effects to GLP-1 agonists: understanding their safety and tolerability. *Expert Opin Drug Saf*. 2015 ; 14(2) : 207-18.

105. Elrick H, Stimmler L, Hlad CJ, Arai Y. Plasma insulin response to oral and intravenous glucose administration. *J Clin Endocrinol Metab.* 1964 ; 24 : 1076-82.
106. Nauck M, Stöckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia.* 1986 ; 29(1) : 46-52
107. Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1993 ; 91(1) : 301-7.
108. Lugari R, Dei Cas A, Ugolotti D, Finardi L, Barilli AL, Ognibene C, et al. Evidence for early impairment of glucagon-like peptide 1-induced insulin secretion in human type 2 (non insulin-dependent) diabetes. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab.* 2002 ; 34(3) : 150-4..
109. Diakogiannaki E, Gribble FM, Reimann F. Nutrient detection by incretin hormone secreting cells. *Physiol Behav.* 2012 ; 106(3) : 387-93.
110. Edholm T, Degerblad M, Grybäck P, Hilsted L, Holst JJ, Jacobsson H, et al. Differential incretin effects of GIP and GLP-1 on gastric emptying, appetite, and insulin-glucose homeostasis. *Neurogastroenterol Motil.* 2010 ; 22(11) : 1191-200.
111. Xu G, Kaneto H, Laybutt DR, Duvivier-Kali VF, Trivedi N, Suzuma K, et al. Downregulation of GLP-1 and GIP receptor expression by hyperglycemia: Possible contribution to impaired incretin effects in diabetes. *Diabetes.* 2007 ; 56(6) :1551-8.
112. Sarkar J, Nargis T, Tantia O, Ghosh S, Chakrabarti P. Increased plasma Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP4) activity is an obesity-independent parameter for glycemic deregulation in type 2 diabetes Patients. *Front Endocrinol.* 2019 ; 10.
113. Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metab.* 2006 ; 3(3) : 153-65.
114. Woods SC, D'Alessio DA. Central control of body weight and appetite. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 ; 93(11 (suppl. 1)) : 37-50.
115. Pocai A. Action and therapeutic potential of oxyntomodulin. *Mol Metab.* 2013 ; 3(3) : 241-51.
116. Thulesen J. Glucagon-like peptide 2 (GLP-2), an intestinotrophic mediator. *Curr Protein Pept Sci.* 2004 ; 5(1) : 51-65.
117. Jeppesen PB, Pertkiewicz M, Messing B, Iyer K, Seidner DL, O'keefe SJD, et al. Teduglutide reduces need for parenteral support among patients with short bowel syndrome with intestinal failure. *Gastroenterology.* 2012 ; 143(6) : 1473-81.
118. Ezcurra M, Reimann F, Gribble FM, Emery E. Molecular mechanisms of incretin hormone secretion. *Curr Opin Pharmacol.* 2013 ; 13(6) : 922-7.
119. Valverde I, Moreno P, Cancelas J, Prieto PG, Villanueva-Peñacarrillo ML, Malaisse WJ. Chapter 133 - Effects of an olive oil-enriched diet on glucagon-like peptide-1. In : Preedy VR, Watson RR, éditeurs. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention.* San Diego : Academic Press ; 2010. p. 1213-20.
120. Motter AL, Ahern GP. TRPA1 is a polyunsaturated fatty acid sensor in mammals. *PLOS ONE.* 2012 ; 7(6) : e38439.

121. Greenfield JR, Farooqi IS, Keogh JM, Henning E, Habib AM, Blackwood A, et al. Oral glutamine increases circulating glucagon-like peptide 1, glucagon, and insulin concentrations in lean, obese, and type 2 diabetic subjects. *Am J Clin Nutr.* 2009 ; 89(1) : 106-13.
122. Anandhkrishnan A, Korbonits M. Glucagon-like peptide 1 in the pathophysiology and pharmacotherapy of clinical obesity. *World J Diabetes.* 2016 ; 7(20) : 572-98.
123. Parker HE, Wallis K, le Roux CW, Wong KY, Reimann F, Gribble FM. Molecular mechanisms underlying bile acid-stimulated glucagon-like peptide-1 secretion. *Br J Pharmacol.* 2012 ; 165(2) : 414-23.
124. Flock GB, Cao X, Maziarz M, Drucker DJ. Activation of enteroendocrine membrane progesterone receptors promotes incretin secretion and improves glucose tolerance in mice. *Diabetes.* 2013 ; 62(1) : 283-90.
125. Kim K-S, Egan JM, Jang H-J. Denatonium induces secretion of glucagon-like peptide-1 through activation of bitter taste receptor pathways. *Diabetologia.* 2014 ; 57(10) : 2117.
126. Vassort G, Fauconnier J. Les canaux TRP (transient receptor potential) - Une nouvelle famille de canaux à expression variée. *médecine/sciences.* 2008 ; 24(2) : 163-8.
127. Wang P, Yan Z, Zhong J, Chen J, Ni Y, Li L, et al. Transient receptor potential vanilloid 1 activation enhances gut glucagon-like peptide-1 secretion and improves glucose homeostasis. *Diabetes.* 2012 ; 61(8) : 2155-65.
128. Nagy I, Friston D, Valente JS, Torres Perez JV, Andreou AP. Pharmacology of the capsaicin receptor, transient receptor potential vanilloid type-1 ion channel. *Prog Drug Res Fortschritte Arzneimittelforschung Progres Rech Pharm.* 2014 ; 68 : 39-76.
129. Rask E, Olsson T, Söderberg S, Johnson O, Seckl J, Holst JJ, et al. Impaired incretin response after a mixed meal is associated with insulin resistance in nondiabetic men. *Diabetes Care.* 2001 ; 24(9) : 1640-5.
130. Roberge JN, Brubaker PL. Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by glucose-dependent insulinotropic peptide in a novel enteroendocrine loop. *Endocrinology.* 1993 ; 133(1) : 233-40.
131. Reimer RA, Darimont C, Gremlich S, Nicolas-Métral V, Rüegg UT, Macé K. A human cellular model for studying the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology.* 2001 ; 142(10) : 4522-8.
132. Drucker DJ. The role of gut hormones in glucose homeostasis. *J Clin Invest.* 2007 ; 117(1) : 24-32.
133. Albrechtsen NJW, Kuhre RE, Deacon CF, Holst JJ. Targeting the intestinal L-cell for obesity and type 2 diabetes treatment. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2014 ; 9(1) : 61-72.
134. Mentlein R. Mechanisms underlying the rapid degradation and elimination of the incretin hormones GLP-1 and GIP. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009 ; 23(4) : 443-52.
135. Orskov C, Rabenhøj L, Wettergren A, Kofod H, Holst JJ. Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. *Diabetes.* 1994 ; 43(4) : 535-9.
136. Brubaker PL, Drucker DJ. Structure-function of the glucagon receptor family of G protein-coupled receptors : the glucagon, GIP, GLP-1, and GLP-2 receptors. *Receptors Channels.* 2002 ; 8(3-4) : 179-88.

137. Underwood CR, Garibay P, Knudsen LB, Hastrup S, Peters GH, Rudolph R, et al. Crystal structure of glucagon-like peptide-1 in complex with the extracellular domain of the glucagon-like peptide-1 receptor. *J Biol Chem.* 2010 ; 285(1) : 723-30.
138. Yang D, de Graaf C, Yang L, Song G, Dai A, Cai X, et al. Structural determinants of binding the seven-transmembrane domain of the glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R). *J Biol Chem.* 2016 ; 291(25) : 12991-3004.
139. Göke R, Larsen PJ, Mikkelsen JD, Sheikh SP. Distribution of GLP-1 binding sites in the rat brain : evidence that exendin-4 is a ligand of brain GLP-1 binding sites. *Eur J Neurosci.* 1995 ; 7(11) : 2294-300.
140. Larsen PJ, Tang-Christensen M, Holst JJ, Orskov C. Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. *Neuroscience.* 1997 ; 77(1) : 257-70.
141. Alvarez E, Martínez MD, Roncero I, Chowen JA, García-Cuartero B, Gispert JD, et al. The expression of GLP-1 receptor mRNA and protein allows the effect of GLP-1 on glucose metabolism in the human hypothalamus and brainstem. *J Neurochem.* 2005 ; 92(4) : 798-806.
142. Tornehave D, Kristensen P, Rømer J, Knudsen LB, Heller RS. Expression of the GLP-1 receptor in mouse, rat, and human pancreas. *J Histochem Cytochem.* 2008 ; 56(9) : 841-51.
143. Körner M, Stöckli M, Waser B, Reubi JC. GLP-1 receptor expression in human tumors and human normal tissues : potential for in vivo targeting. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 2007 ; 48(5) : 736-43.
144. Gutniak M, Orskov C, Holst JJ, Ahrén B, Efendic S. Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1992 ; 326(20) :1316-22.
145. Drucker DJ. Enhancing incretin action for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2003 ; 26(10) : 2929-40.
146. Xu G, Kaneto H, Lopez-Avalos MD, Weir GC, Bonner-Weir S. GLP-1/exendin-4 facilitates beta-cell neogenesis in rat and human pancreatic ducts. *Diabetes Res Clin Pract.* 2006 ; 73(1) :107-10.
147. Buteau J, El-Assaad W, Rhodes CJ, Rosenberg L, Joly E, Prentki M. Glucagon-like peptide-1 prevents beta cell glucolipototoxicity. *Diabetologia.* 2004 ; 47(5) : 806-15.
148. Zander M, Madsbad S, Madsen JL, Holst JJ. Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes : a parallel-group study. *Lancet Lond Engl.* 2002 ; 359(9309) : 824-30.
149. İmeryüz N, Yeğen BÇ, Bozkurt A, Coşkun T, Villanueva-Peñacarrillo ML, Ulusoy NB. Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.* 1997 ;273(4) : 920-7.
150. Tang-Christensen M, Larsen PJ, Göke R, Fink-Jensen A, Jessop DS, Møller M, et al. Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *Am J Physiol.* 1996 ; 271 : 848-56.
151. Dailey MJ, Moran TH. Glucagon-like peptide 1 and appetite. *Trends Endocrinol Metab TEM.* 2013 ; 24(2) : 85-91.

152. Amato A, Cinci L, Rotondo A, Serio R, Faussone-Pellegrini M, Vannucchi M, et al. Peripheral motor action of glucagon-like peptide-1 through enteric neuronal receptors. *Neurogastroenterol Motil Off J Eur Gastrointest Motil Soc.* 2010 ; 22 : 664-e203.
153. Kielgast U, Holst JJ, Madsbad S. Treatment of type 1 diabetic patients with glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and GLP-1R agonists. *Curr Diabetes Rev.* 2009 ; 5(4) : 266-75.
154. Janzen KM, Steuber TD, Nisly SA. GLP-1 agonists in Type 1 diabetes mellitus. *Ann Pharmacother.* 2016 ; 50(8) : 656-65.
155. Rindi G, Grant SG, Yiangou Y, Ghatei MA, Bloom SR, Bantel VA, et al. Development of neuroendocrine tumors in the gastrointestinal tract of transgenic mice. Heterogeneity of hormone expression. *Am J Pathol.* 1990 ; 136(6) : 1349-63.
156. Crawley JN, Corwin RL. Biological actions of cholecystokinin. *Peptides.* 1994 ;15(4) :731-55.
157. Mangel AW, Prpic V, Scott L, Liddle RA. Inhibitors of ATP-sensitive potassium channels stimulate intestinal cholecystokinin secretion. *Peptides.* 1994 ; 15(8) :1565-6.
158. Hand KV, Bruen CM, O'Halloran F, Giblin L, Green BD. Acute and chronic effects of dietary fatty acids on cholecystokinin expression, storage and secretion in enteroendocrine STC-1 cells. *Mol Nutr Food Res.* 2010 ; 54 Suppl 1 : 93-103.
159. Wang Y, Chandra R, Samsa LA, Gooch B, Fee BE, Cook JM, et al. Amino acids stimulate cholecystokinin release through the Ca²⁺-sensing receptor. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2011 ; 300(4) : 528-37.
160. Geraedts MCP, Troost FJ, Fischer MAJG, Edens L, Saris WHM. Direct induction of CCK and GLP-1 release from murine endocrine cells by intact dietary proteins. *Mol Nutr Food Res.* 2011 ; 55(3) : 476-84.
161. Miyata M, Kurogi M, Oda M, Saitoh O. Effect of five taste ligands on the release of CCK from an enteroendocrine cell line, STC-1. *Biomed Res Tokyo Jpn.* 2014 ; 35(2) : 171-6.
162. McCarthy T, Green BD, Calderwood D, Gillespie A, Cryan JF, Giblin L. STC-1 Cells. In : Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., éditeurs. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models.* Cham : Springer International Publishing; 2015. p. 211-20.
163. Tanaka T, Katsuma S, Adachi T, Koshimizu T, Hirasawa A, Tsujimoto G. Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2008 ; 377(4-6) : 523-7.
164. Blache P, Le-Nguyen D, Boegner-Lemoine C, Cohen-Solal A, Bataille D, Kervran A. Immunological detection of prohormone convertases in two different proglucagon processing cell lines. *FEBS Lett.* 1994 ; 344(1) : 65-8.
165. Cordier-Bussat M, Bernard C, Haouche S, Roche C, Abello J, Chayvialle JA, et al. Peptides stimulate cholecystokinin secretion and gene transcription in the intestinal cell line STC-1. *Endocrinology.* 1997 ; 138(3) : 1137-44.
166. Ye L, Liddle RA. Gastrointestinal Hormones and the Gut Connectome. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2017 ; 24(1) : 9-14.
167. Drucker DJ, Jin T, Asa SL, Young TA, Brubaker PL. Activation of proglucagon gene transcription by protein kinase-A in a novel mouse enteroendocrine cell line. *Mol Endocrinol Baltim Md.* 1994 ; 8(12) : 1646-55.

168. Reimann F, Gribble FM. Glucose-sensing in glucagon-like peptide-1-secreting cells. *Diabetes*. 2002 ; 51(9) : 2757-63.
169. Parker HE, Adriaenssens A, Rogers G, Richards P, Koepsell H, Reimann F, et al. Predominant role of active versus facilitative glucose transport for glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetologia*. 2012 ; 55(9) : 2445-55.
170. Dong CX, Brubaker PL. Ghrelin, the proglucagon-derived peptides and peptide YY in nutrient homeostasis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012 ; 9(12) : 705-15.
171. Lauffer LM, Iakoubov R, Brubaker PL. GPR119 is essential for oleoylethanolamide-induced glucagon-like peptide-1 secretion from the intestinal enteroendocrine L-cell. *Diabetes*. 2009 ; 58(5) : 1058-66.
172. Brubaker PL, Schloos J, Drucker DJ. Regulation of glucagon-like peptide-1 synthesis and secretion in the GLUTag enteroendocrine cell line. *Endocrinology*. 1998 ; 139(10) : 4108-14.
173. Tolhurst G, Zheng Y, Parker HE, Habib AM, Reimann F, Gribble FM. Glutamine Triggers and Potentiates Glucagon-Like Peptide-1 Secretion by Raising Cytosolic Ca²⁺ and cAMP. *Endocrinology*. 2011 ; 152(2) : 405-13.
174. Gameiro A, Reimann F, Habib A, O'Malley D, Williams L, Simpson A, et al. The neurotransmitters glycine and GABA stimulate glucagon-like peptide-1 release from the GLUTag cell line. *J Physiol*. 2005 ; 569(Pt 3) : 761-72.
175. Oya M, Kitaguchi T, Pais R, Reimann F, Gribble F, Tsuboi T. The G protein-coupled receptor family C group 6 subtype A (GPRC6A) receptor is involved in amino acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells. *J Biol Chem*. 2013 ; 288(7) : 4513-21.
176. Simpson AK, Ward PS, Wong KY, Collord GJ, Habib AM, Reimann F, et al. Cyclic AMP triggers glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag enteroendocrine cell line. *Diabetologia*. 2007 ; 50(10) : 2181-9.
177. Gil-Lozano M, Mingomataj EL, Wu WK, Ridout SA, Brubaker PL. Circadian secretion of the intestinal hormone GLP-1 by the rodent L cell. *Diabetes*. 2014 ; 63(11) : 3674-85.
178. Anini Y, Brubaker PL. Role of leptin in the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetes*. 2003 ; 52(2) : 252-9.
179. Anini Y, Brubaker PL. Muscarinic receptors control glucagon-like peptide 1 secretion by human endocrine L cells. *Endocrinology*. 2003 ; 144(7) : 3244-50.
180. Lim GE, Huang GJ, Flora N, LeRoith D, Rhodes CJ, Brubaker PL. Insulin regulates glucagon-like peptide-1 secretion from the enteroendocrine L cell. *Endocrinology*. 2009 ; 150(2) : 580-91.
181. Jang H-J, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, Carlson OD, Kim B-J, Zhou J, et al. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 ; 104(38) : 15069-74.
182. Chen Q, Reimer RA. Dairy protein and leucine alter GLP-1 release and mRNA of genes involved in intestinal lipid metabolism in vitro. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif*. 2009 ; 25(3) : 340-9.
183. Cao X, Flock G, Choi C, Irwin DM, Drucker DJ. Aberrant regulation of human intestinal proglucagon gene expression in the NCI-H716 cell line. *Endocrinology*. 2003 ; 144(5) : 2025-33.

184. Reimann F, Habib AM, Tolhurst G, Parker HE, Rogers GJ, Gribble FM. Glucose Sensing in L Cells: A Primary Cell Study. *Cell Metab.* 2008 ; 8(6-3) : 532-9.
185. Gerbe F, van Es JH, Makrini L, Brulin B, Mellitzer G, Robine S, et al. Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *J Cell Biol.* 2011 ; 192(5) : 767-80.
186. Miller ER, Ullrey DE. The pig as a model for human nutrition. *Annu Rev Nutr.* 1987 ; 7 : 361-82.
187. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev.* 2007 ; 87(4) : 1409-39.
188. Voortman T, Hendriks HFJ, Witkamp RF, Wortelboer HM. Effects of long- and short-chain fatty acids on the release of gastrointestinal hormones using an ex vivo porcine intestinal tissue model. *J Agric Food Chem.* 2012 ; 60(36) : 9035-42.
189. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor : identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell.* 1996 ; 84(3) : 491-5.
190. Alpers CE, Hudkins KL. Mouse models of diabetic nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2011 ; 20(3) : 278-84.
191. Susztak K, Böttinger E, Novetsky A, Liang D, Zhu Y, Ciccone E, et al. Molecular profiling of diabetic mouse kidney reveals novel genes linked to glomerular disease. *Diabetes.* 2004 ; 53(3) : 784-94.
192. Conn PM. *Animal Models for the Study of Human Disease: Second edition.* Animal Models for the Study of Human Disease: Second Edition. 2017. 1108 p.
193. Yamazaki T, Kishimoto K, Ezaki O. The ddY mouse : a model of postprandial hypertriglyceridemia in response to dietary fat. *J Lipid Res.* 2012 ; 53(10) : 2024-37.
194. Suzuki S, Matsuoka A, Niki R, Takagaki Y. [Pathological studies on spontaneous tumors in mice (author's transl)]. *Jikken Dobutsu.* oct 1981;30(4):407-20.
195. Suzuki W, Iizuka S, Tabuchi M, Funo S, Yanagisawa T, Kimura M, et al. A new mouse model of spontaneous diabetes derived from ddY strain. *Exp Anim.* 1999 ; 48(3) : 181-9.
196. Noge I, Kagawa Y, Maeda T. A new diabetic mouse model derived from the ddY strain. *Biol Pharm Bull.* 2010 ; 33(6) : 988-92.
197. Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN. Diet-Induced Type II Diabetes in C57BL/6J Mice. *Diabetes.* 1988 ; 37(9) : 1163-7.
198. Luo J, Quan J, Tsai J, Hobensack CK, Sullivan C, Hector R, et al. Nongenetic mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.* 1998 ; 47(6) : 663-8.
199. Dekel Y, Glucksam Y, Elron-Gross I, Margalit R. Insights into modeling streptozotocin-induced diabetes in ICR mice. *Lab Anim.* 2009 ; 38(2) : 55-60.
200. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 2008 ; 51(2) :216-26.
201. Goto Y, Kakizaki M, Masaki N. Spontaneous Diabetes Produced by Selective Breeding of Normal Wistar Rats. *Proc Jpn Acad.* 1975 ; 51(1) : 80-5.

202. Goto Y, Kakizaki M. The Spontaneous-diabetes rat : A model of noninsulin dependent diabetes mellitus. Proc Jpn Acad Ser B. 1981 ; 57(10) : 381-4.
203. Ryle PR, Barker J, Gaines PA, Thomson AD, Chakraborty J. Alloxan-induced diabetes in the rat - protective action of (-) epicatechin ? Life Sci. 1984 ; 34(6) : 591-5.
204. Gajdosík A, Gajdosíková A, Stefek M, Navarová J, Hozová R. Streptozotocin-induced experimental diabetes in male Wistar rats. Gen Physiol Biophys. 1999 ;18 Spec No :54-62.
205. Shaw Dunn J, Sheehan HL, Mclethie NGB. Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. The Lancet. 1943 ; 241(6242) : 484-7.
206. Ighodaro OM, Adeosun AM, Akinloye OA. Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. Medicina (Mex). 2017 ; 53(6) : 365-74.
207. Zhang F, Ye C, Li G, Ding W, Zhou W, Zhu H, et al. The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters. Exp Anim. 2003 ; 52(5) : 401-7.
208. Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. Indian J Med Res. 2007 ; 125(3) : 451-72.
209. Wang Y, Feng F, Wang Z. Determination of selected elements in aqueous extractions of a traditional Chinese medicine formula by ICP-MS and FAAS : Evaluation of formula rationality. Anal Lett. 2010 ; 43(6) : 983-92.
210. Hoa NK, Phan DV, Thuan ND, Ostenson C-G. Insulin secretion is stimulated by ethanol extract of *Anemarrhena asphodeloides* in isolated islet of healthy Wistar and diabetic Goto-Kakizaki Rats. Exp Clin Endocrinol Diabetes Off J Ger Soc Endocrinol Ger Diabetes Assoc. 2004 ; 112(9) : 520-5.
211. Kim K-H, Kim K-S, Shin M-H, Jang E, Kim E, Lee J-H, et al. Aqueous extracts of *Anemarrhena asphodeloides* stimulate glucagon-like peptide-1 secretion in enteroendocrine NCI-H716 cells. BioChip J. 2013 ; 7.
212. Yanardağ R, Çolak H. Effect of chard (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) on blood glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rabbits. Pharm Pharmacol Commun. 1998 ; 4(6) : 309-11.
213. Bolkent S, Yanardağ R, Tabakoğlu-Oğuz A, Ozsoy-Saçan O. Effects of chard (*Beta vulgaris* L. var. *Cicla*) extract on pancreatic β cells in streptozotocin-diabetic rats: a morphological and biochemical study. J Ethnopharmacol. 2000 ; 73(1-2) : 251-9.
214. Kabir AU, Samad MB, Ahmed A, Jahan MR, Akhter F, Tasnim J, et al. Aqueous fraction of *Beta vulgaris* ameliorates hyperglycemia in diabetic mice due to enhanced glucose stimulated insulin secretion, mediated by acetylcholine and GLP-1, and elevated glucose uptake via increased membrane bound GLUT4 transporters. PLOS ONE. 2015 ; 10(2) : e0116546.
215. Sakurai MH, Matsumoto T, Kiyohara H, Yamada H. β -cell proliferation activity of pectic polysaccharide from a medicinal herb, the roots of *Bupleurum falcatum* L. and its structural requirement. Immunology. 1999 ; 97(3) : 540-7.
216. Shin M-H, Choi E-K, Kim K-S, Kim K-H, Jang YP, Ahn KS, et al. Hexane fractions of *Bupleurum falcatum* L. stimulates glucagon-like peptide-1 secretion through G $\beta\gamma$ -mediated pathway. Evid-Based Complement Altern Med ECAM. 2014 ; 2014.

217. Choi E-K, Kim K-S, Yang HJ, Shin M-H, Suh H-W, Lee K-B, et al. Hexane fraction of *Citrus aurantium* L. stimulates glucagon-like peptide-1 (GLP-1) secretion via membrane depolarization in NCI-H716 cells. *BioChip J.* 2012 ; 6(1) : 41-7.
218. Jouad H, Eddouks M, Lacaille-Dubois MA, Lyoussi B. Hypoglycaemic effect of *Spergularia purpurea* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2000 ; 71(1-2) :169-77.
219. Eddouks M, Jouad H, Maghrani M, Lemhadri A, Burcelin R. Inhibition of endogenous glucose production accounts for hypoglycemic effect of *Spergularia purpurea* in streptozotocin mice. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm.* 2003 ; 10(6-7) : 594-9.
220. Kim K, Lee YM, Rhyu M-R, Kim HY. *Spergularia marina* induces glucagon-like peptide-1 secretion in NCI-H716 cells through bile acid receptor activation. *J Med Food.* 2014 ; 17(11) : 1197-203.
221. Zhao H-L, Tong PCY, Chan JCN. Traditional Chinese medicine in the treatment of diabetes. *Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme.* 2006 ; 11 : 15-29.
222. Shin M-H, Suh H-W, Lee K-B, Kim K-S, Yang HJ, Choi E-K, et al. *Gentiana scabra* extracts stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via G protein-coupled receptor pathway. *BioChip J.* 2012 ; 6(2) : 114-9.
223. Suh H-W, Lee K-B, Kim K-S, Yang HJ, Choi E-K, Shin MH, et al. A bitter herbal medicine *Gentiana scabra* root extract stimulates glucagon-like peptide-1 secretion and regulates blood glucose in db/db mouse. *J Ethnopharmacol.* 2015 ; 172 : 219-26.
224. Huguet C, Olatunji OJ, Real E, Raharivelomanana P, Urbain A. Glucagon-like peptide-1 secretagogues from the leaves of *Oparanthus teikiteetini*. *Phytochem Lett.* 2019 ; 30 : 201-4.
225. Singireesu SSNR, Misra S, Mondal SK, Yerramsetty S, Sahu N, K SB. Costunolide induces micronuclei formation, chromosomal aberrations, cytostasis, and mitochondrial-mediated apoptosis in Chinese hamster ovary cells. *Cell Biol Toxicol.* 2018 ; 34(2) : 125-42.
226. Kim DY, Choi BY. Costunolide - A bioactive sesquiterpene lactone with diverse therapeutic potential. *Int J Mol Sci.* 2019 ; 20(12).
227. Sala A, Recio MC, Schinella GR, Máñez S, Giner RM, Ríos J-L. A new dual inhibitor of arachidonate metabolism isolated from *Helichrysum italicum*. *Eur J Pharmacol.* 2003 ; 460(2) : 219-26.
228. Lee S, Davis T, Gardner D, Colegate S, Cook D, Green B, et al. Tremetone and structurally related compounds in white snakeroot (*Ageratina altissima*) : A plant associated with trembles and milk sickness. *J Agric Food Chem.* 2010 ; 58 : 8560-5.
229. Eileen Macallum G , Smith Graham S, Barsoum Nabila J, Walker Robin M, Greaves P. Renal and hepatic toxicity of a benzopyran-4-one in the cynomolgus monkey. *Toxicology.* 1989 ; 59(1) : 97-108.
230. Hofer KE, Faber K, Müller DM, Hauffe T, Wenger U, Kupferschmidt H, et al. Acute toxicity associated with the recreational use of the novel psychoactive benzofuran N-methyl-5-(2-aminopropyl)benzofuran. *Ann Emerg Med.* 2017 ; 69(1) : 79-82.
231. Krawinkel MB, Keding GB. Bitter melon (*Momordica Charantia*) : A dietary approach to hyperglycemia. *Nutr Rev.* 2006 ; 64(7 Pt 1) : 331-7.

232. Raman A, Lau C. Anti-diabetic properties and phytochemistry of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). *Phytomedicine*. 1996 ; 2(4) : 349-62.
233. Huang T, Lu K-N, Pai Y-P, Chin Hsu, Huang C. Role of GLP-1 in the hypoglycemic effects of wild bitter gourd. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM*. 2013 ; 2013.
234. Costa IS, Medeiros AF, Piuvezam G, Medeiros GC, Maciel BL, Morais AHA. Insulin-like proteins in plant sources : A systematic review. *Diabetes Metab Syndr Obes Targets Ther*. 2020 ; 13 : 3421-31.
235. Bhat GA, Khan HA, Alhomida AS, Sharma P, Singh R, Paray BA. GLP-I secretion in healthy and diabetic Wistar rats in response to aqueous extract of *Momordica charantia*. *BMC Complement Altern Med*. 2018 ; 18(1) : 162.
236. Hsu C, Hsieh C-L, Kuo Y-H, Huang C. Isolation and identification of cucurbitane-type triterpenoids with partial agonist/antagonist potential for estrogen receptors from *Momordica charantia*. *J Agric Food Chem*. 2011 ; 59(9) : 4553-61.
237. Jafri L, Saleem S, Calderwood D, Gillespie A, Mirza B, Green BD. Naturally-occurring TGR5 agonists modulating glucagon-like peptide-1 biosynthesis and secretion. *Peptides*. 2016 ; 78 : 51-8.
238. Gillespie AL, Pan X, Marco-Ramell A, Meharg C, Green BD. Detailed characterisation of STC-1 cells and the pGIP/Neo sub-clone suggests the incretin hormones are translationally regulated. *Peptides*. 2017 ; 96 : 20-30.
239. Rafferty EP, Wylie AR, Elliott CT, Chevallier OP, Grieve DJ, Green BD. *In vitro* and *In vivo* effects of natural putative secretagogues of glucagon-like peptide-1 (GLP-1). *Sci Pharm*. 2011 ; 79(3) : 615-21.
240. Bala V, Rajagopal S, Kumar DP, Nalli AD, Mahavadi S, Sanyal AJ, et al. Release of GLP-1 and PYY in response to the activation of G protein-coupled bile acid receptor TGR5 is mediated by Epac/PLC- ϵ pathway and modulated by endogenous H₂S. *Front Physiol*. 2014 ; 5 : 420.
241. Sato H, Genet C, Strehle A, Thomas C, Lobstein A, Wagner A, et al. Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 ; 362(4) : 793-8.
242. Ayeleso TB, Matumba MG, Mukwevho E. Oleanolic Acid and Its Derivatives: Biological Activities and Therapeutic Potential in Chronic Diseases. *Mol J Synth Chem Nat Prod Chem* . 2017 ; 22(11) : 1915.
243. Genet C, Strehle A, Schmidt C, Boudjelal G, Lobstein A, Schoonjans K, et al. Structure-activity relationship study of betulinic acid, a novel and selective TGR5 agonist, and its synthetic derivatives: potential impact in diabetes. *J Med Chem*. 2010 ; 53(1) : 178-90.
244. Lo S-H, Cheng K-C, Li Y-X, Chang C-H, Cheng J-T, Lee K-S. Development of betulinic acid as an agonist of TGR5 receptor using a new in vitro assay. *Drug Des Devel Ther*. 2016 ; 10 : 2669.
245. Cargnin ST, Gnoatto SB. Ursolic acid from apple pomace and traditional plants : A valuable triterpenoid with functional properties. *Food Chem*. 2017 ; 220 : 477-89.
246. Woźniak Ł, Skąpska S, Marszałek K. Ursolic acid - A pentacyclic triterpenoid with a wide spectrum of pharmacological activities. *Molecules*. 2015 ; 20(11) : 20614-41.

247. Lo S-H, Li Y, Cheng KC, Niu C-S, Cheng J-T, Niu H-S. Ursolic acid activates the TGR5 receptor to enhance GLP-1 secretion in type 1-like diabetic rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2017 ; 390(11) : 1097-104.
248. Bai L, Gao J, Wei F, Zhao J, Wang D, Wei J. Therapeutic potential of ginsenosides as an adjuvant treatment for diabetes. *Front Pharmacol.* 2018 ; 9.
249. Liu C, Zhang M, Hu M-Y, Guo H-F, Li J, Yu Y-L, et al. Increased glucagon-like peptide-1 secretion may be involved in antidiabetic effects of ginsenosides. *J Endocrinol.* 2013 ; 217(2) : 185-96.
250. Odani T, Tanizawa H, Takino Y. Studies on the absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. III. The absorption, distribution and excretion of ginsenoside Rb1 in the rat. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1983 ; 31(3) : 1059-66.
251. Shang W, Yang Y, Zhou L, Jiang B, Jin H, Chen M. Ginsenoside Rb1 stimulates glucose uptake through insulin-like signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J Endocrinol.* 2008 ; 198(3) : 561-9.
252. Lee J, Lee E, Kim D, Lee J, Yoo J, Koh B. Studies on absorption, distribution and metabolism of ginseng in humans after oral administration. *J Ethnopharmacol.* 2009 ; 122(1) :143-8.
253. Yoon SH, Han EJ, Sung JH, Chung SH. Anti-diabetic effects of compound K versus metformin versus compound K-metformin combination therapy in diabetic db/db mice. *Biol Pharm Bull.* 2007 ; 30(11) : 2196-200.
254. Kim K, Kim D-H, Kim HY. Compound K protects MIN6N8 pancreatic β -cells against palmitate-induced apoptosis through modulating SAPK/JNK activation. *Cell Biol Int.* 2009 ; 34(1) : 75-80.
255. Han GC, Ko SK, Sung JH, Chung SH. Compound K enhances insulin secretion with beneficial metabolic effects in db/db mice. *J Agric Food Chem.* 2007 ; 55(26) : 10641-8.
256. Kim K, Park M, Lee YM, Rhyu MR, Kim HY. Ginsenoside metabolite compound K stimulates glucagon-like peptide-1 secretion in NCI-H716 cells via bile acid receptor activation. *Arch Pharm Res.* 2014 ; 37(9) :1193-200.
257. Van Heerden FR. *Hoodia gordonii* : a natural appetite suppressant. *J Ethnopharmacol.* 2008 ; 119(3) : 434-7.
258. Vermaak I, Hamman JH, Viljoen AM. *Hoodia gordonii* : an up-to-date review of a commercially important anti-obesity plant. *Planta Med.* 2011 ; 77(11) : 1149-60.
259. Van Heerden F, Horak R, Maharaj V, Vlegaar R, Senabe J, Gunning P. An appetite suppressant from *Hoodia* species. *Phytochemistry.* 2007 ; 68 : 2545-53.
260. Zhang S, Ma Y, Li J, Ma J, Yu B, Xie X. Molecular matchmaking between the popular weight-loss herb *Hoodia gordonii* and GPR119, a potential drug target for metabolic disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 ; 111(40) : 14571-6.
261. Lan H, Lin HV, Wang CF, Wright MJ, Xu S, Kang L, et al. Agonists at GPR119 mediate secretion of GLP-1 from mouse enteroendocrine cells through glucose-independent pathways. *Br J Pharmacol.* 2012 ;165(8) :2799-807.
262. Yu B, Sun J, Yang X. Assembly of naturally occurring glycosides, evolved tactics, and glycosylation methods. *Acc Chem Res.* 2012 ; 45(8) :1227-36.

263. Tsoukalas M, Psichas A, Reimann F, Gribble FM, Lobstein A, Urbain A. Pregnane glycosides from *Cynanchum menarandrense*. *Steroids*. 2017 ; 125 : 27-32.
264. Tsoukalas M, Muller CD, Lobstein A, Urbain A. Pregnane glycosides from *Cynanchum marnierianum* stimulate GLP-1 secretion in STC-1 cells. *Planta Med*. 2016 ; 82(11/12) : 992-9.
265. Huguet C, Real E, Zhao W-M, Urbain A. Secretion of glucagon-like peptide-1 induced by *Cynanchum* pregnane derivatives : Preliminary hypotheses regarding key structural elements. *Phytochem Lett*. 2021 ; 41 : 88-91.
266. Wedick NM, Pan A, Cassidy A, Rimm EB, Sampson L, Rosner B, et al. Dietary flavonoid intakes and risk of type 2 diabetes in US men and women. *Am J Clin Nutr*. 2012 ; 95(4) : 925-33.
267. Tani T, Nishikawa S, Kato M, Tsuda T. Delphinidin 3-rutinoside-rich blackcurrant extract ameliorates glucose tolerance by increasing the release of glucagon-like peptide-1 secretion. *Food Sci Nutr*. 2017 ; 5(4) : 929-33.
268. Kern M, Fridrich D, Reichert J, Skrbek S, Nussler A, Hofem S, et al. Limited stability in cell culture medium and hydrogen peroxide formation affect the growth inhibitory properties of delphinidin and its degradation product gallic acid. *Mol Nutr Food Res*. 2007 ; 51(9) : 1163-72.
269. Kato M, Tani T, Terahara N, Tsuda T. The anthocyanin delphinidin 3-rutinoside stimulates glucagon-like peptide-1 secretion in murine GLUTag cell line via the Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Kinase II pathway. *PloS One*. 2015 ; 10(5) : e0126157.
270. Bhathena SJ, Velasquez MT. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am J Clin Nutr*. 2002 ; 76(6) : 1191-201.
271. Kwon DY, Hong SM, Ahn IS, Kim MJ, Yang HJ, Park S. Isoflavonoids and peptides from meju, long-term fermented soybeans, increase insulin sensitivity and exert insulinotropic effects in vitro. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif*. 2011 ; 27(2) : 244-52.
272. Jang C-H, Park C-S, Lim J-K, Kim J-H, Kwon D-Y, Kim Y-S, et al. Metabolism of isoflavone derivatives during manufacturing of traditional Meju and Doenjang. *Food Sci Biotechnol*. 2008 ; 17(2) : 442-5.
273. Bahne E, Sun EWL, Young RL, Hansen M, Sonne DP, Hansen JS, et al. Metformin-induced glucagon-like peptide-1 secretion contributes to the actions of metformin in type 2 diabetes. *JCI Insight*. 2018 ; 3(23) : e93936.
274. Rehman K, Ali MB, Akash MSH. Genistein enhances the secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) via downregulation of inflammatory responses. *Biomed Pharmacother*. 2019 ; 112 : 108670.
275. Altenhofen D, Luz G da, Frederico MJS, Venzke D, Brich M, Vigil S, et al. Bis-pyrano prenyl isoflavone improves glucose homeostasis by inhibiting dipeptidyl peptidase-4 in hyperglycemic rats. *J Cell Biochem*. 2017 ; 118(1) : 92-103.
276. Ganesan K, Xu B. A Critical review on polyphenols and health benefits of black soybeans. *Nutrients*. 2017 ; 9(5) : 455.
277. Kurimoto Y, Shibayama Y, Inoue S, Soga M, Takikawa M, Ito C, et al. Black soybean seed coat extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via the activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *J Agric Food Chem*. 2013 ; 61(23) : 5558-64.

278. Qiu J, Zhu H, Liu P, Wang J, Lu L. Protective effects of dietary polyphenols from black soybean seed coats on islet and renal function in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Sci Food Agric*. 2018 ; 98(6) : 2350-9.
279. Jiménez-González L, Álvarez-Corral M, Muñoz-Dorado M, Rodríguez-García I. Pterocarpanes : interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochem Rev*. 2008 ; 7(1) : 125-54.
280. Boué SM, Carter CH, Ehrlich KC, Cleveland TE. Induction of the soybean phytoalexins coumestrol and glyceollin by *Aspergillus*. *J Agric Food Chem*. 2000 ; 48(6) : 2167-72.
281. Park S, Ahn IS, Kim JH, Lee MR, Kim JS, Kim HJ. Glyceollins, one of the phytoalexins derived from soybeans under fungal stress, enhance insulin sensitivity and exert insulinotropic actions. *J Agric Food Chem*. 2010 ; 58(3) : 1551-7.
282. Nagamine R, Ueno S, Tsubata M, Yamaguchi K, Takagaki K, Hira T, et al. Dietary sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaf extract attenuates hyperglycaemia by enhancing the secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1). *Food Funct*. 2014 ; 5(9) : 2309-16.
283. Kim Y, Keogh JB, Clifton PM. Polyphenols and glycemic control. *Nutrients*. 2016 ; 8(1).
284. Hussein GME, Matsuda H, Nakamura S, Hamao M, Akiyama T, Tamura K, et al. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) promotes satiety and body weight lowering in mice: involvement of glucagon-like peptide-1. *Biol Pharm Bull*. 2011 ; 34(12) :1849-55.
285. Gambero A, Ribeiro ML. The positive effects of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) in Obesity. *Nutrients*. 2015 ; 7(2) : 730-50.
286. Wagner H, Bauer R, Melchart D, Staudinger A. Fructus Arctii – Niubangzi. In: Wagner H, Bauer R, Melchart D, Staudinger A, éditeurs. *Chromatographic fingerprint analysis of herbal medicines Volume IV: Thin-layer and high performance liquid chromatography of Chinese drugs*. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 19-26.
287. Hy W, Yp C. Clinical observation on treatment of diabetic nephropathy with compound fructus arctii mixture. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi Chin J Integr Tradit West Med*. 2004 ; 24(7) : 589-92.
288. Xu Z, Wang X, Zhou M, Ma L, Deng Y, Zhang H, et al. The antidiabetic activity of total lignan from Fructus Arctii against alloxan-induced diabetes in mice and rats. *Phytother Res PTR*. 2008 ; 22(1) : 97-101.
289. Zhaohui X, Jiaying J, Kaisarevic W, Chenchen G, Yi F. Evaluation of hypoglycemic activity of total lignans from Fructus Arctii in the spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *J Ethnopharmacol*. 2013 ; 151(1) : 548-55.
290. Park E-Y, Kim E-H, Kim C-Y, Kim M-H, Choung J-S, Oh Y-S, et al. *Angelica dahurica* extracts improve glucose tolerance through the activation of GPR119. *PLOS ONE*. 2016 ; 11(7) : e0158796.
291. Guo L-Q, Taniguchi M, Xiao Y-Q, Baba K, Ohta T, Yamazoe Y. Inhibitory effect of natural furanocoumarins on human microsomal cytochrome P450 3A activity. *Jpn J Pharmacol*. 2000 ; 82(2) :122-9.
292. Sagir A, Schmitt M, Dilger K, Häussinger D. Inhibition of cytochrome P450 3A : relevant drug interactions in gastroenterology. *Digestion*. 2003 ; 68(1) : 41-8.

293. Xu H, Delling M, Jun JC, Clapham DE. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat Neurosci.* 2006 ; 9(5) : 628-35.
294. Cho H-J, Callaghan B, Bron R, Bravo DM, Furness JB. Identification of enteroendocrine cells that express TRPA1 channels in the mouse intestine. *Cell Tissue Res.* 2014 ; 356(1) : 77-82.
295. Emery EC, Diakogiannaki E, Gentry C, Psichas A, Habib AM, Bevan S, et al. Stimulation of GLP-1 secretion downstream of the ligand-gated ion channel TRPA1. *Diabetes.* 2015 ; 64(4) : 1202-10.
296. Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2015 ; 55(3) : 304-18.
297. Ripken D, van der Wielen N, Wortelboer HM, Meijerink J, Witkamp RF, Hendriks HFJ. Steviol glycoside rebaudioside A induces glucagon-like peptide-1 and peptide YY release in a porcine ex vivo intestinal model. *J Agric Food Chem.* 2014 ; 62(33) : 8365-70.
298. Farhat G, Berset V, Moore L. Effects of stevia extract on postprandial glucose response, satiety and energy intake: A three-arm crossover trial. *Nutrients.* 2019 ; 11(12).
299. Hellfritsch C, Brockhoff A, Stähler F, Meyerhof W, Hofmann T. Human psychometric and taste receptor responses to steviol glycosides. *J Agric Food Chem.* 2012 ; 60(27) : 6782-93.
300. Pestka JJ. Deoxynivalenol : mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Arch Toxicol.* 2010 ; 84(9) : 663-79.
301. Maresca M. From the gut to the brain: journey and pathophysiological effects of the food-associated trichothecene mycotoxin deoxynivalenol. *Toxins.* 2013 ; 5(4) : 784-820.
302. Girardet C, Bonnet MS, Jdir R, Sadoud M, Thirion S, Tardivel C, et al. The food-contaminant deoxynivalenol modifies eating by targeting anorexigenic neurocircuitry. *PloS One.* 2011 ; 6(10) : e26134.
303. Zhou H-R, Pestka JJ. Deoxynivalenol (vomitoxin)-induced cholecystokinin and glucagon-like peptide-1 release in the STC-1 enteroendocrine cell model is mediated by calcium-sensing receptor and transient receptor potential ankyrin-1 channel. *Toxicol Sci.* 2015 ; 145(2) : 407-17.
304. Harvey AL. Toxins and drug discovery. *Toxicon Off J Int Soc Toxinology.* 2014 ; 92 : 193-200.
305. Chang X, Heene E, Qiao F, Nick P. The phytoalexin resveratrol regulates the initiation of hypersensitive cell death in vitis cell. *PLoS ONE.* 2011 ; 6(10).
306. Gambini J, Inglés M, Olaso G, Lopez-Grueso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L, et al. Properties of resveratrol: *In vitro* and *In vivo* studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2015 ; 2015.
307. Nanjan MJ, Betz J. Resveratrol for the management of diabetes and its downstream pathologies. *Eur Endocrinol.* 2014 ; 10(1) : 31-5.
308. Dao T-MA, Waget A, Klopp P, Serino M, Vachoux C, Pechere L, et al. Resveratrol increases glucose induced GLP-1 secretion in mice : a mechanism which contributes to the glycemic control. *PloS One.* 2011 ; 6(6) : e20700.
309. Wang J, Wang L, Lou G-H, Zeng H-R, Hu J, Huang Q-W, et al. Coptidis rhizoma : a comprehensive review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *Pharm Biol.* 2019 ; 57(1) :193-225.

310. Pang B, Yu X-T, Zhou Q, Zhao T-Y, Wang H, Gu C-J, et al. Effect of rhizoma coptidis (Huang Lian) on treating diabetes mellitus. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015 ; 2015 : e921416.
311. Yin J, Xing H, Ye J. Efficacy of berberine in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism.* 2008 ; 57(5) : 712-7.
312. Yu Y, Hao G, Zhang Q, Hua W, Wang M, Zhou W, et al. Berberine induces GLP-1 secretion through activation of bitter taste receptor pathways. *Biochem Pharmacol.* 2015 ; 97(2) : 173-7.
313. Tan J, Abrol R, Trzaskowski B, Goddard WA. 3D structure prediction of TAS2R38 bitter receptors bound to agonists phenylthiocarbamide (PTC) and 6-n-propylthiouracil (PROP). *J Chem Inf Model.* 2012 ; 52(7) : 1875-85.
314. Yu Y, Liu L, Wang X, Liu X, Liu X, Xie L, et al. Modulation of glucagon-like peptide-1 release by berberine : *In vivo* and *in vitro* studies. *Biochem Pharmacol.* 2010 ; 79(7) : 1000-6.
315. Zhang Q, Xiao X, Li M, Li W, Yu M, Zhang H, et al. Berberine moderates glucose metabolism through the GnRH-GLP-1 and MAPK pathways in the intestine. *BMC Complement Altern Med.* 2014 ; 14 : 188.
316. Yu L-L, Li R-T, Ai Y-B, Liu W, Deng Z-S, Zou Z-M. Protoberberine isoquinoline alkaloids from *Arcangelisia gusanlung*. *Molecules.* 2014 ; 19(9) : 13332-41.
317. Greenwood D. The quinine connection. *J Antimicrob Chemother.* 1992 ; 30(4) : 417-27.
318. Achan J, Talisuna AO, Erhart A, Yeka A, Tibenderana JK, Baliraine FN, et al. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world : role in the treatment of malaria. *Malar J.* 2011 ; 10(1) : 144.
319. Harada K, Sakaguchi H, Sada S, Ishida R, Hayasaka Y, Tsuboi T. Bitter tastant quinine modulates glucagon-like peptide-1 exocytosis from clonal GLUTag enteroendocrine L cells via actin reorganization. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 ; 500(3) : 723-30.
320. Kim K-S, Cha NH, Kim K-W, Shin MH, Kim K-H, Lee I-S, et al. Transcriptomic analysis of the bitter taste receptor-mediated glucagon-like peptide-1 stimulation effect of quinine. *BioChip J.* 2013 ; 7(4) : 386-92.
321. Bateman DN, Dyson EH. Quinine toxicity. *Adverse Drug React Acute Poisoning Rev.* 1986 ; 5(4) : 215-33.
322. Dömötör A, Szolcsányi J, Mózsik G. Capsaicin and glucose absorption and utilization in healthy human subjects. *Eur J Pharmacol.* 2006 ; 534(1-3) : 280-3.
323. Matsumoto K, Kurosawa E, Terui H, Hosoya T, Tashima K, Murayama T, et al. Localization of TRPV1 and contractile effect of capsaicin in mouse large intestine : high abundance and sensitivity in rectum and distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009 ; 297(2) : 348-60.
324. Takanohashi T, Isaka M, Ubukata K, Mihara R, Bernard BK. Studies of the toxicological potential of capsinoids, XIII: Inhibitory effects of capsaicin and capsinoids on cytochrome P450 3A4 in human liver microsomes. *Int J Toxicol.* 2010 ; 29(2 (suppl.)) : 22-6.
325. Rungapamestry V, Duncan AJ, Fuller Z, Ratcliffe B. Changes in glucosinolate concentrations, myrosinase activity, and production of metabolites of glucosinolates in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cooked for different durations. *J Agric Food Chem.* 2006 ; 54(20) : 7628-34.

326. Sternini C. Taste receptors in the gastrointestinal tract. IV. Functional implications of bitter taste receptors in gastrointestinal chemosensing. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007 ; 292(2) : 457-61.
327. Gorovic N, Afzal S, Tjønneland A, Overvad K, Vogel U, Albrechtsen C, et al. Genetic variation in the hTAS2R38 taste receptor and brassica vegetable intake. *Scand J Clin Lab Invest.* 2011 ; 71(4) : 274-9.
328. Pham H, Hui H, Morvaridi S, Cai J, Zhang S, Tan J, et al. A bitter pill for type 2 diabetes ? The activation of bitter taste receptor TAS2R38 can stimulate GLP-1 release from enteroendocrine L-cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 ; 475(3) : 295-300.
329. Wheatcroft PEJ, Thornburn CC. Toxicity of the taste testing compound phenylthiocarbamide. *Nature New Biol.* 1972 ; 235(55) : 93-4.
330. Khan N, Mukhtar H. Tea polyphenols for health promotion. *Life Sci.* 2007 ; 81(7) : 519-33.
331. Liu C-Y, Huang C-J, Huang L-H, Chen I-J, Chiu J-P, Hsu C-H. Effects of green tea extract on insulin resistance and glucagon-like peptide 1 in patients with type 2 diabetes and lipid abnormalities : a randomized, double-blinded, and placebo-controlled trial. *PLoS One.* 2014 ; 9(3) : e91163.
332. Hamidpour R, Hamidpour M, Hamidpour S, Shahlari M. Cinnamon from the selection of traditional applications to its novel effects on the inhibition of angiogenesis in cancer cells and prevention of Alzheimer's disease, and a series of functions such as antioxidant, anticholesterol, antidiabetes, antibacterial, antifungal, nematocidal, acaracidal, and repellent activities. *J Tradit Complement Med.* 2015 ; 5(2) : 66-70.
333. Qin B, Nagasaki M, Ren M, Bajotto G, Oshida Y, Sato Y. Cinnamon extract (traditional herb) potentiates in vivo insulin-regulated glucose utilization via enhancing insulin signaling in rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 2003 ; 62(3) : 139-48.
334. Qin B, Nagasaki M, Ren M, Bajotto G, Oshida Y, Sato Y. Cinnamon extract prevents the insulin resistance induced by a high-fructose diet. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab.* 2004 ; 36(2) : 119-25.
335. Khan A, Safdar M, Khan MMA, Khattak KN, Anderson RA. Cinnamon improves glucose and lipids of people with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2003 ; 26(12) : 3215-8.
336. Hlebowicz J, Hlebowicz A, Lindstedt S, Björgell O, Höglund P, Holst JJ, et al. Effects of 1 and 3 g cinnamon on gastric emptying, satiety, and postprandial blood glucose, insulin, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, glucagon-like peptide 1, and ghrelin concentrations in healthy subjects. *Am J Clin Nutr.* 2009 ; 89(3) : 815-21.
337. Vanschoonbeek K, Thomassen BJW, Senden JM, Wodzig WKWH, Van Loon LJC. Cinnamon supplementation does not improve glycemic control in postmenopausal type 2 diabetes patients. *J Nutr.* 2006 ; 136(4) : 977-80.
338. Baker WL, Gutierrez-Williams G, White CM, Kluger J, Coleman CI. Effect of cinnamon on glucose control and lipid parameters. *Diabetes Care.* 2008 ; 31(1) :41-3.

Résumé

Résumé :

Le diabète est une maladie métabolique complexe dont l'évolution épidémiologique est préoccupante. Les autorités sanitaires estiment que plus de 4 millions de personnes meurent chaque année de complications liées à cette pathologie. Les insulines et les antidiabétiques oraux ont permis d'améliorer la prise en charge des patients diabétiques. La découverte des incrélines comme le GLP-1 est à l'origine des dernières innovations thérapeutiques concernant le traitement du diabète de type 2. Il existe deux mécanismes d'action des principes actifs développés autour de cette hormone intestinale. Le premier vise à augmenter la demi-vie du GLP-1, tandis que le second consiste en un apport exogène d'analogues synthétiques de ce dernier. Ne serait-il pas judicieux de trouver des molécules capables de stimuler la sécrétion du GLP-1 par les cellules entéroendocrines ? C'est autour de cette question que nous avons cherché à répertorier les plantes et les molécules naturelles décrites dans la littérature scientifique comme possédant une action sécrétagogue du GLP-1. Après un rappel sur le diabète et l'arsenal antidiabétique actuel, cet ouvrage détaille la physiologie du GLP-1 et les modèles utilisés en laboratoire pour son étude. Enfin, la dernière partie se concentre sur les plantes, leurs extraits et les métabolites identifiés qui exercent une augmentation de la sécrétion du GLP-1 pour le développement de nouveaux candidat-médicaments.

Mots-clefs : Diabète, Antidiabétique, Sécrétagogue, GLP-1, Molécules naturelles, Métabolites secondaires, Phytochimie, Pharmacognosie



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

De honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances,

De exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement,

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité,

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession,

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens, De coopérer avec les autres professionnels de santé.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Signature de l'étudiant

Nom : HUGUET

Prénom : Clément

du Président du jury

Nom : SARROUILHE

Prénom : Denis