



Recherche de sécrétagogues naturels du GLP-1 : exploration du potentiel antidiabétique d'espèces du genre *Cynanchum* (Apocynaceae)

Michail Tsoukalas

► To cite this version:

Michail Tsoukalas. Recherche de sécrétagogues naturels du GLP-1 : exploration du potentiel antidiabétique d'espèces du genre *Cynanchum* (Apocynaceae). Biologie végétale. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAF047 . tel-01284239

HAL Id: tel-01284239

<https://theses.hal.science/tel-01284239>

Submitted on 7 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES ED222

UMR 7200

THÈSE présentée par :

Michail TSOUKALAS

soutenue le : **14 Septembre 2015**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Spécialité : Pharmacognosie

**Recherche de sécrétagogues
naturels du GLP-1 : exploration du
potentiel antidiabétique d'espèces du
genre *Cynanchum* (Apocynaceae).**

THÈSE dirigée par :

Mme LOBSTEIN Annelise

Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme LAVAUD Catherine

Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne

M. LITAUDON Marc

ITA, Institut de Chimie des Substances Naturelles Gif-sur-Yvette

AUTRE MEMBRE DU JURY :

M. MARCHIONI Eric

Professeur, Université de Strasbourg

INVITÉE:

Mme URBAIN Aurélie

Co-encadrante, MCU, Université de Strasbourg,

« Mais avant tout, c'est quoi l'éducation ? Est-ce l'information, la technique, le diplôme de spécialisation qui garantit le mariage, l'acquisition d'automobile et d'immobilier [...] ou bien le pétrissage intellectuel et psychique d'un être libre avec une structure onirique capable de questionner ; ému par la liberté avec l'intention d'une fugue volante vers les astres ? »

M. Hadjidakis, 1980

Στις γυναίκες χάρη στις οποίες έφτασα μέχρι εδώ.

Aux femmes grâce auxquelles je suis arrivé jusqu'ici.

Remerciements

Tout d'abord je tiens à exprimer toute ma reconnaissance aux membres du jury Mme la Professeur Catherine Lavaud, Monsieur le Docteur Marc Litaudon et à Monsieur le Professeur Eric Marchioni qui ont accepté d'être membres de ce jury de thèse et pour leur temps consacré à évaluer ce travail.

Il y a trois ans, la responsable de l'équipe de Pharmacognosie de Strasbourg m'a fait confiance en me donnant comme projet de recherche, le projet Benjamin de son équipe. Annelise, je tiens à vous remercier pour m'avoir confié ce projet innovant qui venait de démarrer. Comme tous les projets innovants, il y a eu des bonnes et des mauvaises surprises. Merci d'avoir été là pour me soutenir, surtout pendant des périodes difficiles. En admirant votre patience et votre courage, je vous remercie d'avoir fait tout votre possible, pour qu'à la fin de ces trois ans je puisse raconter une belle histoire et en plus sans que la langue française subisse beaucoup de chocs.

La réalisation de cette thèse n'aurait pas été possible sans l'implication d'Aurélie Urbain, maître de conférences au sein de l'équipe de Pharmacognosie et porteur du projet « Substances naturelles antidiabétiques ». Aurélie merci d'avoir appuyé ma candidature, de m'avoir aidé dans mes premiers pas en tant que « Strasbourgeois d'adoption », pour les conseils scientifiques, l'encadrement du projet et la prise de contact avec nos collaborateurs. Tout cela, dans un cadre agréable, notamment en ce qui concerne la les adduits Na^+ à l' HRMS. Merci pour ton aide avec le français et pour le coaching à la communication scientifique.

Le début de ce projet a eu lieu au sein de l'entreprise Phytodia. Je remercie Régis Saladin pour sa confiance, de nous avoir fourni le matériel pour la réalisation des expériences avec les cellules STC-1 ainsi que pour ses remarques constructives. Merci aussi à Denis Weltin et Cynthia Calligaro pour leur aide importante.

L'application de la culture cellulaire en interne a eu lieu dans le laboratoire de Christian Muller que je remercie pour les échanges constructifs sur la cytométrie, la culture cellulaire et la culture alsacienne. La culture cellulaire en interne n'aurait pas été possible sans l'aide de Sarah Ali Azouaou. Merci Sarah pour ta disponibilité ton encouragement.

Ce projet a exigé des compétences pluridisciplinaires, la plupart desquelles étant présentes au sein de l'UMR 7200. Merci à Maria Zeniou, Marie-Claude Kilhoffer, Nelly Frossard pour leurs astuces en essais pharmacologiques. Merci à Didier Rognan pour la modélisation d'une de mes structures. Merci à Marcel Hibert de m'avoir accepté et intégré au sein de l'UMR 7200 et de bien gérer cette grande famille ayant des compétences et des caractères hétérogènes.

Lors de cette thèse, j'ai eu l'occasion d'aller à Cambridge avec mes piluliers pour évaluer l'activité de mes composés isolés chez les experts de la physiologie de la sécrétion du GLP-1. I would like to thank Pr. Fiona Gribble et Pr. Frank Reimann for their trust, time et hints for the GLP-1 secretion assays. All of that wouldn't be possible without my compatriot Dr Arianna Psichas whose time, patience, perseverance, encouragement et positive energy lead to some interesting results with the fastidious primary cell culture; thank you Arianna!

Les essais pharmacologiques ont été importants pour l'orientation et la validation de ce projet. Pourtant, son barycentre a été la détermination structurale des composés isolés. Un grand merci à la plate-forme d'analyses chimiques de la faculté de Pharmacie. En particulier je voudrais remercier Patrick Werhung non seulement pour les analyses HRMS mais aussi pour les discussions intéressantes que nous avons eues lors de nos pauses café. Merci aussi à Cyril Antheaume et Justine Vieville pour l'acquisition des jolis spectres RMN de mes composés isolés en bien faible quantité.

Dans le cadre de mon doctorat, j'ai eu l'occasion de participer à l'encadrement de stagiaires. Merci Marianne pour ton aide importante dans la gestion mais aussi l'interprétation des données RMN, merci aussi pour ton amitié, le squash et les bières au grincheux. Merci aussi à Cécile et Nicolas pour leur aide avec la CPC et l'analyse des fractions obtenues.

J'aimerais aussi remercier tous les membres de l'équipe Gnosie pour m'avoir intégré dans cette famille. Merci Amélie et Veronika de m'avoir aidé dans mes premiers pas hésitants dans ce labo. Laurence, je te remercie pour ton énergie positive et la passion que tu arrives à communiquer aux autres non seulement pour la culture *in vitro* de cellules végétales mais pour la vie en général aussi.

Un grand merci aux deux « dobermanns » de la « Team Gnosie 67 ». Lorène et Florence, la vie quotidienne du labo n'aurait pas été si cool sans vous deux. Votre aide avec le français a été très importante et en échange j'ai vous ai fait bien rire avec mes perles linguistiques. Merci pour le soutien psy quand les choses tournaient mal et les discussions sérieuses (ou pas) concernant la vie après la thèse. Merci pour votre amitié et votre solidarité, ça m'a fait sentir comme si j'étais chez moi et que je faisais partie d'une petite famille de r'nards. Merci pour l'immersion au ski et les bons vins bordelais.

« Les chimistes d'en face », François, Maud, Emilie, je vous remercie pour le soutien, nos discussions constructives (et pas que) et les blagues au quotidien autour du menu du RU.

Enfin, un grand merci à ma famille qui m'a toujours soutenu même quand mes décisions m'ont mené à l'autre bout de l'Europe.

LISTE D'ABREVIATIONS

A, B, C ..	Symboles pour les composés isolés
$[\alpha]_D^{25}$	Pouvoir rotatoire spécifique à la longueur d'onde D du sodium à 25°C
ACN	Acétonitrile
AF	Acide formique
AcOEt	Acétate d'éthyle
br.	large (<i>broad</i>)
CCM	Chromatographie sur couche mince
cHex	Cyclohexane
chloroform-d	Chloroforme deutéré
Comp.	Composé
C-n	Carbone de la position n
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CPC	Chromatographie de partage centrifuge
Cyme	extrait éthanolique de <i>Cynanchum menarandrense</i>
Cyme M	fraction enrichie en prégnanes de Cyme
CymF	extrait éthanolique de <i>Cynanchum marnierianum</i> (lot E)
CymF M	fraction bioactive de CymF
<i>d</i>	doublet
Da	Dalton
DAD	détecteur à barrettes de diodes
DCM	Dichlorométhane
<i>dd</i>	doublet dédoublé
<i>ddd</i>	doublet des doublets dédoublés
<i>dq</i>	doublet de quadruplet
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO-d6	Diméthyl-sulfoxyde deutéré
DPP-4	Dipeptidyl Peptidase 4
<i>dt</i>	doublet détriplé
E.L.I.S.A.	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ESI	Ionisation par électrospray
F/I	Forskoline / 3-isobutyl-1-méthylxanthine à 10 µM
FBS	sérum bovin foetal
fr.	fraction
GLP-1	<i>Glucagon-Like Peptide 1</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation spectroscopy</i>
H-n	Proton de la position n
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HRMS	Spectrométrie de masse à haute résolution
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation spectroscopy</i>
Hz	Herz
i.d.	diamètre interne
J	Constante de couplage
<i>m</i>	multiplet
<i>m/z</i>	Rapport masse/charge électrique
MeOH	Méthanol

méthanol-d4	méthanol deutéré
min	minute
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
ppm	partie par million
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
R _f	Rapport frontal
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROESY	<i>Rotating frame nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
rpm	rotations par minute
s	singulet
sh	<i>shoulder</i> (épaulement)
SPE	Extraction sur Phase Solide
<i>t</i>	triplet
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
T _R	Temps de rétention
tt	triplet détriplé
UV	UltraViolet
VLC	<i>Vacuum liquid chromatography</i>
δ	déplacement chimique
λ _{max}	Maximum d'absorption dans l'UV

Pour les produits isolés et qui sont déjà connus, les noms triviaux ont été utilisés. En ce qui concerne la numérotation des prégnanes isolés, celle-ci a été établie sur la base de la biosynthèse des prégnanes à partir du 2,3-époxy-squalène cyclisé pour former un stérol tétracyclique portant les noyaux cyclohexaniques A,B, C et le noyau cyclopentanique D.

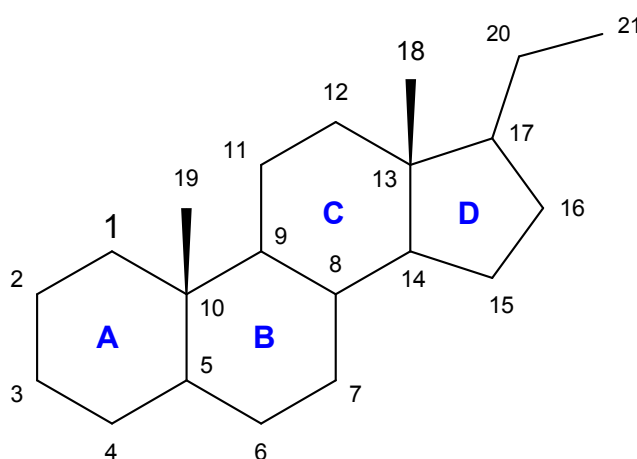


Table des matières

.....	1
Buts de cette étude	1
Introduction.....	2
1. L'homéostasie glucidique	3
1.1. Le diabète	5
1.1.1. Le diabète de type 1.....	5
1.1.2. Le diabète de type 2.....	6
1.1.3. Le syndrome métabolique	7
1.1.4. L'insulinorésistance.....	8
1.1.5. Complications cliniques du diabète de type 2	9
1.2. Les traitements antidiabétiques.....	10
1.2.1. Les antidiabétiques oraux	10
1.2.2. Les sécrétagogues d'insuline.....	11
1.2.3. Inhibiteurs d'alpha-glucosidase	12
1.2.4. Inhibiteurs de SGLT2	13
1.2.5. L'administration de l'insuline.....	14
1.2.6. Schémas thérapeutiques antidiabétiques.....	14
1.3. L'effet incrétine	16
1.3.1. Le GIP (Glucose dependent Insulinotropic Polypeptide)	17
1.3.2. Le GLP-1 (Glucagon-like-peptide 1).....	18
1.3.3. Effets biologiques du GLP-1	20
1.4. Les incrétinomimétiques	22
1.4.1. Les agonistes du GLP-1R	22
1.4.2. Les inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4).....	24
1.5. La recherche des sécrétagogues GLP-1	25
2. Les plantes étudiées.....	29
2.1. Le genre <i>Cynanchum</i>	29
2.1.1. Usages traditionnels.....	30
2.2. Les espèces de <i>Cynanchum</i> aphylls malgaches	32
2.2.1. <i>Cynanchum marnierianum</i> Rauh.....	32
2.2.2. <i>Cynanchum menarandrense</i> Jum. & H. Perrier	34
2.2.3. <i>Cynanchum descoingsii</i> Rauh	35
2.3. Aspects phytochimiques du genre <i>Cynanchum</i>	36
3. Les prégnanes	40
3.1. Biosynthèse	40
3.2. Activités biologiques.....	42
Résultats et discussion	43
4. Analyses phytochimiques	44
4.1. Isolement bioguidé des métabolites de parties aériennes de <i>Cynanchum marnierianum</i> Rauh.....	44
4.1.1. Comparaison par HPLC-DAD de différents lots de <i>Cynanchum marnierianum</i>	44
4.1.2. Fractionnement bio-guidé du lot Cym_Fr_10_12	46
4.1.3. Isolement des métabolites ubiquitaires du lot Cym_Fr_10_12	48
4.1.4. Fractionnement du lot Cym_Ma_09_12	50
4.2. Isolement des métabolites de <i>Cynanchum menarandrense</i> Jum. & H. Perrier.....	50
4.2.1. Isolement des composés A-E et I-K	54

4.2.2. Isolement des composés F, G et H	55
4.3. Analyse comparative de <i>C. descoingsii</i> avec <i>C. menarandrense</i>	57
5. Détermination structurale des composés isolés	58
5.1. Détermination structurale des composés isolés de <i>Cynanchum menarandrense</i>	58
5.1.1. Détermination structurale du composé A.....	58
5.1.2. Détermination structurale du composé B.....	64
5.1.3. Détermination structurale du composé C.....	67
5.1.4. Détermination structurale du composé D	69
5.1.5. Détermination structurale du composé E.....	70
5.1.6. Détermination structurale du composé F.....	72
5.1.7. Détermination structurale du composé G	74
5.1.8. Détermination structurale du composé H	76
5.1.9. Détermination structurale du composé I.....	79
5.1.10. Détermination structurale du composé J.....	81
5.1.11. Détermination structurale du composé K.....	84
5.2. Détermination structurale des composés isolés de <i>Cynanchum marnierianum</i>	86
5.2.1. Détermination structurale du composé L	86
5.2.2. Détermination structurale du composé M	87
5.2.3. Détermination structurale du composé N	89
5.2.4. Détermination structurale du composé O	90
5.2.5. Détermination structurale du composé P.....	96
5.2.6. Détermination structurale du composé Q.....	100
6. Evaluation des effets biologiques	102
6.1. Modèle <i>in vitro</i> utilisant la lignée STC-1	102
6.1.1. Criblage initial	102
6.1.2. Optimisations du protocole de l'essai <i>in vitro</i> avec la lignée STC-1.....	104
6.1.3. Résultats.....	107
6.2. Autres modèles <i>in vitro</i>	108
6.2.1. Evaluation de l'effet sécrétagogue GLP-1 sur des cellules intestinales primaires murines	108
6.2.2. Evaluation de l'effet sécrétagogue GLP-1 sur la lignée cellulaire GLUTag	111
6.3. Evaluation de la cytotoxicité par les réactifs MTT et MTS.....	112
6.1. Evaluation de la cytotoxicité par cytométrie.....	114
Bilan et Perspectives	117
Matériels et méthodes.....	126
7. Matériel végétal et extraction	127
7.1. <i>Cynanchum marnierianum</i> Rauh	127
7.2. <i>Cynanchum menarandrense</i> Jum. & Perrier.....	127
7.3. <i>Cynanchum descoingsii</i> Rauh	127
8. Isolement des Composés A à Q.....	128
8.1. Fractionnement de l'extrait de <i>Cynanchum marnierianum</i>	128
8.1.1. Isolement du marnieranoside A.....	128
8.1.2. Isolement des composés triterpéniques L, M et N	129
8.1.3. Isolement du composé Q	129
8.1.1. Isolement du composé P.....	130
8.2. Fractionnement de l'extrait de <i>Cynanchum menarandrense</i> (lot Cyme_09_12)	131
8.2.1. Isolement des prégnanes mono-glucosylés et des flavonoïdes.....	131
8.2.2. Isolement des prégnanes di-glucosylés	131
9. Méthodes chromatographiques analytiques	133

9.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	133
9.2. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrophotométrie ultraviolet/visible (HPLC/UV/Vis-DAD)	133
9.3. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (HPLC/HRMS)	133
10. Méthodes physico-chimiques	134
10.1. Pouvoir rotatoire	134
10.2. Spectrométrie de masse de haute résolution (HRMS)	134
10.3. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	134
11. Méthodes biologiques	134
11.1. Hydrolyse enzymatique	134
11.2. Culture des cellules	135
11.2.1. STC-1	135
11.2.2. GLUTag	135
11.2.3. Cellules intestinales murines primaires	135
11.3. Traitement des cellules et dosage du GLP-1	135
11.4. Essais d'évaluation de la viabilité cellulaire	137
11.4.1. MTT	137
11.4.2. MTS	137
11.4.3. Cytométrie par imagerie	137
Annexe : tableaux RMN des prégnanes isolés	138
Références bibliographiques	152

Buts de cette étude

Le diabète de type 2 a été caractérisé comme une maladie métabolique des adultes provenant des milieux sociaux aisés. Néanmoins, la Fédération Internationale du Diabète (FID) indique qu'aujourd'hui 4 diabétiques sur 5 sont originaires des pays de faible revenu, et caractérise le diabète comme un fléau du 21^{ème} siècle affectant 382 millions de patients. En 2013, il y a eu 5,1 millions de décès avec un coût de sante remontant aux 548 milliards de dollars. D'après les statistiques de la FID, le diabète de type 2 est une maladie en progression, car il faut s'attendre à une augmentation de l'incidence de cette pathologie métabolique de l'ordre de 50% d'ici 2035. L'arsenal thérapeutique utilisé pour la prise en charge de cette pathologie est très varié mais les traitements sont d'efficacité parfois limitée et leurs effets secondaires non négligeables. Avec un tel constat, le besoin d'identifier des nouveaux composés antidiabétiques paraît évident.

L'approche thérapeutique antidiabétique la plus récente consiste à administrer des composés mimant l'activité de l'hormone peptidique GLP-1 (*Glucagon-like peptide-1*). Celle-ci exerce des effets bénéfiques dans la gestion de l'équilibre glucidique, se traduisant notamment par des effets anorexigènes et hypoglycémiants. Mais ces agents, à l'instar des autres traitements antidiabétiques, ne sont pas dépourvus d'effets secondaires, sont administrés par voie injectable et sont de coût assez élevé.

Au sein de l'équipe *Pharmacognosie et molécules naturelles bioactives* (UMR 7200) de Strasbourg, une stratégie alternative, impliquant toujours l'hormone GLP-1, a été sélectionnée. Elle consiste à rechercher des composés d'origine végétale capables de stimuler la sécrétion du GLP-1, laquelle d'après la littérature est diminuée chez les personnes atteintes du diabète de type 2.

Hoodia gordonii (Masson) Sweet ex Decne (Apocynaceae) a été la plante de référence pour cette étude. En effet, son utilisation traditionnelle comme « coupe-faim » et ses effets hypoglycémiants démontrés sur des modèles *in vivo* (Bindra, Cawthorne, et Rubin 2002) ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique, au départ dans un but de développer des compléments alimentaires pour lutter contre l'obésité. En tenant compte de la dualité des effets de cette plante, nous avons posé l'hypothèse de l'implication de la voie du GLP-1 dans ses effets anorexigène et hypoglycémiant. Néanmoins, son statut de plante protégée (*H. gordonii* est cité dans l'annexe II de la CITES) nous a orientés vers la recherche de composés naturels avec un potentiel antidiabétique, biosynthétisés dans des espèces phylogénétiquement proches.

Lors d'un criblage d'extraits préparés à partir de plantes taxonomiquement proches du *Hoodia*, 9 espèces du genre *Cynanchum* se sont révélés bioactives c'est-à-dire capables de stimuler *in vitro* la sécrétion de GLP-1. Dans le cadre de ce projet de recherche, deux espèces de *Cynanchum* ont fait l'objet d'études phytochimiques approfondies afin de repérer leurs composés bioactifs. Pour cela, nous avons été amenés à optimiser le modèle cellulaire utilisé lors du criblage préliminaire, en analysant différents paramètres, afin d'évaluer l'effet sécrétagogue GLP-1 de nos extraits, de nos fractions, et de nos composés purifiés.

Cette étude contribue ainsi à la connaissance scientifique de deux espèces de *Cynanchum*, non encore explorées du point de vue phytochimique et pharmacologique : *Cynanchum marnierianum* Rauh et *Cynanchum menarandrense* Jum. & H. Perrier.

Introduction

1. L'homéostasie glucidique

Le glucose est l'apport énergétique primordial pour l'organisme. Ses sources, majoritairement exogènes (apport alimentaire) mais aussi endogènes (glycogénolyse), alimentent les cellules pour la production d'énergie sous forme d'ATP.

L'homéostasie glucidique (**Figure 1**) consiste en l'ensemble des mécanismes impliqués pour maintenir la glycémie entre 0,8 et 1,2 g/L. L'organisme doit affronter une variation des apports glucidiques notamment entre les conditions à jeun donc sans aucun apport glucidique et les conditions postprandiales pendant lesquelles existe un flux important de glucose. Les hormones primordiales à l'homéostasie du glucose sont l'**insuline** et le **glucagon**. L'insuline, aux propriétés hypoglycémiantes, agit en valorisant les taux élevés de glucose sanguin, en facilitant l'absorption du glucose par les tissus pour leur fonctionnement mais aussi pour le stockage énergétique, notamment au niveau du foie et du tissu adipeux. Dans des conditions à jeun, le glucagon va au contraire stimuler la dégradation des formes de stockage d'énergie comme le glycogène hépatique afin de libérer du glucose et permettre que les taux de glycémie ne baissent pas, faute de prise alimentaire (Vander, 2001).

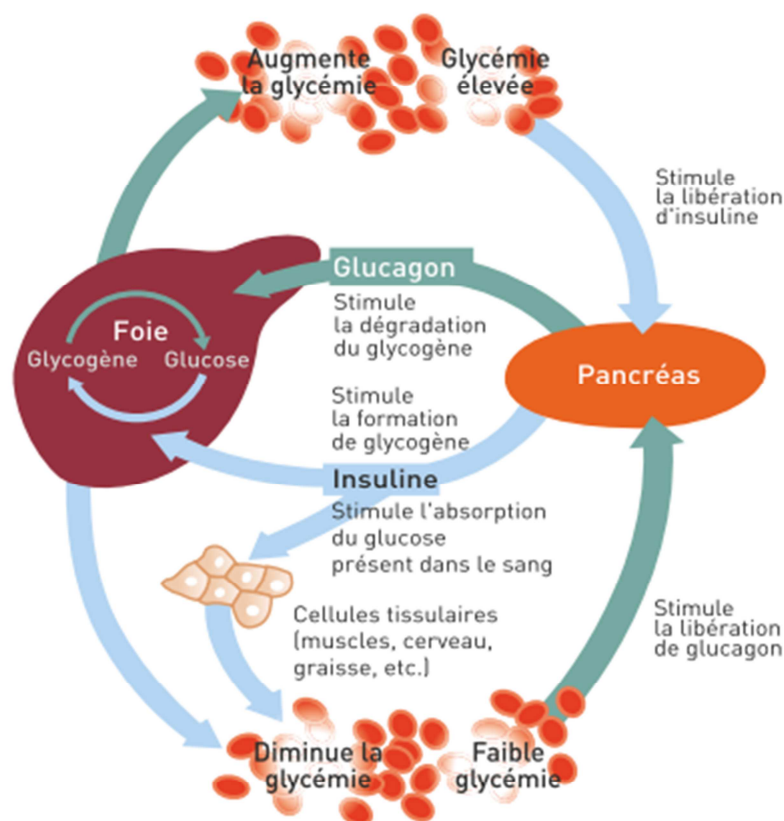


Figure 1 Les effets de l'insuline et du glucagon permettant l'homéostasie glucidique (Unwin et International Diabetes Federation, 2011)

En cas de glycémie élevée, les cellules β situées dans les îlots de Langerhans pancréatiques, sécrètent de l'**insuline**.

Une fois que le glucose rentre dans la cellule β via le transporteur membranaire insulino-indépendant GLUT2, le glucose va modifier le rapport ATP /ADP de la cellule. La proportion élevée d'ATP va induire la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants en conduisant au blocage de l'efflux des ions K^+ et par conséquent à la dépolarisation de la cellule.

Cette dépolarisation est la cause de l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants qui conduit à une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. Cette hausse de la concentration de calcium est le facteur qui déclenche l'exocytose de l'insuline et son arrivée dans la circulation systémique. L'insuline va exercer ses effets hypoglycémiants par induction de la capture du glucose en périphérie. Les cellules musculaires vont capter le glucose pour le métaboliser alors que les cellules adipeuses vont le biotransformer en acides gras et le stocker sous forme de triglycérides (lipogenèse *de novo*). Ce même processus a aussi lieu dans le foie. En parallèle, l'insuline stimule l'action de la lipase lipoprotéique, conduisant à la diminution des triglycérides dans la circulation sanguine (Vander, 2001).

L'organisme à jeun utilise des stocks du glucose sous forme du glycogène hépatique. L'insuline agit sur les cellules hépatiques, induit la conversion du glucose en glycogène et inhibe la libération du glucose à partir de ce glycogène. De plus, l'insuline inhibe la néoglucogenèse, à l'origine de la formation du glucose à partir des autres nutriments comme les acides aminés (Vander, 2001).

Le glucagon est synthétisé et sécrété par les cellules α du pancréas. Le proglucagon, précurseur du glucagon formé de 160 acides aminés, est clivé par la convertase prohormonale PC-2 afin de générer le glucagon. Dès que les taux glycémiques baissent, le glucagon est libéré par les cellules α dans la circulation systémique. Le mécanisme de sécrétion du glucagon n'est pas encore élucidé (WattsetSherman 2014), principalement à cause de nombre limité des cellules α pancréatiques (Quesada et al., 2008).

Le glucagon exerce les effets contraires de l'insuline. En effet, tandis que l'insuline s'active aux conditions postprandiales, le glucagon prend le relais quand l'organisme est à jeun. Ses effets biologiques visent majoritairement le foie, en favorisant la libération du glucose par glycogénolyse et néoglucogenèse (Vander, 2001).

1.1. Le diabète

Le déséquilibre entre les actions hypoglycémiantes de l'insuline et les effets contraires hyperglycémiant du glucagon, perturbe l'homéostasie glucidique et peut déclencher des effets néfastes pour l'organisme. Hormis des cas particuliers comme l'insulinome, correspondant à une tumeur pancréatique langerhansienne, cet équilibre est perturbé chez les patients diabétiques.

Le diabète se définit comme l'ensemble de perturbations métaboliques ayant l'hyperglycémie comme manifestation commune (Harlev et al. 2013). Le terme provient du grec « Διαβάνω » signifiant *traverser*. L'étymologie du terme diabète est en effet fondée sur l'observation de la polyurie (urines anormalement abondantes) et polydipsie (soif excessive) des patients diabétiques dont le corps paraissait être « traversé par l'eau ». Hormis ces symptômes de polyurie et polydipsie, le diabète est caractérisé également par des douleurs musculaires et notamment par une hyperglycémie qui, lorsque le seuil de la filtration rénale est dépassé, conduit à l'excrétion du glucose dans l'urine. Ces symptômes ont été décrits dans l'Égypte ancienne, il y a environ 3 500 ans, et ont déjà été mentionnés dans le papyrus d'Ebers. Ils ont également été observés par les Grecs anciens, comme le médecin Arétée de Cappadoce, ainsi que par Galien. Le lien entre le diabète et un dysfonctionnement du pancréas a été fait à Strasbourg par Oskar Von Minkowski en 1889 : son assistant avait en effet constaté que les urines des chiens, suite à une pancréatome, attiraient les mouches à cause de leur teneur élevée en glucose (Luft, 1989). C'est ainsi que la communauté scientifique se rendit compte que le pancréas est impliqué dans la survenue du diabète. L'hormone impliquée a été nommée insuline en raison de sa localisation histologique au niveau des îlots de Langerhans (« *insulae* ») du pancréas. Elle a été isolée à partir d'extraits pancréatiques en 1921 par des chercheurs canadiens : Banting, Best, Collip et Mac Leod. Le premier patient diabétique traité en 1922 avec de l'insuline a été un adolescent de 14 ans (Lefèbre, 2005).

Le diabète se caractérise ainsi par une production insuffisante d'insuline ou par son inefficacité pour réguler la glycémie. En fonction du mode d'implication de cette hormone, la pathologie est classiquement divisée majoritairement en deux catégories : le diabète de type 1 et le diabète de type 2.

1.1.1. Le diabète de type 1

Le diabète de type 1, appelé également **diabète insulino-dépendant**, est caractérisé par une carence en insuline. Des facteurs environnementaux peuvent déclencher des mécanismes auto-immuns chez des individus génétiquement prédisposés, en conduisant à la perte progressive de cellules β pancréatiques. L'étiologie du diabète insulino-dépendant n'est pas encore complètement élucidée, car il implique un grand nombre de gènes qui interagissent avec des facteurs environnementaux. Ces facteurs, qui peuvent déclencher la destruction auto-immune des cellules β pancréatiques, sont nombreux : l'exposition à des virus, même *in utero*, les infections périnatales en général, la consommation de nitrites et nitrates présents dans des aliments comme conservateurs, l'absorption de macrolides comme la bafilomycine A1 produite par des souches de *Streptomyces* spp. Certaines espèces du genre *Streptomyces* sont en effet capables de synthétiser la streptozotocine, un composé utilisé dans des modèles *in vivo* pour simuler le diabète auto-immun (Santos et al., 2012). Zimmet et son équipe ont même postulé que la présence de *Streptomyces* à la surface de légumes (comme la

pomme de terre et la betterave) pourrait induire un risque supplémentaire pour les consommateurs de développer un diabète de type 1 (Zimmet, 2001).

Le diabète de type 1 est la maladie endocrinienne la plus fréquente et la forme prédominante de diabète chez les enfants. Son apparition est soudaine et se manifeste par des symptômes tels que :

- Polydipsie et sécheresse buccale
- Polyurie
- Fatigue extrême
- Faim constante
- Perte de poids soudaine
- Cicatrisation lente des plaies
- Infections récurrentes
- Vision trouble

Les diabétiques de type 1 peuvent mener une vie normale grâce à l'administration sous-cutanée d'insuline à condition qu'ils aient un suivi médical étroit, qu'ils suivent une alimentation saine et qu'ils exercent une activité physique régulière (Unwinet International Diabetes Federation, 2011).

1.1.2. Le diabète de type 2

Le diabète de type 2 est la forme la plus répandue de la maladie (92 % des cas de diabète), avec 2,2 millions de patients diabétiques de type 2 en France métropolitaine (InVS, 2009). Contrairement au diabète de type 1, l'organisme des personnes atteintes de diabète de type 2 est capable de produire de l'insuline. Néanmoins, la quantité produite n'est pas suffisante pour baisser leur glycémie. Ceci est dû soit à une **insulinorésistance**, voire une réactivité diminuée de l'organisme envers les actions hypoglycémiantes de l'insuline, soit à une dégradation progressive des cellules sécrétrices β pancréatiques. L'évolution de la maladie commence par un état pré-diabétique, dit intolérance au glucose, laquelle conduit à l'insulinorésistance qui, à son tour, évolue vers un diabète de type 2.

Cette maladie métabolique concerne majoritairement les adultes, mais de plus en plus d'enfants et d'adolescents sont touchés par le diabète de type 2. Généralement, le diagnostic est établi une fois que les complications du diabète apparaissent, et ce de manière irréversible.

Même si le mécanisme de développement du diabète de type 2 n'est pas totalement élucidé, la FID a répertorié un certain nombre de facteurs de risques : une surcharge pondérale, une alimentation déséquilibrée, un âge avancé, un historique familial de diabète, un contexte ethnique et une exposition *in utero* à des taux glycémiques élevés de la mère (Unwinet International Diabetes Federation, 2011).

Le diabète de type 2 coexiste souvent avec d'autres pathologies comme l'obésité, l'hyperlipidémie et l'hypertension artérielle, l'ensemble étant désigné « syndrome métabolique ».

1.1.3. Le syndrome métabolique

Le syndrome métabolique, aussi connu sous les termes de « syndrome X », « syndrome d'insulinorésistance », ou « quartet mortel », a été décrit dans les années 20 par le médecin suédois Kylin qui tenta de corréler l'hyperglycémie, l'hypertension et la goutte. En 1947, Vague a associé l'obésité viscérale avec le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires (Eckel, 2005). Le syndrome métabolique englobe les facteurs de risque les plus dangereux susceptibles d'induire un infarctus : le diabète et l'état pré-diabétique, l'obésité abdominale, l'hypercholestérolémie et l'hypertension artérielle. Les critères de définition varient selon les organismes de santé, (Alberti, 2006), ceux de la FID étant jusqu'à présent la référence (**Tableau 1**)

Tableau 1 Critères du syndrome métabolique d'après la FID.

Le syndrome métabolique est défini par une Obésité centrale plus deux des facteurs de risque suivants :	
Triglycérides élevés	≥ 150 mg/dM Ou traitement spécifique pour ce trouble lipidique
Cholestérol HDL réduit	< 40 mg/dL ♂ < 50 mg/dL ♀ Ou traitement spécifique pour ce trouble lipidique
Hypertension	Pression systolique ≥ 130 ou diastolique ≥ 85 mmHg Ou traitement d'hypertension
Glycémie élevée à jeun	≥ 100 mg/dL Ou diabète diagnostiqué au préalable

L'obésité centrale peut être considérée en cas d'indice de masse corporelle (IMC) supérieur ou égal à 30 kg/m². La circonférence de la ceinture doit être comparée avec les valeurs spécifiques, en fonction du groupe ethnique.

Le syndrome métabolique est aujourd'hui considéré comme une épidémie qui a démarré avec la transition des sociétés de la vie rurale à la vie urbaine sédentaire. Ainsi, grâce à l'électricité, les heures de veille ont été prolongées alors que celles du sommeil ont été réduites en prolongeant le temps pour accéder à une abondance de calories. L'organisme humain étant génétiquement programmé depuis l'époque paléolithique des chasseurs-cueilleurs, doit affronter d'importants apports caloriques mais aussi la diminution des dépenses d'énergie, due au manque d'activité physique. Le génotype promeut le stockage des acides gras dans le cas d'une alimentation trop abondante. Avec la sédentarité de la vie urbaine, l'accumulation du gras viscéral s'avère inévitable (Bonnet et Lavile, 2005; Zimmet, 2001).

Un exemple caractéristique du syndrome métabolique a été observé chez le rat du sable *Psammomys obesus*. Une fois éloigné de son habitat naturel, caractérisé par des apports alimentaires limités, puis nourri en captivité avec une alimentation riche en calories, cette espèce développe tous les symptômes du syndrome métabolique, y compris le diabète et l'obésité. Des études anthropologiques ont réalisé les mêmes observations chez l'homme. Fraser et son équipe ont ainsi démontré la hausse de morbidité et de mortalité chez les bédouins israéliens, suite à la substitution d'une alimentation traditionnelle à un régime occidental (Fraser, 2001).

Le point commun des différentes manifestations du syndrome métabolique est l'insulinorésistance.

1.1.4. L'insulinorésistance

La survie d'un organisme dépend de sa capacité à lutter contre les infections et à stocker de l'énergie en cas de faible apport énergétique, voire de besoin énergétique élevé. Probablement en raison de ce constat, les systèmes métabolique et immunitaire ont évolué en étant complémentaires et capables de se réguler mutuellement, tout en partageant des voies physiologiques communes de signalisation. Historiquement, il a été constaté de manière claire que des périodes de restriction alimentaire (famines, périodes de disette ou de jeun prolongé) conduisent à l'inefficacité du système immunitaire et par conséquent à la susceptibilité de l'organisme envers les infections.

De nos jours, nous sommes confrontés à une situation inverse en raison des comportements alimentaires inadaptés aux réels besoins de l'organisme : une surcharge alimentaire conduit au surdéveloppement du tissu adipeux, induit la sur-activation du système immunitaire et entraîne par conséquent des conditions pro-inflammatoires chroniques (Wellen et Hotamisligil, 2005).

Le premier lien entre l'inflammation et les maladies métaboliques a été observé en 1993 : le tissu adipeux surexprime la cytokine inflammatoire **TNF- α** (*Tumor necrosis factor α*), laquelle induit l'insulinorésistance (Hotamisligil, 1993). Le TNF- α ainsi que des taux élevés en acides gras libres stimulent la phosphorylation inhibitrice du récepteur de l'insuline IRS-1 en bloquant sa cascade de signalisation. Des études transcriptomiques ont démontré que les gènes qui répondent au stress et à l'inflammation sont très bien régulés dans les tissus adipeux des animaux obèses (Weisberg et al., 2003). Hormis la cytokine TNF- α , d'autres facteurs d'inflammation sont impliqués, notamment des interleukines dont l'expression augmente en cas d'obésité (Wellen et Hotamisligil, 2005).

La surcharge des cellules avec des nutriments engendre un stress au niveau du réticulum endoplasmique. De plus, l'expansion des cellules adipeuses empêche leur irrigation sanguine en créant des phénomènes d'hypoxie locale, dite micro-hypoxie, qui conduit à l'activation des voies de signalisation inflammatoire JNK (*c-Jun NH2-terminal kinase*) /AP1 (*Activator protein 1*) et IKK/NF-kappa B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Lors de cet état inflammatoire, des macrophages M2 se déplacent vers le tissu adipeux et aggravent l'inflammation en sécrétant eux-mêmes des cytokines inflammatoires (Schenk, 2008).

Le lien entre le surdéveloppement du tissu adipeux et l'inflammation est donc bien établi. La preuve que cet état inflammatoire conduit à une insulinorésistance a été faite en utilisant un modèle *in vivo* faisant appel à des souris obèses TNF- α , JNK et IKK « knock-out » : malgré une alimentation riche en lipides, ces souris ne développent pas d'insulinorésistance (Arkan et al., 2005; Solinas et al., 2007).

Faute de réponse de l'organisme à l'action de l'insuline, les cellules β du pancréas vont s'adapter en sécrétant plus d'insuline. Néanmoins, il s'avère qu'une insulinorésistance chronique, une augmentation d'apport d'acides gras oxydés et une prédisposition génétique peuvent conduire les cellules β pancréatiques à un état pré-apoptotique. La perte de masse en cellules β va être décisive pour passer de l'étape d'insulinorésistance (pré-diabète) à la manifestation clinique du diabète (Schwanstecher, 2011).

1.1.5. Complications cliniques du diabète de type 2

Selon la FID, dans la plupart des pays développés le diabète figure comme l'une des premières causes de maladies cardiovasculaires, de cécité, d'insuffisance rénale voire d'amputation des membres inférieurs (Unwin et International Diabetes Federation, 2011).

Comme déjà précisé, le diabète est caractérisé par une hyperglycémie, une hyperinsulinémie combinée avec une insulino-résistance et un état inflammatoire chronique. L'impact de ces pathologies concerne tout l'organisme et notamment le système circulatoire (**Tableau 2**).

En effet, la plupart des complications du diabète sont liées à ses effets délétères sur les vaisseaux sanguins principaux (macro-angiopathie) ou les artérioles périphériques (micro-angiopathie). L'exposition chronique des vaisseaux à une glycémie élevée favorise leur rigidification. De plus, l'hyperglycémie entraîne des modifications de la membrane endothéliale en conduisant au dysfonctionnement des cellules endothéliales suite à la modification de leur porosité (Schlienger, 2013).

Tableau 2 Etiologie des complications principales du diabète type 2 (Schlienger 2013)

Complications	Micro-angiopathie	Macro-angiopathie	Mixte
Rétinopathie	+++		
Néphropathie	++	++	+++
Neuropathie	++		
Coronaropathie	(+)	+++	
Insuffisance cardiaque	+	+++	+
Accident vasculaire cérébral		++	
Artériopathies périphériques	++	++	+
Troubles trophiques	++	++	+++

Concernant le système cardiovasculaire, le diabète peut induire des lésions coronaires et entraîner une **cardiopathie ischémique**. En parallèle, lors de situations d'hyper-insulinémie, l'insuline ayant un caractère de facteur de croissance, génère une hypertrophie des cellules du muscle lisse cardiaque. Cette hyperplasie du tissu cardiaque conduit à une insuffisance cardiaque caractéristique chez les patients diabétiques, due à une dysfonction diastolique.

L'irrigation du cerveau est aussi touchée par les effets néfastes du diabète au niveau circulatoire. Le risque d'un **accident vasculaire cérébral** (AVC) est multiplié par un facteur de 2 à 5 chez les diabétiques. Les AVC chez les diabétiques entraînent un risque élevé de mortalité, voire un handicap résiduel étant donné la nature ischémique de l'accident.

La **macro-angiopathie** qui caractérise le plus la pathologie diabétique, correspond au « mal performant plantaire », appelé également « pied diabétique ». Les traumatismes fréquents du pied, associés aux troubles de circulation sanguine, conduisent à des troubles trophiques et à des ulcérations au niveau du pied. Cette pathologie aboutit, dans les cas extrêmes mais de manière malheureusement assez fréquente, à l'amputation des membres inférieurs.

Les **micro-angiopathies** comprennent la rétinopathie et ses complications (hémorragie du vitré, décollement rétinien, glaucome, cécité) qui touche 50 % des patients diabétiques de type 2. Elles

entraînent également la néphropathie diabétique, première cause d'insuffisance rénale chronique terminale, ainsi que plusieurs types de neuropathies diabétiques : paresthésies, troubles moteurs, neuropathies douloureuses, neuropathie du système nerveux autonome (Schlienger, 2013).

Le patient diabétique est aussi très susceptible aux infections dans la mesure où la stimulation chronique de son système immunitaire peut aboutir à la perturbation des systèmes de défense de l'organisme.

Enfin, étant donné la complexité de la maladie, le diabète peut être associé à des pathologies non considérées comme des complications : stéatohépatite non alcoolique, affections buccodentaires, syndrome d'apnée du sommeil, déclin cognitif, dépression ainsi que certains types de cancer (du système digestif, du foie, du pancréas, du sein et de l'endomètre) (Schlienger, 2013).

1.2. Les traitements antidiabétiques

Compte tenu de la complexité de la maladie, il est indispensable qu'un traitement antidiabétique soit global et comprenne plusieurs approches thérapeutiques. Les injections d'insuline pour lutter contre l'hyperglycémie ne sont pas proposées en première intention. On peut faire appel à des principes actifs capables de stimuler la sécrétion de l'insuline (sulfonylurées, glinides), de sensibiliser les cellules de l'organisme à l'insuline (thiazolidinediones), d'inhiber la production hépatique du glucose (metformine) et de ralentir l'absorption intestinale des sucres. A partir de 2006, d'autres composés dits « incrétinomimétiques » ont rejoint l'arsenal thérapeutique à visée antidiabétique.

1.2.1. Les antidiabétiques oraux

1.2.1.i. Insulino-sensibilisants

► La metformine

La metformine fait partie de la classe des **biguanides** impliqués dans le traitement du diabète. Cette classe de molécules a été découverte grâce aux propriétés hypoglycémiantes de la galépine, un alcaloïde isolé de l'alfalfa galéga (*Galega officinalis* L., Fabaceae). Déjà au Moyen-Âge, cette petite herbacée était utilisée pour ses propriétés antidiabétiques malgré sa relative toxicité liée à la présence d'analogues naturels de la guanidine. L'isolement de la galépine et les essais *in vivo* de son dérivé sulfaté sont à l'origine de l'utilisation des biguanides en cas d'hyperglycémie (Bailey, 2007). Les optimisations structurales pour améliorer l'effet hypoglycémiant et réduire la toxicité du composé naturel ont conduit à la découverte de la phenformine, de la buformine et de la metformine (**Figure 2**). A cause du risque élevé de provoquer une acidose lactique, la buformine et la phenformine ont été retirées du marché pharmaceutique dans la plupart de pays.

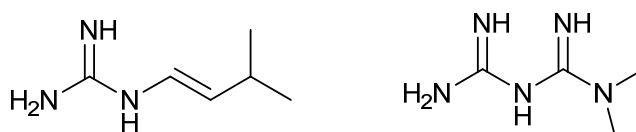


Figure 2 Structures de la galépine (à gauche) et de la metformine (à droite)

La metformine constitue le médicament antidiabétique de première intention car elle est capable de réduire les taux de HbA_{1c} de 1,5% (Nathan, 2006). Son action principale consiste en l'inhibition de la production hépatique du glucose. Parallèlement, elle sensibilise le tissu musculaire à l'insuline en augmentant la capture du glucose et elle favorise son stockage sous forme de glycogène musculaire. De plus, elle inhibe la production des ROS (dérivés réactifs de l'oxygène), la production des VLDL (lipoprotéines de très faible densité) et l'expression des facteurs inflammatoires. L'ensemble de ces effets peut contribuer à la lutte contre le syndrome métabolique qui souvent englobe le diabète de type 2 (Schwanstecher, 2011; Tielmans et al., 2007; Bailey, 2007).

Malheureusement, l'efficacité et le faible coût de la metformine ne dispensent pas d'effets secondaires touchant le système gastro-intestinal (diarrhées fréquentes, nausées, vomissements, douleurs abdominales). Des rares cas d'acidose lactique sont également à signaler.

► Les glitazones

Les glitazones ou thiazolidinediones sont des **agonistes PPAR γ** (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ*). Ce récepteur est principalement exprimé au niveau du tissu adipeux mais s'exprime aussi dans les tissus hépatique, musculaire, cardiaque ainsi que chez les macrophages. Son activation entraîne la différenciation des cellules adipeuses qui diminue la libération des acides gras libres dans la circulation. L'administration de glitazones entraîne une prise de poids. Toutefois, la taille moyenne des cellules adipeuses est réduite et la proportion du tissu adipeux viscéral est diminuée pour favoriser les dépôts de tissu adipeux sous-cutané. Cet effet est bénéfique pour le diabète dans la mesure où le tissu adipeux viscéral est en contact avec la circulation sanguine splanchnique.

De plus, les glitazones limitent l'expression de cytokines inflammatoires et inhibent l'insulinorésistance des tissus hépatique, musculaire et adipeux (Nathan, 2006; Schwanstecher, 2011; Tielmans et al., 2007). La sensibilisation des tissus par les glitazones concerne l'insuline endogène mais aussi l'insuline administrée par voie sous-cutanée. Les glitazones qui existent sur le marché pharmaceutique sont la rosiglitazone et la pioglitazone, toutes deux capables de diminuer les taux de HbA_{1c} de 1%. Seule la pioglitazone existe dans le marché pharmaceutique européen. En général, hormis leur coût élevé, elles sont bien tolérées par le patient. Cependant, elles induisent une rétention d'eau pouvant créer des œdèmes, menaçant les patients souffrant d'insuffisance cardiaque ou pulmonaire. En France, l'autorisation de mise sur le marché de la Pioglitazone a été retirée à cause de risques de développement de cancer de la vessie (ANSM, 2011).

1.2.2. Les sécrétagogues d'insuline

► Les sulfonylurées

La première sulfonylurée antidiabétique a été découverte en 1942, et ce de manière fortuite lors du développement d'antibactériens destinés à lutter contre la fièvre typhoïde. L'agent 2254RP a en effet induit des comas par hypoglycémie aux patients ayant testé ce composé. Cette observation a ensuite été confirmée avec des études supplémentaires menées *in vivo* (Decourt, 1985).

« L'action hypoglycémiante fut retrouvée chez l'animal ... mais la question primordiale était maintenant: peut-elle agir dans le diabète? et, dans ce cas, dans quel type de diabète? Pouvait-on espérer trouver aussi une action hypoglycémiante dans des corps plus ou moins voisins chimiquement du 2254 ? » (Decourt, 1985)

La recherche pharmaceutique basée sur cette observation a apporté une réponse à ces différentes questions : en synthétisant des structures proches du 2254RP, il a été démontré que les sulfonylurées se fixent sur des canaux potassium ATP-dépendants des cellules β du pancréas, dépolarisent la membrane cellulaire et induisent la sécrétion de l'insuline médiée par un flux intracellulaire de calcium.

Le profil de toxicité de la première génération des sulfonylurées (carbutamide, tolazamide, tolbutamide) a été amélioré dans les sulfonylurées de deuxième génération (glibenclamide, gliclazide, glipizide, glibornuride). Les sulfonylurées de troisième génération ont ensuite été commercialisés, et présentent une durée d'action prolongée (glimepiride, gliclazide, glipizide). Ces sulfonylurées peuvent diminuer les taux de HbA_{1c} de 1 à 2 %.

Les modifications structurales ont beaucoup amélioré le profil de sécurité des sulfonylurées, mais le risque d'une hypoglycémie est toujours présent. Des effets indésirables touchant le métabolisme (prise de poids), le foie (ictère, hépatite), la peau (prurit, urticaire, érythèmes) et le sang (hyponatrémie, thrombopénie, agranulocytose, leucopénie ou anémie) peuvent se manifester lors de l'administration des sulfonylurées (Nathan, 2006; Tielmans et al., 2007).

► Les glinides

Les glinides (repaglinide, nateglinide, mitiglinide) sont des analogues de l'acide benzoïque dont l'action pharmacologique est semblable à celle des sulfonylurées, ciblant des canaux potassium, mais différents de ceux des sulfonylurées. Ils sont capables d'induire l'exocytose de l'insuline des cellules β pancréatiques.(Nathan, 2006). Les risques qu'ils induisent une hypoglycémie sont réduits par rapport aux sulfonylurées. Néanmoins, le risque d'une crise d'hypoglycémie et de prise de poids est toujours existant (Harrigan, 2001).

1.2.3. Inhibiteurs d'alpha-glucosidase

Suite à une prise alimentaire, les polysaccharides sont clivés pour former des oligosaccharides puis des disaccharides puis des monosaccharides qui seront capables à franchir la barrière intestinale et d'atteindre la circulation sanguine. Les inhibiteurs d' α -glucosidase empêchent la dégradation des polysaccharides en monosaccharides absorbables (Harrigan, 2001). Ainsi, les polysaccharides suivent le transit intestinal en terminant soit fermentés par la flore microbienne intestinale, soit excrétés dans les selles. Plusieurs espèces végétales peuvent inhiber cette dégradation et la plupart d'entre elles se trouvent dans l'alimentation : l'orange, la mangue, l'aubergine, la framboise, la mûre blanche, le cumin et le gingembre (Ali Asgar, 2013; Ezuruike et Prieto, 2014). En 1990, Bayer a lancé

sur le marché pharmaceutique l'**acarbose**, un pseudotétrасaccharide isolé de souches du taxon *Actinoplanes*, qui exerce une inhibition compétitive et réversible de l' α -glucosidase intestinale (Grabley et Thiericke, 1999).

Le **miglitol** est un produit héli-synthétique de nature monosaccharidique qui agit comme l'acarbose. Tandis que l'absorption systémique de l'acarbose est limitée, le miglitol est absorbé et présente des effets systémiques non encore élucidés à ce jour. Les inhibiteurs d' α -glucosidase arrivent à diminuer les taux HbA_{1c} de 0,2 à 1% en monothérapie et jusqu'à 2% dans le cas de co-administration avec de la metformine ou des insulino-sécrétagogues (Tielmans, Virally, et al. 2007). Ils n'affectent pas le poids du patient mais induisent des effets secondaires touchant le système gastro-intestinal (flatulence, météorisme, diarrhée et douleurs abdominales).

1.2.4. Inhibiteurs de SGLT2

Sur la base de l'effet inhibiteur sur les canaux de transport du glucose SGLT (*Sodium-dependent glucose co-transporter*) par la phlorizine (**Figure 3**), une chalcone ubiquitaire dans les représentants de la famille des Rosacées, deux inhibiteurs de SGLT ont été développés et commercialisés en Europe pour le traitement du diabète de type 2 (Schwanstecher, 2011).

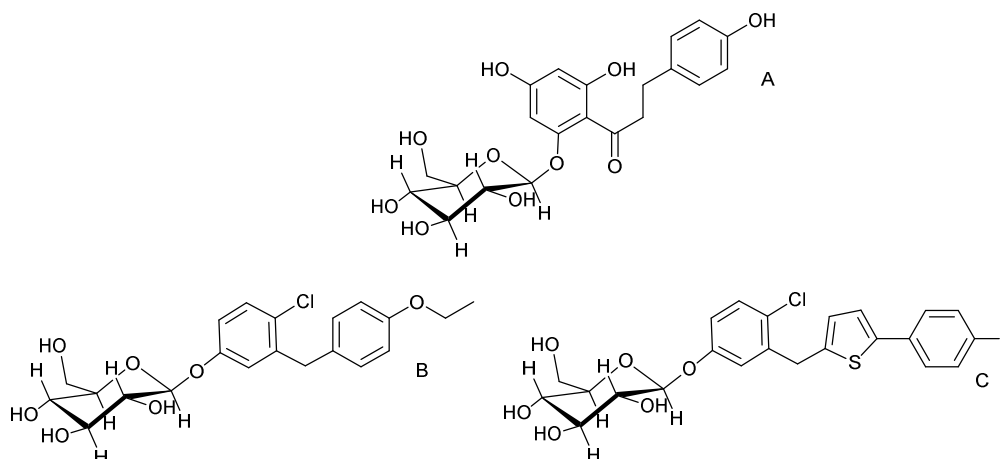


Figure 3 Structures de la phlorizine (A), la dapagliflozine (B) et la canagliflozine (C)

La dapagliflozine (EMA 2012) et la canagliflozine (EMA 2013) (**Figure 3**) sont des inhibiteurs du SGLT2 (*SGLT subtype 2*), responsable pour 90 % de la ré-absorption rénale du glucose. Cette inhibition déclenche l'augmentation de l'excrétion rénale du glucose qui peut entraîner la baisse de la HbA_{1c} de 0,9 %. De plus, les inhibiteurs du SGLT2 exercent des effets bénéfiques en cas d'hypertension et de surcharge pondérale (Cefalu et Riddle, 2015).

Les effets indésirables de ce traitement consistent en des crises d'hypoglycémie à jeun, une polyurie (quantité excessive d'urine), une pollakiurie (fréquence excessive d'urination) et des infections des voies urinaires. Cette approche thérapeutique est prometteuse mais compte tenu de l'absence de recul, il faudra attendre l'évaluation complète de son profil d'efficacité et de sécurité (Cefalu et Riddle, 2015).

1.2.5. L'administration de l'insuline

Les diabétiques de type 1 (insulino-dépendants) ainsi que les cas aggravés de diabète de type 2 nécessitent l'administration d'insuline exogène. Les diabétiques sont dits **insulino-requérants** lorsqu'ils nécessitent ponctuellement des injections d'insuline, contrairement aux diabétiques **insulinodépendants** qui, quant à eux, doivent bénéficier de ce traitement à vie. Les premières préparations d'insuline étaient extraites de pancréas bovin ou porcin. Aujourd'hui, grâce aux progrès scientifiques apportés notamment par le génie génétique, les patients peuvent bénéficier d'insuline humaine produite par biotechnologie. L'insuline étant un peptide, elle se dégrade en contact avec les fluides gastriques ; par conséquent, son administration ne peut se faire que par voie injectable. Il y a plusieurs types d'insuline qui se caractérisent par la rapidité et la durée de leur action. Ils sont classés en différentes catégories : insulines rapides, très rapides, d'action intermédiaire, d'action prolongée et des mélanges. Les schémas de traitement insulinaire sont nombreux mais en général ils sont caractérisés par l'administration d'une insuline d'action rapide pour régler l'hyperglycémie postprandiale et d'une insuline d'action lente pour réguler l'hyperglycémie à jeun (Battu, 2013).

Les risques liés à l'administration d'insuline sont notamment l'induction d'une hypoglycémie, des réactions allergiques au site d'injection, une hypokaliémie ainsi que l'induction de phénomènes d'insulinorésistance (Howland 2006). Malgré les nouvelles formes injectables (stylos pré-remplis, pompes à insuline), l'administration d'insuline reste très contraignante au quotidien pour un patient diabétique.

1.2.6. Schémas thérapeutiques antidiabétiques

Le contrôle glycémique se hisse au rang de priorité des traitements antidiabétiques. Pour mesurer la glycémie au cours du temps, l'**indice de l'hémoglobine glucosylée** HbA_{1c} est utilisé. L'association américaine du diabète considère que la HbA_{1c} doit être diminuée de 7 %, la glycémie optimale étant près de la normale ($HbA_{1c} < 6 \%$). L'association européenne de l'étude du diabète (EASD) recommande des taux inférieurs à 7 % et dans le schéma thérapeutique proposé, les nouvelles classes d'antidiabétiques, comme celle des incrétinomimétiques (voir 1.4 page 22), sont omises pour des raisons de coût et d'efficacité limitée (Nathan 2006). Le consensus entre l'association américaine des endocrinologues cliniques (AACE) et le collège américain d'endocrinologie (ACE) a permis l'édition d'un schéma de traitement plus complet (**Figure 4**) qui ne comprend pas les sulfonylurées à cause du risque d'hypoglycémie qu'elles peuvent provoquer (Schwanstecher, 2011).

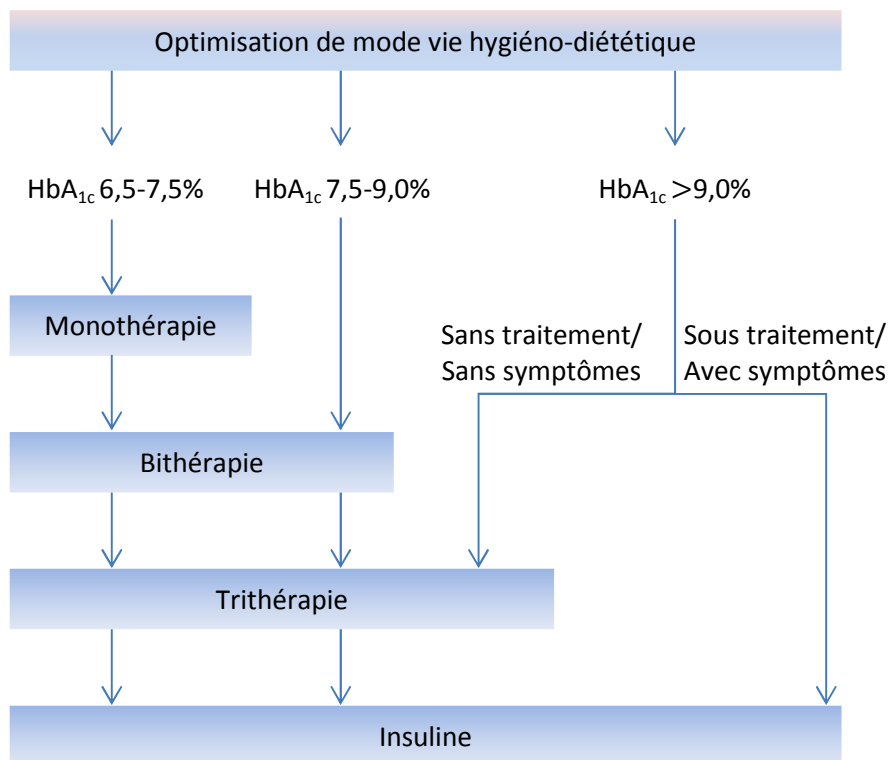


Figure 4 Schéma de traitement antidiabétique d'après l'AACE et l'ACE (Schwanstecher, 2001)

Concernant les optimisations du mode de vie hygiéno-diététiques, il a été constaté que la perte de 4 kg de masse corporelle présente une multitude d'effets bénéfiques et peut, notamment, constituer l'approche la plus efficace et qui plus est sans risque pour la gestion du diabète (Schwanstecher 2011). Même pour les personnes dans un état pré-diabétique et qui n'ont pas encore de troubles métaboliques, le suivi d'une alimentation équilibrée peut influencer positivement l'évolution de la maladie. Néanmoins, tous les patients n'arrivent pas à atteindre ce but, ce qui implique la mise en place sans tarder de traitements adaptés.

La **metformine** est le médicament de première intention qui existe dans tous les schémas (mono-, bi- et trithérapie) de traitement proposés dans le schéma thérapeutique de AACE/ACE (**Figure 4**). Les **thiazolidinediones** sont indiquées en monothérapie dans le cadre du syndrome métabolique et les **incrétinomimétiques** (voir 1.4 page 22) chez les patients qui présentent une glycémie postprandiale trop élevée.

Si la fraction HbA_{1c} est comprise entre 7,5 et 9,0 % et si la monothérapie n'est pas efficace, la bithérapie sera conseillée. Celle-ci consiste en différentes combinaisons : metformine plus incrétinomimétique (combinaison la plus courante), metformine plus thiazolidinedione ou encore thiazolidinedione plus incrétinomimétique.

Dans le cas où la fraction HbA_{1c} est supérieure à 9 %, l'ACEE conseille l'application de la trithérapie qui comprend l'association de la metformine, d'une thiazolidinedione et d'un incrétinomimétique.

Si aucun de ces schémas thérapeutiques ne parvient à baisser les taux de HbA_{1c}, l'insulinothérapie est suggérée dans des conditions qui dépendront des manifestations cliniques du diabète et du traitement déjà appliqué *a posteriori*.

1.3. L'effet incrétine

En 1932, le terme « incrétine » est introduit pour décrire la substance extraite de l'intestin et capable de stimuler la sécrétion endocrinienne pancréatique et d'induire un effet hypoglycémiant (Fehmann et Göke, 1997). Il a fallu 32 ans pour qu'une équipe de chercheurs, lors d'essais de compréhension des mécanismes de l'homéostasie glucidique, compare la réponse du pancréas suite à l'administration du glucose par voie orale et par voie intraveineuse (IV) (Elrick et al., 1964). Cette étude a démontré que l'augmentation de la concentration plasmatique du glucose n'est pas le seul facteur responsable de la sécrétion d'insuline. Pendant cette expérience, la glycémie était équivalente entre les groupes d'individus ayant bénéficié de glucose par voie orale ou par voie IV, alors que la concentration plasmatique d'insuline était significativement plus élevée dans le cas d'une administration de glucose par voie orale (**Figure 5**).

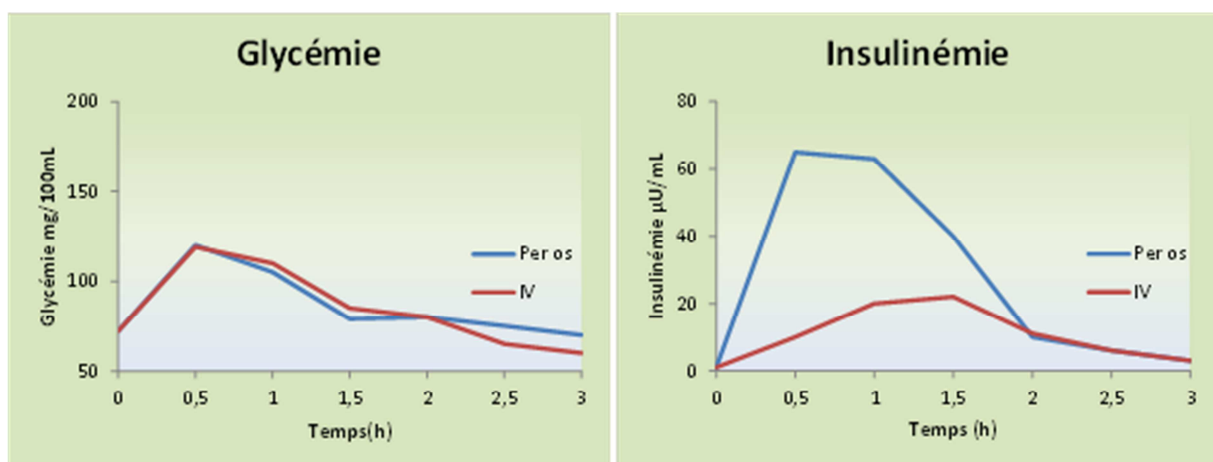


Figure 5 Comparaison de la glycémie et de l'insulinémie suite à l'administration du glucose par voie orale (per os) et intraveineuse (IV). Adapté de Perley et Kipnis, 1967

Cette amplification de l'insulinosécrétion après l'administration du glucose par voie orale est liée à l'activité de deux hormones, le *glucagon-like peptide-1* (**GLP-1**) et le *gastric inhibitory polypeptide* ou *glucose dependent insulintropic polypeptide* (**GIP**). Ces hormones peptidiques, dites incrétines, sont sécrétées par l'intestin suite au contact avec le glucose et autres nutriments dans le milieu intestinal. Dans des conditions de glycémie à jeun, ces deux hormones ne peuvent pas exercer leur effet insulino-sécrétagogue. Dès que la glycémie augmente, le GLP-1 et le GIP agissent de manière équivalente. Le GLP-1 est cependant plus impliqué dans « l'effet incrétine » dans des conditions de glycémie très élevée (Vilsbøll et al., 2003).

Dans l'étude de confirmation de l'effet incrétine menée chez des individus sains et des personnes diabétiques de type 2, il a été constaté que l'amplification de l'insulino-sécrétion est inférieure chez les patients diabétiques (Perley et Kipnis, 1967). Cette observation fait ressortir l'effet incrétine comme une cible potentielle de traitements antidiabétiques.

1.3.1. Le GIP (Glucose dependent Insulinotropic Polypeptide)

Découvert en 1970, ce peptide composé de 42 acides aminés est sécrété par les cellules endocrines intestinales K du duodénum et du jéjunum (Diakogiannaki, 2012; Fehmann, 1997). Il s'agit d'un produit issu du proglucagon, suite à des modifications après sa transcription. La présence du glucose et des acides gras déclenche sa sécrétion et sa concentration maximale est atteinte 15 à 30 minutes après. Néanmoins, son temps de demi-vie est court car il est rapidement dégradé en une forme inactive par une protéase dipeptidyl-peptidase IV (**DPP4**). L'inactivation enzymatique du GIP conduit à un temps de demi-vie de 2 minutes chez le rat, de 7 minutes chez l'homme et de 5 minutes chez les patients atteints de diabète de type 2 (Deacon et al. 2000). Le récepteur du GIP (GIPR) est un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) hétérodimère, exprimé dans de nombreux organes (le pancréas, l'estomac, l'intestin, le tissu adipeux, les poumons, l'hypophyse, le cœur, les testicules, l'endothélium vasculaire, les os et le cerveau). Malgré l'amplitude de l'expression du GIPR, les effets biologiques du GIP sont restreints à l'estomac, le pancréas et le tissu adipeux. Le GIP ralentit la mobilité gastrique, augmente la biosynthèse de l'insuline et induit son exocytose par les cellules β -pancréatiques. De plus, ce peptide favorise la survie de ces cellules β en inhibant des voies de signalisation pro-apoptotiques. En dehors de son activité insulino-sécrétagogue, le GIP est impliqué dans le métabolisme des acides gras en facilitant l'incorporation des triglycérides dans les adipocytes.

Dans le cas de diabète de type 2, les taux de sécrétion de GIP sont maintenus mais les cellules β -pancréatiques semblent perdre leur sensibilité envers les effets insulino-sécrétagogues de ce peptide. Cette affirmation a été appuyée par l'absence d'augmentation de l'insulinémie chez des patients diabétiques de type 2, suite à l'administration du GIP synthétique (Nauck et al., 1993). L'incertitude pour l'utilisation du GIP comme cible pharmacologique pour lutter contre les maladies métaboliques émerge aussi de la dualité de ses effets biologiques : en effet, il exerce des effets bénéfiques pour la sécrétion de l'insuline mais, en parallèle, il favorise le développement du tissu adipeux qui conduit à des phénomènes d'insulinorésistance (Drucker, 2007).

1.3.2. Le GLP-1 (Glucagon-like-peptide 1)

Tandis que les taux de GIP postprandiaux ne sont pas significativement diminués chez les patients atteints de diabète de type 2, l'effet incrétine réduit chez ces patients pourrait être expliqué par les taux postprandiaux diminués de l'incrétine GLP-1 (**Figure 6**) (Vilsbøll et al., 2001).

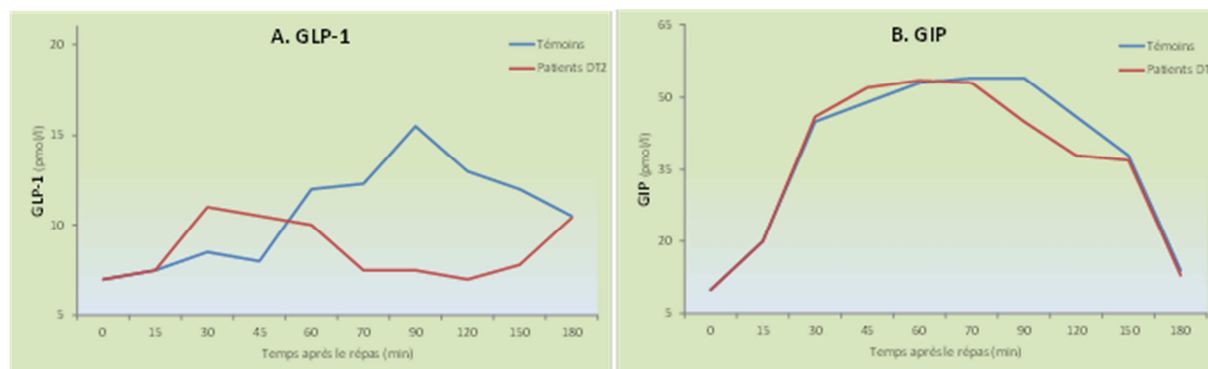


Figure 6 Cinétique du GLP-1 (A) et GIP (B) suite à un repas chez des témoins normo-glycémiques (tracé bleu) et des patients atteints de diabète de type 2 (tracé rouge). Adapté de Vilsbøll et al., 2001

Le GLP-1 a été découvert en 1987 comme un produit post-traductionnel du proglucagon dans les cellules intestinales et qui peut stimuler la sécrétion de l'insuline. Plus précisément, le GLP-1 est sécrété par les cellules endocrines intestinales L.

1.3.2.i. Biosynthèse

Contrairement aux cellules α -pancréatiques dans lesquelles le proglucagon est transformé en glucagon par la convertase prohormonale-2 (PC-2), les cellules L et certaines cellules encéphaliques transforment le proglucagon en GLP-1, GLP-2, oxymoduline et glicentine par action de la convertase pro-hormonale PC-3 (Albrechtsen et al. 2013; Rouillé, 1995). Le GLP-1 est sécrété sous deux formes équipotentes : le GLP-1(6-36) et le GLP-1(7-36). Chez l'homme, la forme prédominante est le GLP-1(7-36) (Pabreja et al., 2014; Rouillé, 1995).

1.3.2.ii. Sécrétion

La sécrétion du GLP-1 a lieu en deux étapes, la première après 15 minutes et la deuxième, qui est plus prolongée, 30 minutes après la prise alimentaire. Le niveau de GLP-1 plasmatique à jeun oscille entre 5 et 10 pM mais suite à une prise alimentaire, il atteint les 50 pM (Drucker, 2007).

Les cellules sécrétrices du GLP-1 sont les cellules L qui sont localisées tout au long du tractus intestinal mais leur population la plus dense se trouve au niveau de l'iléon distal et du côlon. Leur morphologie est de type « ouvert » car caractérisée par une surface apicale vers les microvilli intestinaux en étant en contact avec le contenu du lumen intestinal, et par une surface baso-latérale proche des vaisseaux sanguins intestinaux. Cette morphologie leur permet de libérer du GLP-1 dans la circulation systémique (Diakogiannaki, 2012). Des modèles cellulaires, comme celui utilisant la lignée cellulaire GLUTag ainsi que les cellules primaires intestinales, ont fait preuve que les cellules L ont une activité électrique (Ezcurra et al. 2013). Les stimuli des cellules L provoquent en effet une dépolarisation de la membrane cellulaire qui conduira à l'exocytose des vésicules de stockage du GLP-1. Ces stimuli consistent en divers nutriments (oligosaccharides, oligopeptides, acides gras) mais aussi en des composés non impliqués directement dans le métabolisme glucidique (Diakogiannaki, 2012; Ezcurra et al., 2013).

→^I Les glucides et notamment le **glucose** sont des stimuli puissants de la cellule L. Suite au contact de cette cellule avec le glucose, la sécrétion du GLP-1 est médiée par une voie de signalisation liée au métabolisme impliquant une hausse de l'ATP et l'ouverture des canaux K^+ -ATP dépendants, ce qui déclenche la dépolarisation de la cellule. Des voies de signalisation non liées au métabolisme glucidique sont aussi proposées. Une série d'édulcorants a pu stimuler la sécrétion *in vitro* du GLP-1 en mettant en jeu le récepteur TAS1R3, un RCPG impliqué dans la perception du goût sucré. Néanmoins, il n'existe actuellement pas de consensus sur l'implication réelle de ce récepteur car des études cliniques ont montré l'absence d'effet sécrétagogue GLP-1 par les édulcorants comme le stéviolside et le sucralose. Enfin, le co-transporteur Na^+ /glucose SGLT1 constitue la cible des glucides sécrétagogues du GLP-1 qui ne sont pas métabolisables. Des sucres qui ne sont à la fois ni métabolisables ni substrats pour le co-transporteur SGLT-1, comme c'est le cas du 2-désoxy-D-glucose et de la N-acétyl-D-glucosamine, n'arrivent pas à stimuler la sécrétion du GLP-1 (Diakogiannaki, 2012).

→^I Les **acides gras** constituent également des stimulateurs de la sécrétion du GLP-1. Les acides gras mono-insaturés semblent être les plus actifs : il a été observé que l'effet sécrétagogue du GLP-1 induit par l'huile d'olive est plus important qu'après consommation de beurre. Les récepteurs de la cellule L activés par les acides gras sont aussi des RCPGs : il s'agit des FFAR (*free fatty acid receptor*). Le récepteur GPR119 est activé par un endocannabinoïde, l'oléoyl-éthanolamide, produit du métabolisme des acides gras (Diakogiannaki, 2012). Les récepteurs FFAR2 et FFAR3 sont aussi stimulés par les acides gras de courte chaîne comme les acides acétique, propionique et butyrique. L'expression de ces récepteurs est plus importante dans les parties du gros intestin où est observée une concentration maximale de la flore bactérienne dont le métabolisme génère des acides à chaîne courte. Cette observation fait ressortir l'importance de la qualité de flore intestinale dans la sécrétion des incrétines impliquées et par conséquent dans le métabolisme glucidique (Everard et Cani, 2014).

→^I Les hydrolysats de protéines ont aussi montré une activité sécrétagogue GLP-1. Néanmoins, la taille de ces produits d'hydrolyse concernée reste inconnue. Des acides aminés, et notamment la **L-glutamine**, peuvent avoir un effet sécrétagogue du GLP-1. Cette dernière est en effet capable de stimuler la sécrétion du GLP-1 chez des individus sains et des personnes diabétiques (Ezcurra et al., 2013; Tolhurst et al., 2011). Le mécanisme pharmacologique implique des canaux spécifiques pour la L-glutamine Na^+ -dépendants (Tolhurst et al., 2011) ainsi qu'un RCPG non encore identifié (Ezcurra et al., 2013).

→^I Des composés présents dans le lumen intestinal peuvent aussi stimuler la sécrétion du GLP-1. C'est notamment le cas des **acides choliques** qui agissent sur le RCPG TGR5 (GPBAR) et de la **progestérone** qui agit par l'intermédiaire de récepteurs membranaires dont la présence a été confirmée sur la cellule L (Flock et al., 2013). Des **composés amers** peuvent aussi stimuler la sécrétion du GLP-1 en agissant sur les RCPGs de la famille du TAS2R. Le benzoate de dénatonium et la quinine, des composés considérés comme des référents d'amertume, peuvent également stimuler la sécrétion du GLP-1 *via* ces mêmes récepteurs TAS2R (Kim, 2014).

Suite à sa sécrétion, 66-75 % du GLP-1 libéré vont être inactivés par action d'une enzyme transmembranaire, la **DPP-4**) située sur les cellules endothéliales de l'intestin. Une deuxième étape d'inactivation, cette fois-ci par la DPP-4 hépatique, conduira au passage systémique de seulement 10 % de GLP-1 sécrété par les cellules L. Dans la circulation sanguine, le GLP-1 possède un temps de demi-vie très court de seulement 2-3 minutes (Albrechtsen et al., 2013; Pabreja et al., 2014).

1.3.2.iii. Le récepteur du GLP-1 (GLP-1R)

Le GLP-1R est composé de 463 acides aminés et appartient à la famille B des RCPGs qui est caractérisée par sept parties transmembranaires, une partie N-terminale longue et extracellulaire, qui porte 3 ponts disulfures et qui permet le couplage avec les ligands peptidiques endogènes, ainsi que plusieurs sites de glycosylation N-conjuguée.

Le GLP-1R est exprimé par les cellules β pancréatiques mais il est probable que son expression se fasse également par les cellules α (sécrétion du glucagon) et δ (sécrétion de somatostatine). Des études d'immunofluorescence ont confirmé la présence du GLP-1R dans les cellules β mais pas dans les autres cellules pancréatiques (Tornehave et al. 2008). Le pancréas exprime le GLP-1R dans sa partie exocrine, une observation qui peut expliquer le risque de pancréatite aiguë ou de cancer pancréatique suite à un traitement avec des agonistes GLP-1R (voir 1.4.1, page 22).

L'ARNm du GLP-1R a été détecté dans le système nerveux central, au niveau du thalamus, de l'hypothalamus et du tronc cérébral. Les récepteurs situés dans le cerveau peuvent être stimulés soit par le GLP-1 présent au niveau systémique et stimulant les parties circumventriculaires du cerveau, soit par le GLP-1 produit par les neurones encéphaliques.

Par immunocytochimie, la présence du GLP-1R a été démontrée sur les nerfs terminaux de la veine porte hépatique ainsi que sur les neurones intestinaux communiquant avec le nerf vague. D'après la littérature récente, le GLP-1R est aussi exprimé au niveau des reins et des vaisseaux sanguins pulmonaires (Pabreja et al., 2014).

Tandis que les effets du GLP-1 sur le système nerveux autonome, le tissu adipeux et les cellules hépatiques ont été prouvés, la présence du GLP-1R dans de telles localisations n'a pas encore été démontrée. Les effets biologiques sur ces tissus peuvent s'expliquer par l'implication des nerfs afférents du nerf vague ou par l'implication des récepteurs GLP-1 autres que le GLP-1R. L'existence d'autre récepteurs du GLP-1 est aussi suggérée par le déclenchement des effets biologiques de ce peptide par des agonistes partiels ou même des antagonistes GLP-1R sur certains tissus (Pabreja et al., 2014).

1.3.3. Effets biologiques du GLP-1

Le GLP-1 est responsable d'un large éventail d'effets biologiques contribuant à l'homéostasie énergétique (**Figure 7**). Tout d'abord, il stimule la sécrétion de l'insuline d'une manière glucose-dépendante en induisant sa biosynthèse et sa libération dans la circulation. Il favorise la prolifération et inhibe l'apoptose des cellules insulino-sécrétrices β du pancréas. De plus, il inhibe la sécrétion du glucagon, induit la satiété et ralentit l'absorption des nutriments en ralentissant la vidange gastrique.

Le GLP-1 augmente la sensibilité des tissus adipeux, musculaire et hépatique envers les effets hypoglycémisants de l'insuline. La néoglucogenèse hépatique est diminuée et le dépôt des acides gras au sein du tissu adipeux blanc (responsable de l'obésité dite viscérale) est réduit. Des modèles murins ont en effet montré que le GLP-1 est un stimulateur de la lipolyse (Pabreja et al., 2014).

Les reins répondent à sa présence en augmentant la clairance rénale du glucose. Les effets bénéfiques du GLP-1 ne se limitent pas à l'homéostasie glucidique mais sont complétés par des propriétés cardio-protectrices et la capacité de renforcer la mémoire ainsi que la santé osseuse (Yabe et Seino, 2013).

L'effet du GLP-1 sur les cellules β pancréatiques a été beaucoup étudié. Une fois le GLP-1R stimulé, il va activer l'adényl-cyclase qui va conduire à une augmentation intracellulaire d'AMP cyclique (cAMP). A partir d'une concentration de glucose supérieure à 4 mM, l'augmentation du cAMP rend les canaux potassiques ATP-dépendants (voir paragraphe 1, page 3) plus sensibles aux changements du ratio ATP/ADP, d'où l'induction de l'exocytose de l'insuline. La concentration élevée de cAMP facilite aussi l'exocytose de l'insuline, car elle optimise des modifications structurales des vésicules contenant l'hormone avant qu'elles ne soient fusionnées avec la membrane plasmatique (Pabreja et al. 2014). Quant à l'induction de la biosynthèse de l'insuline, elle est médiée par la stabilisation de son ARN et sa transcription, selon un mécanisme physiologique non encore éclairci. De plus, l'activation du GLP-1R augmente la viabilité des cellules β pancréatiques par inhibition de la protéine pro-apoptotique Bad (Quoyer et al., 2010). Enfin, le GLP-1 stimule la projection de neurones pancréatiques vers le nerf vague qui contrôle la masse des cellules β pancréatiques. L'effet inhibiteur du GLP-1 sur la sécrétion du glucagon semble être médié par une signalisation paracrine au niveau du pancréas ou par des messages transmis du système autonome nerveux (Pabreja et al., 2014).

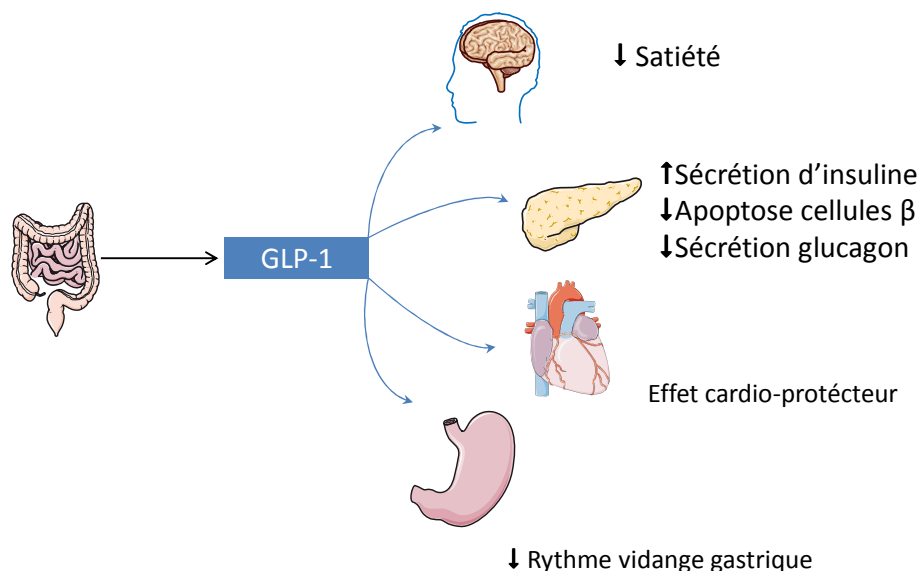


Figure 7 Effets physiologiques principaux du GLP-1. ↑ : augmentation, ↓ : réduction

Concernant l'effet anorexigène du GLP-1, il semble être attribué à l'activation de ses récepteurs au sein du système neuronal autonome. L'administration des agonistes GLP-1R de haut poids moléculaire n'entraîne pas le même effet « coupe-faim » comme les autres agonistes, ce qui suggère des encombrements d'accès au niveau des GLP-1Rs centraux. L'inhibition de la néoglucogenèse hépatique et le ralentissement de la vidange gastrique sont aussi médiés par des effets du GLP-1 sur le système nerveux autonome (Pabreja et al., 2014).

1.4. Les incrétinomimétiques

Compte tenu du GLP-1 étant une hormone pléiotropique impliquée dans la régulation de la glycémie, des approches thérapeutiques sont développées en mimant les effets de cette hormone incrétine. Les incrétinomimétiques consistent en deux catégories de médicaments, les agonistes du récepteur GLP-1R et les inhibiteurs de l'enzyme DPP-4. Comme ils reproduisent les effets bénéfiques du GLP-1, ils sont caractérisés par leur propriété hypoglycémiant glucose-dépendant sans risque de provoquer d'hypoglycémie et par leurs effets bénéfiques (agonistes GLP-1R) à l'équilibre pondéral. Leur application thérapeutique concerne le diabète de type 2 et éventuellement le diabète de type 1 (Schwanstecher, 2011).

1.4.1. Les agonistes du GLP-1R

Le premier agoniste du récepteur GLP-1R mis sur le marché pharmaceutique en 2005, a été l'**exénatide** (Albrechtsen et al. 2013). Cet analogue synthétique du peptide exénatide-4, découvert dans la salive du lézard *Heloderma suspectum*, présente une homologie de 53 % de la séquence des acides aminés du GLP-1 et a une forte affinité pour son récepteur GLP-1R. Le temps de demi-vie de l'Exénatide est de 3,5 heures, avec une durée d'action de 6 à 8 heures. Son administration doit être réalisée deux fois par jour, par voie sous-cutanée (Nauck et al., 2013). Il peut diminuer les taux d'HbA_{1c} de 0,8-1,1% avec un avantage pondéral certain car la perte de poids atteint en moyenne 4,7 kg au bout de 2 ans de traitement (Virally, 2008). Hormis les effets hypoglycémians sans risque d'hypoglycémie, l'exénatide améliore la fonction des cellules β -pancréatiques (Pabreja et al., 2014).

Le **liraglutide** a été le premier analogue du GLP-1 humain portant une chaîne latérale d'acides gras et deux modifications dans la séquence des acides aminés par rapport à l'hormone physiologique. Ces modifications structurales le rendent résistant à la dégradation par la DPP4. Son temps de demi-vie est de 11 à 15 heures ce qui permet une seule administration journalière. Le liraglutide présente une forte association à l'albumine sérique ce qui entraîne une réduction de ses effets biologiques par rapport au GLP-1. Néanmoins, il est capable de diminuer les taux HbA_{1c} de 1,0 à 1,3 %. Le liraglutide présente aussi des effets bénéfiques pondéraux, augmente la masse des cellules β -pancréatiques et diminue la tension systolique (cet effet n'étant pas lié à la perte de poids) (Schwanstecher, 2011).

Ces analogues présentent un meilleur profil de sécurité que d'autres traitements antidiabétiques. Leurs effets secondaires touchent le système gastro-intestinal (nausées, diarrhée). La nature peptidique de l'Exénatide induit la libération d'anticorps qui n'interagissent pas avec le GLP-1 physiologique. A noter que cette libération n'a aucun impact observé à ce jour.

D'après la littérature, les agonistes GLP-1R semblent augmenter les risques de développer une pancréatite aigüe voire un cancer pancréatique. Cependant, ces deux pathologies sont assez fréquentes chez les diabétiques mal pris en charge. Néanmoins, les services de pharmacovigilance examinent de près si de réelles relations de cause à effet peuvent être démontrées (Pappachan, 2014; Schwanstecher, 2011).

L'administration strictement injectable des agonistes du GLP-1R reste leur point faible malgré l'apparition de formulations de l'Exénatide qui limitent la fréquence d'administration à une injection hebdomadaire. De plus, des nouveaux analogues de GLP-1 (**Figure 8**) résistants à la dégradation enzymatique par le DPP-4 sont apparus sur le marché pharmaceutique :

- Le **lixisenatide**, un autre peptide isolé de la salive du lézard *Heloderma suspectum*, dont l'administration se fait une fois par jour.
- L'**albiglutide**, constitué d'un dimère d'analogues du GLP-1 couplé à une molécule d'albumine humaine, et qui a un temps de demi-vie de 6 à 8 jours.
- Le **dulaglutide**, formé par deux analogues GLP-1 fusionnés sur le fragment cristallisable de l'immunoglobuline IgG4, et au temps de demi-vie de 4 jours.

Ces analogues de haut poids moléculaire sont moins efficaces en ce qui concerne la perte pondérale, s'ils sont comparés avec les agonistes GLP-1R de plus faible poids moléculaire (Pabreja et al., 2014).



Figure 8 Représentation schématique des agonistes GLP-1R en montrant les modifications de la séquence peptidique par rapport au GLP-1 (7-36) en rouge. Adapté de (Pabreja et al., 2014).

1.4.2. Les inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4)

Contrairement aux agonistes GLP-1R qui ne sont administrés que par voie sous-cutanée, les inhibiteurs de la DPP-4 sont administrés *per os*. Les inhibiteurs de la DPP-4, connus aussi sous le nom générique de **gliptines**, agissent en inhibant compétitivement la protéase DPP-4, une enzyme responsable de la dégradation du GLP-1 et de temps de demi-vie assez court. Suite à l'administration d'une gliptine, les taux postprandiaux du GLP-1 se multiplient par un facteur de deux à quatre par rapport aux taux de GLP-1 postprandiaux normaux (Pabreja et al. 2014; Schwanstecher 2011). Elles n'exercent pas d'effets bénéfiques dans l'équilibre pondéral mais possèderaient des propriétés potentiellement bénéfiques pour le système cardiovasculaire (Scheen, 2013; Scheen, 2014).

La **sitagliptine** a été le premier inhibiteur de DPP-4 lancé sur le marché pharmaceutique. En monothérapie et en co-administration avec d'autres médicaments antidiabétiques, elle permet une diminution des taux de la HbA_{1c} de 0,6 à 1,1 % (Schwanstecher 2011). D'autres gliptines sont aussi commercialisées en Europe, comme la **vildagliptine**, la **saxagliptine**, la **linagliptine** et l'**alogliptine**, qui présentent un même profil d'efficacité de diminution de la HbA_{1c} par rapport à la Sitagliptine mais avec des paramètres pharmacocinétiques différents. Par exemple, la saxagliptine est la seule gliptine qui se bio-transforme en un métabolite qui maintient l'activité inhibitrice de la DPP-4 (50 % de l'activité du produit de départ). Contrairement aux autres gliptines, la linagliptine s'excrète principalement par la voie hépatobiliaire. La durée d'inhibition de la DPP-4, dans les doses habituelles d'administration, est dépendante de la nature de la gliptine, la vildagliptine et la sitagliptine entraînant l'inhibition la plus longue (Scheen, 2014).

Les effets secondaires des gliptines sont non spécifiques (céphalées, perturbations gastriques, manifestations grippales) mais en règle générale, les gliptines sont bien tolérées. Comme pour les agonistes GLP-1R, leur administration est associée avec un risque élevé de pancréatite aiguë et de cancer du pancréas. De plus, il y a un nombre non négligeable de substrats de la DPP-4 dont la demi-vie pourrait être modifiée suite à l'administration d'une gliptine, affectant la nociception, la réactivité des vaisseaux sanguins, l'homéostasie énergétique, la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, le système immunitaire, la motilité gastrique et la croissance (Pabreja et al. 2014). Ces observations renforcent le besoin de pharmacovigilance qui pourra à terme clarifier le profil de toxicité potentielle des inhibiteurs de la DPP-4.

1.5. La recherche des sécrétagogues GLP-1

Une approche thérapeutique alternative impliquant la voie du GLP-1 pourrait être envisagée : l'administration de composés pouvant stimuler la sécrétion du GLP-1, laquelle est diminuée chez les patients atteints de diabète de type 2, afin de normaliser leur taux. Contrairement au nombre restreint des produits obtenus par synthèse organique (Cornall et al., 2013), l'étude des ressources naturelles et des métabolites secondaires connus pour leurs propriétés antidiabétiques montre que des extraits végétaux, des fractions et des composés purs (**Figure 9**), sont capables d'exercer un effet sécrétagogue GLP-1. Le matériel végétal concerné ne se restreint pas aux espèces avec une activité antidiabétique connue puisqu'il s'agit à la fois d'algues vertes et d'algues brunes (Chin et al., 2014), de monocotylédones (Li et al., 2012) et surtout des dicotylédones (**Tableau 3**).

Les modèles d'évaluation de l'effet sécrétagogue sont assez variés (**Tableau 3**) comprenant :

- Des tests *in vitro*
- Des expérimentations *in vivo*
- Des tests *ex vivo* (anneaux intestinaux des rats, cellules primaires intestinales porcines),
- et une étude clinique avec dosage du GLP-1 sécrété suite à la consommation de la cannelle.

Quant aux essais *in vitro* on peut noter l'utilisation de la lignée STC-1 (lignée établie de cellules murines issues de l'intestin supérieur), pGIP/neo STC-1 (lignée STC-1 transfectée pouvant sécréter plus de GIP), GLUTag (lignée établie de cellules murines issues du colon) et NCI-H716 (lignée établie de humaines issues du colon). Dans tous les cas les cellules sont incubées avec le traitement dilué dans un tampon ou dans le milieu de culture entre 30 minutes et 3 heures. Suite à l'incubation, le GLP-1 est dosé dans le surnageant.

Les études les plus complètes concernent les 4 espèces suivantes :

- l'olivier
- Le ginseng
- Le concombre amer (*Momordica charantia*) et
- *Hoodia gordonii*.

L'activité a été observée *in vitro* et *in vivo* et au moins un métabolite secondaire a été mis en évidence pour ses propriétés sécrétagogues GLP-1 avec élucidation du mécanisme pharmacologique responsable de la stimulation. Les mécanismes décrits dans la littérature peuvent impliquer des RCPG, comme les récepteurs du goût amer TAS2R, le récepteur GPR119 et le récepteur des acides choliques TGR5.

La stimulation des RCPGs ainsi que du TRPA1 (*Transient receptor potential channel A1*) déclenche la dépolarisation des cellules sécrétrices et provoque l'exocytose des vésicules stockant le GLP-1.

D'autres produits naturels exercent un effet sécrétagogue du GLP-1 en augmentant l'expression de l'ARNm du proglucagon et de la convertase prohormonale PC-3 qui va transformer le proglucagon en GLP-1 (**Tableau 3**).

Tableau 3 Bilan bibliographique des espèces et des métabolites secondaires pouvant stimuler la sécrétion du GLP-1. ^a Stimulation du GLP-1: pourcentage de sécrétion GLP-1 induite par le traitement sur la sécrétion du GLP-1 observée au témoin négatif (blanc). – : absence de précision

Espèce (Famille)	Fraction/composé	modèles	stimulation GLP-1 ^a (dose)	Cible pharmacologique	Référence
<i>Olea europaea</i> (Oleaceae)	Extrait CH ₂ Cl ₂ de feuilles	lignée STC-1	200 % (1 mg/ml)	-	(Rafferty et al. 2011)
		souris C57BL/6	150 % (5 mg/kg)	-	
	Acide oléanolique	lignée STC-1	300 % (10 µM)	TGR5	(Bala et al. 2014)
<i>Ilex paraguariensis</i> (Aquafoliaceae)	Infusion de feuilles	souris ddY	800 % (100 mg/kg)		(Hussein et al. 2011)
	Acide chlorogénique	lignée STC-1	500 % (40 mM)	-	(Rafferty et al. 2011)
	Acide chlorogénique	souris C57BL/6	pas d'effet à 5 mg/kg	-	
	Acide dicaféoylquinique	souris ddY	120 % (100 µg/ml)	-	(Hussein et al. 2011)
	Matésaponine 2	souris ddY	145 % (100 µg/ml)	-	
<i>Cinnamomum verum</i> (Lauraceae)	Poudre aromatique	étude clinique	110 % (3g par repas)	-	(Hlebowicz et al. 2009)
	Cinnamtannin A2	souris ICR	300 % (10 µg/ kg)	-	(Yamashita et al. 2013)
<i>Panax ginseng</i> (Araliaceae)	Ginsénosides totaux	rats Sprague-Dawley	170 % (300 mg/kg, 4 semaines)	↑proglucagon, ↑PCA-3	(Liu et al. 2014)
	Ginsénosides totaux	lignée NCI-H716	120 % (200 µg/ml)		
	Ginsénoside Rb1	lignée NCI-H716	120 % (200 µg/ml)	↑proglucagon	
	Ginsénoside K	lignée NCI-H716	800 % (100 µM)	TGR5	(Kim et al. 2014)
<i>Momordica charantia</i> (Cucurbitaceae)	Fraction des composés < 3 kD	souris C57BL/6	170 % (5000 mg/kg)	-	(Huang et al. 2013)
	Fraction enrichie en mormodicosides	lignée STC-1	320 % (1 mg/ml)	TAS2R (RCPG)	
	19-Norlanosta-5,7,9, 22,24-pentaèn-3-ol	lignée STC-1	600 % (492 µM)	-	
	Karavilagénine E	lignée STC-1	350 % (440 µM)	-	
<i>Hoodia gordonii</i> (Apocynaceae)	Extrait Naturex®	souris C57BL/6	120 % (1000 mg/kg)	RCPG 119	(S. Zhang et al. 2014)
	Gordonoside F	souris C57BL/6	160 % (200 mg/Kg)	RCPG 119	
	P57	ex vivo : anneaux d'iléum de rats	160 % (100 µM)	TAS2R14 (RCPG)	(Le Nevé et al. 2010)

Suite du **tableau 3** Bilan bibliographique des espèces et des métabolites secondaires pouvant stimuler la sécrétion du GLP-1. ^a Stimulation du GLP-1: pourcentage de sécrétion GLP-1 induite par le traitement sur la sécrétion du GLP-1 observée au témoin négatif (blanc). – : absence de précision

Espèce	Fraction/composé	modèles	stimulation GLP-1 (dose)	Cible pharmacologique	Référence
<i>Glycine max</i> (Fabaceae)	Fraction glycéollines	lignée NCI-H716	200 % (5 µM)	-	(Park et al. 2010)
<i>Gentiana scabra</i> (Gentianaceae)	Fraction EtOAc	lignée NCI-H716	300 % (500 µg/ml)	activation des RCPG	(Shin et al. 2012)
<i>Citrus aurantium</i> (Rutaceae)	Fraction n-hexane	lignée NCI-H716	200 % (500 µg/ml)	canaux K ⁺ voltage-dépendants	(Choi et al. 2012)
<i>Arctium lappa</i> (Asteraceae)	Lignanes totaux	rats GK	200 % (300 mg/kg x 2 par jour, 12 semaines)	-	(Xu et al. 2014)
<i>Ophiopogonis japonicus</i> (Asparagaceae)	Fraction riche en oligosaccharides	rats Sprague-Dawley	120 % (450 mg/Kg)	-	(Li et al. 2012)
<i>Agave tequilana</i> (Agavaceae)	Fructanes	souris C57BL/6	260 % (10% dans la nourriture)	↑proglucagon	Urias-Silvas et al. 2008)
<i>Padina sulcata</i> (Dictyotaceae)	Fraction butanol	pGIP/neo STC-1	800 % (5 mg/mL)		(Chin et al. 2014)
<i>Sargassum binderi</i> (Sargassaceae)	Fraction butanol	pGIP/neo STC-1	120 % (5 mg/mL)		
<i>Turbinaria conoides</i> (Sargassaceae)	Extrait aqueux	pGIP/neo STC-1	1300 % (5 mg/mL)		
<i>Halimeda macroloba</i> (Halimedaceae)	Extrait aqueux	pGIP/neo STC-1	350 % (5 mg/mL)		
	Resvératrol	souris C57BL/6	300 % (60 mg/kg, 5 semaines)	↑proglucagon	(Dao et al. 2011)
	Berbérine	rats Sprague-Dawley	230 % (120 mg/Kg)	↑proglucagon,↑PCA-3	(Yu et al. 2010)
		lignée NCI-H716	150 % (100 µM)	-	
	Carvacrol	cellules primaires	170 % (50 µM)	-	(Emery et al. 2014)
	Isothiocyanate d'allyle	cellules primaires	200 % (100 µM)	TRPA1	
		lignée GLUTag	200 % (100 µM)		
		souris C57BL/6	130 % (15 mg/kg)		
	Rébaudioside A	cellules primaires	250 % (12,5 µM)	-	(Ripken et al. 2014)

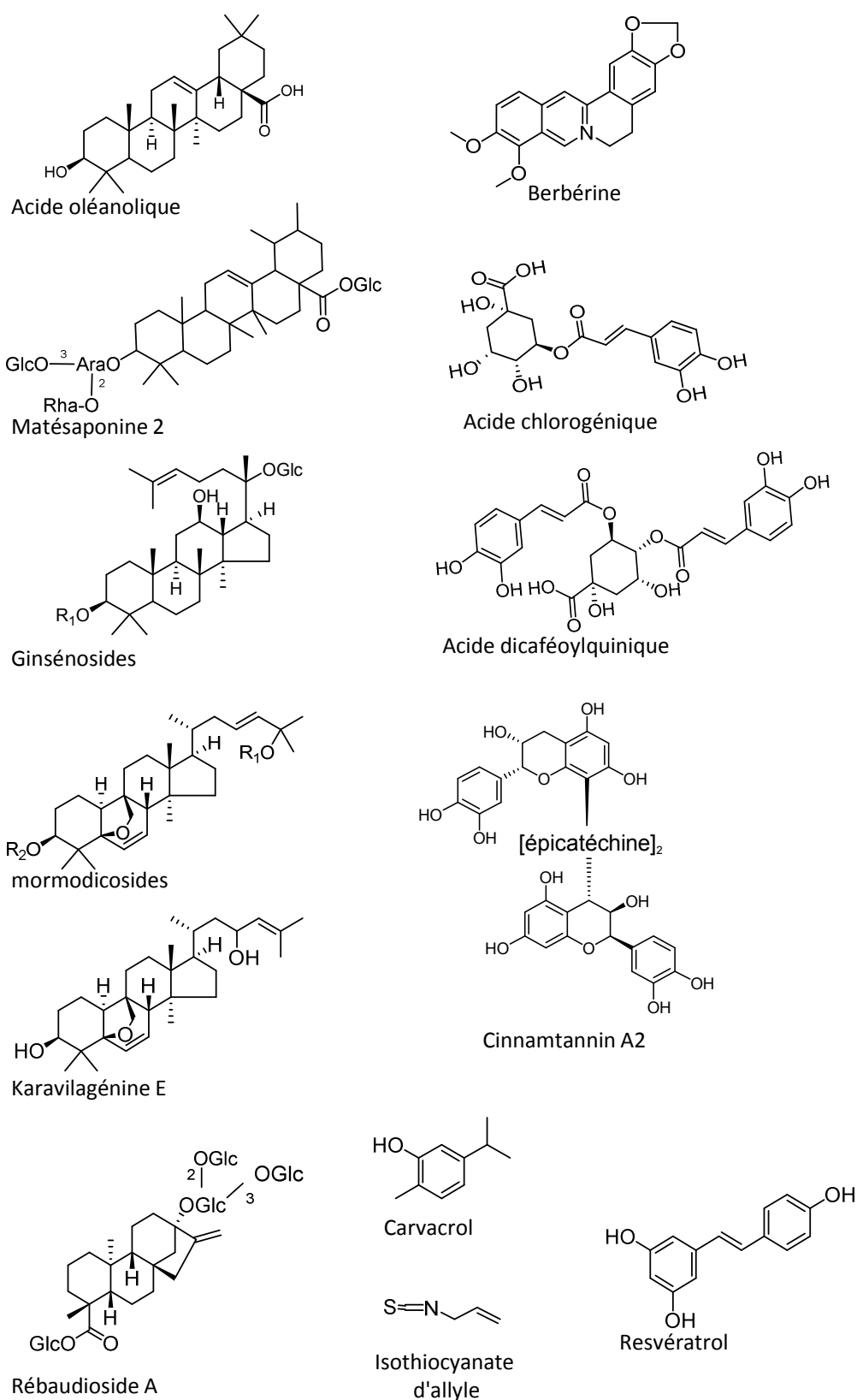


Figure 9 Structures de sécrétagogues naturels présents dans la littérature

2. Les plantes étudiées

2.1. Le genre *Cynanchum*

Le genre *Cynanchum* appartient à la sous-famille des Asclépiadoïdées. Avant la classification APG II (*Angiosperm Phylogeny Group II*), le taxon des Asclepiadoideae formait la famille Asclépiadacées mais aujourd'hui les Asclépiadoïdées constituent en fait une sous-famille des Apocynacées (Endress et Bruyns, 2000). (Tableau 4).

Tableau 4 Taxonomie du genre *Cynanchum* selon l'APG III.

Domaine:	Eukaryota ou eucaryotes
Règne:	Plantae
Clades	Angiospermes
	Eudicotylédones ou dicotylédones vraies
	noyau des dicotylédones vraies
	Astéridées Clade: Euastéridées I
Ordre:	Gentianales
Famille:	Apocynaceae
Sous-famille:	Asclepiadoideae
Genre:	<i>Cynanchum</i> L.

Le genre *Cynanchum* a été décrit par Linné en 1753. L'étymologie du terme vient du grec « κύνοç » (chien) et « ἀνχεῖν » (étrangler), qui pourrait être associée à la toxicité de certaines espèces. Les environ 300 représentants du genre *Cynanchum* sont repartis dans les zones tropicales et subtropicales bien que quelques espèces se retrouvent aussi dans des zones de climat tempéré comme *Cynanchum acutum* L. qui pousse aussi en France (Albers et Meve, 2004).

Les espèces du genre *Cynanchum* sont des plantes dressées, grimpantes, à tige succulente ou avec de feuilles. Elles sont caractérisées par la présence d'un latex laiteux, blanc à jaune. Les tiges sont verdâtres de 1,5 à 15 mm de diamètre, peuvent être lisses, veinées ou tuberculées avec un aspect glabre ou couvertes de poils, et parfois couvertes de cire. Les feuilles sont plates, pétiolées ou sessiles, ont des bords entiers, cordiformes à réniformes à leur base. Les espèces à tige succulente portent des feuilles rétrécies, en forme d'écaille. Les inflorescences sont extra-axillaires racémiformes à pseudo-ombelliformes. Les fleurs sont souvent odorantes grâce à leur nectar. La corolle est de couleur majoritairement blanche à marron parfois rose, de diamètre 3-20 mm, étoilée à tubulaire, rarement campanulée. Le périanthe est blanc, rarement rouge au niveau inférieur, et situé au même niveau ou à un niveau supérieur du gynostège.

Le gynostège est une formation anatomique complexe qui émerge de la soudure des étamines avec la partie supérieure du gynécée. Cet organe est typique des Asclépiadoïdées mais aussi des Orchidacées (Friedmann, 2011). Les espèces de *Cynanchum* portent un gynostège qui est sessile ou pédicellé, composé par la couronne staminale et inter-staminale. Les anthères portent un appendice apical et des appendices latéraux sous forme d'ailes.

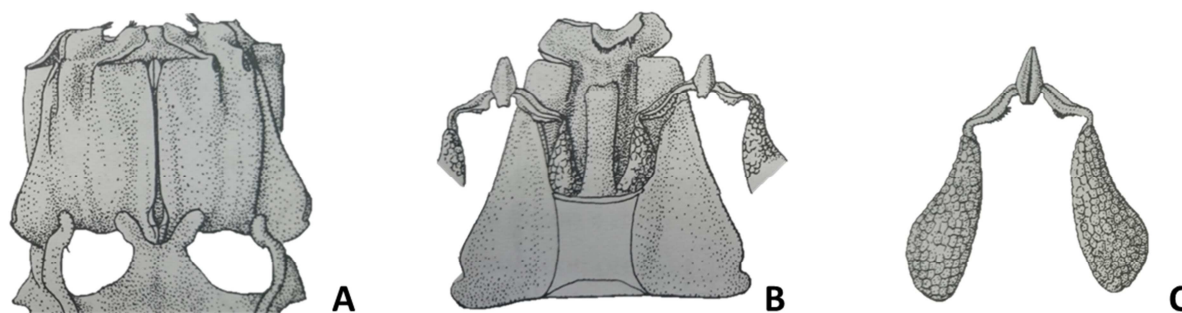


Figure 10 Gynostège (A) avec l'androcée à l'extérieur et le gynécée à l'intérieur, anthère avec des pollinies (B) et paire des pollinies de deux anthères voisines formant un pollinaire (C) de l'Asclépiadacée *Asclepias syriaca* L. (Bouharmont et Évrard 2002).

Un autre caractère anatomique partagé entre les Orchidacées et les Asclépiadacées est l'organisation du pollen en pollinies correspondant à des agrégations de tous les grains de pollen réunis en une masse gélatineuse ou cireuse (Bouharmont et Évrard, 2002; Friedmann, 2011). Chez les espèces de *Cynanchum*, les pollinies peuvent être pendantes ou plus ou moins dressées sur le gynostège. Deux pollinies sont attachées avec leurs caudicules sur le corpuscule (petit appendice inter-staminal appartenant au stigmate) afin de former l'organe dit pollinaire. La tête du style forme un renflement au-dessus du niveau des corpuscules.

Les fruits sont des follicules glabres à parois fines, légèrement veinés dans leur axe longitudinal et pouvant être lisses ou tuberculés. Les graines sont marrons, piriformes à ovoïdes, papilleuses, et portent une aigrette à poils (Albers et Meve, 2004).

2.1.1. Usages traditionnels

Les applications thérapeutiques des espèces du genre *Cynanchum* sont assez variées, notamment en **Asie** où elles sont utilisées surtout

- comme fébrifuges : *C. formosanum* à Taïwan et *C. atratum* partout dans l'Est de l'Asie ;
- et comme médicaments traditionnels du système respiratoire, comme antitussifs, expectorants et contre la pneumonie : *C. japonicum*, *C. stauntonii* et *C. glaucescens* en Chine.

D'autres applications traditionnelles sont aussi décrites dans la littérature (Perry et Metzger, 1980) :

- *C. japonicum* est utilisé en Malaisie contre des maladies hépatiques,
- *C. caudatum* et *C. wilfordii* sont utilisés comme diurétiques,
- *C. wilfordii* et *C. auriculatum* comme toniques,
- *C. auriculatum* est aussi utilisé en Chine contre les hémorragies, la tuberculose et les traumatismes internes (Perry et Metzger, 1980) ; ses propriétés gastro-protectrices ont été prouvées *in vivo* (L. Shan et al., 2006),
- *C. amplexicaule*, une espèce très répandue en Chine, est utilisée traditionnellement contre l'arthrite rhumatoïde, la fièvre hectique et les abcès (G. Chen et al., 2011),
- *C. otophyllum* est également utilisé en médecine traditionnelle chinoise pour ses propriétés antiépileptiques (Ma, 2011).

En **Europe**, le seul représentant du genre *Cynanchum*, *Cynanchum acutum*, la scammonée de Montpellier, a été utilisé comme purgatif énergique (Coste, 1937).

Le latex de la même espèce est décrit en **Tunisie** pour ses applications contre les affections oculaires et dermatologiques, notamment en cas d'eczéma (Boukef, 1986).

Une décoction des feuilles et des tiges de *C. formosum* est utilisée aux **Andes** comme vomitif dans le cas d'intoxication alimentaire et la même drogue, macérée dans de l'eau de vie, sert comme aphrodisiaque (Girault, 1984).

En **Afrique**, les Damaras de Namibie traitent les maux de gorge et l'amygdalite en mastiquant des racines de *C. orangeanum*. La tribu des Ju'Hoansis utilise les tronçons de racines cuits à l'eau pour traiter les douleurs de nuque et la toux sévère accompagnée de crachats sanglants. La décoction des racines se consomme contre les maux d'estomac.

Le latex de *C. gerrardii* est utilisé pour la pêche, dans l'Afrique de l'Est. *C. viminale* est une espèce repandue d'Egypte à l'Afrique du Sud et des îles du Cap Vert aux îles de l'océan indien jusqu'à l'Australie et la nouvelle Calédonie. Ses utilisations médicinales sont assez variées mais nécessitent des précautions d'emploi en raison de sa toxicité. Son latex est utilisé pour traiter des affections dermatologiques (verrues, plaies, brûlures, infections, maladies sexuellement transmises), des perturbations gastrointestinales ainsi que des infections buccales, oculaires et auriculaires. Des usages en cas de menstruation irrégulière et des propriétés galactagogues sont aussi décrites dans la littérature (Schmelzer, 2013).

La description des applications thérapeutiques des espèces de *Cynanchum* de **Madagascar** est restreinte à trois espèces (Schmelzer, 2013) :

- *C. eurychioïdes* est utilisée contre les brûlures et pendant les rituels de circoncision,
- *C. perrieri* est administrée en cas de toux,
- *C. viminale*, sous forme de décoction de ses tiges, est utilisée contre le malaria et en cas d'hémorragies utérines.

2.2. Les espèces de *Cynanchum* aphylls malgaches

Les espèces présentées dans ce travail sont des plantes aphylls (dépourvues de feuilles) et qui présentent un aspect de brindilles (**Figure 12**). Elles sont pourvues de tiges succulentes et sont distribuées dans la région de Toliara, au Sud-Ouest de Madagascar (Albers et Meve, 2004).

D'après la phylogénétique, les *Cynanchum* aphylls forment un taxon à part. Ce taxon est **endémique de Madagascar** à deux exceptions près :

- *C.gerrardii*, qui est la seule espèce aphylls qui a pu migrer en Afrique continentale et de là arriver jusqu'à Oman (Meve et Liede 2002) ;
- *Cynanchum viminale* (= *Sarcostemma viminale*) qui est une espèce de morphologie très variée ; à ce jour, les botanistes ne savent pas s'il faut rattacher cette espèce au genre *Cynanchum* ou au genre *Sarcostemma*. Néanmoins, les données génétiques montrent que le taxon *Sarcostemma* dérive du taxon des *Cynanchum* malgaches. La colonisation de presque toutes les côtes tropicales et subtropicales de l'ancien monde aurait comme point de départ l'île de Madagascar (Liede et Täuber, 2002; Meve et Liede, 2002; Schmelzer, 2013).

2.2.1. *Cynanchum marnierianum* Rauh.

Cynanchum marnierianum a des tiges de 20-50 cm de long et de 3,5-7 mm de diamètre, décombantes, irrégulièrement tuberculées et non volubiles. Les feuilles sont réduites à des écailles de 1,5 x 1,5 mm (Rauh, 1998). L'inflorescence est de type pseudo-ombelle avec 3-6 fleurs sessiles. Les fleurs sentent légèrement le miel et les boutons floraux sont coniques oblongs (**Figure 11, Figure 12**).

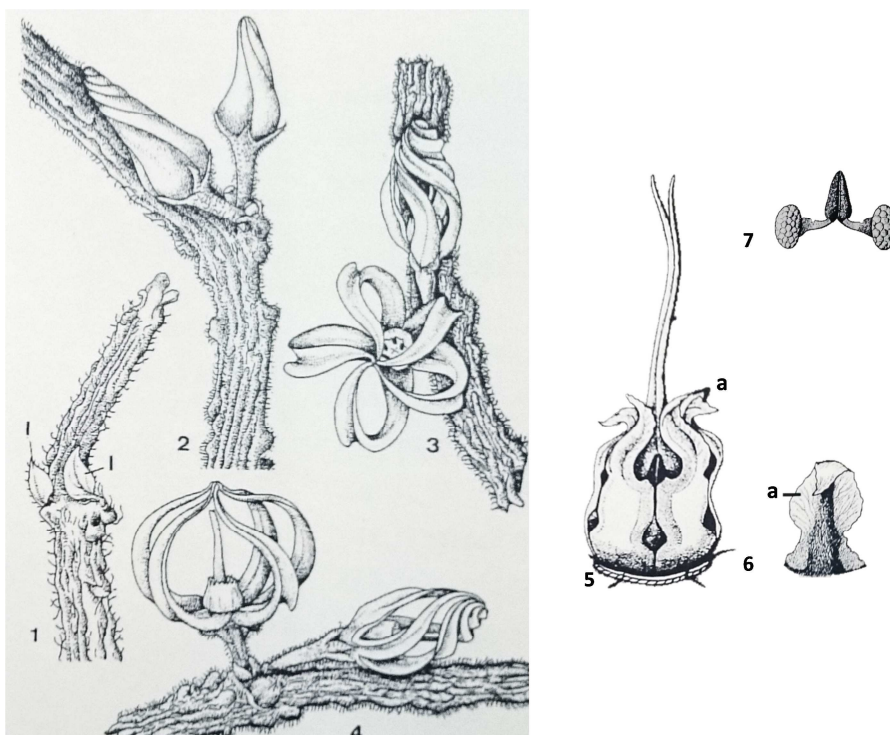


Figure 11 Dessins de *Cynanchum marnierianum* 1. Tige apicale avec des feuilles (l) 2. Tige avec des boutons floraux 3-4. Tiges avec des inflorescences 5. La corolle, a : appendices des anthères. 6. L'anthère et 7. Le pollinaire (Rauh, 1998)



Figure 12 Photo des tiges, du latex et d'un bouton floral de *Cynanchum marnierianum*

La corolle est verte à jaune et ses lobes sont libres à leur base, de 5-6 mm de long, courbés vers l'intérieur avec leurs extrémités soudées en début de floraison (**Figure 13**). La couronne est de 1,2 à 2 mm de hauteur et dépasse le gynostège, sauf la tête du style qui est extrêmement longue. La couronne inter-staminale n'est pas différenciée et est soudée avec la couronne staminale sur plus des $\frac{3}{4}$ de la longueur de la couronne. La couronne staminale est placée sur les dos des étamines, est plate et triangulaire. Les appendices ailés des anthères sont aussi longs que les anthères. La tête du style est blanche (**Figure 13**), en forme d'entonnoir inversé.



Figure 13 Inflorescence de *Cynanchum marnierianum* (Vincentz, 2007)

2.2.2. *Cynanchum menarandrense* Jum. & H. Perrier

L'espèce *Cynanchum menarandrense* a été aussi décrite comme étant *Cynanchum antandroy* par Descoings en 1971. Il s'agit d'une plante à tiges de 35-50 cm de long et de 7 mm de diamètre, dressées, tuberculées, glabres et couvertes de cire. Les feuilles sont en forme d'écailles oblongues et caduques. L'inflorescence est une cyme hélicoïde comprenant 12 à 17 fleurs (**Figure 14, Figure 15**). Les boutons floraux sont cylindriques. Les pétales sont triangulaires aigus, longs de 3 mm et brièvement soudés. La corolle est cyathiforme, verte à sa base et jaune à pourpre à sa partie apicale. Les lobes de la corolle sont de 3,5 mm, unis à leur base, horizontaux à incurvés. La couronne est papilleuse, de 2,5 mm, et de même hauteur que le gynostège sessile. La couronne staminale est plate, rectangulaire, avec une ligule. Elle est soudée avec les filets des étamines et avec la couronne inter-staminale pour la moitié de la longueur de la couronne. Les appendices ailés des anthères sont plus longs que les anthères. La tête du style est blanche et de forme umbonée (Albers et Meve, 2004).

Sur la base de critères morphologiques, *Cynanchum menarandrense* appartient au groupe des espèces de *Cynanchum macrolobum* (Albers et Meve, 2004).

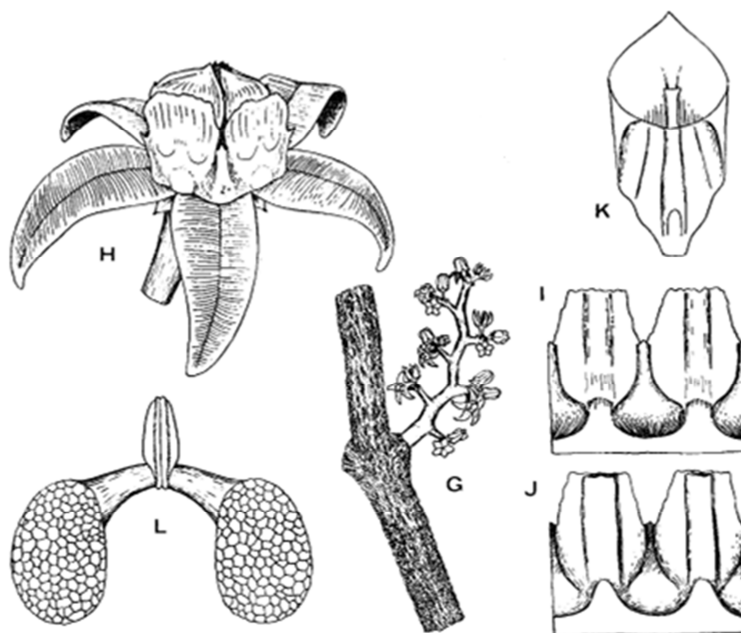


Figure 14 *Cynanchum menarandrense*: **G**, morceau de tige portant une inflorescence x 1,05 ; **H**, fleur entière x 5,6 ; **I** et **J**, couronne staminale étalée, vue par la face externe et par face interne, respectivement x 7 ; **K**, étamine x 10,5 ; **L**, sacs polliniques (Descoings, 1971).



Figure 15 Photo de tige de *C. menarandrense* avec des inflorescences (Rauh, 1998)

2.2.3. *Cynanchum descoingsii* Rauh

L'espèce n'a été décrite qu'en 1993 par Werner Rauh (Meve et Liede, 1994). C'est une plante portant des tiges de 30-80 cm de long et 3,5-4,0 mm de diamètre, dressées, tuberculées, non volubiles et couvertes de cire. Les feuilles sont également réduites à des écailles, oblongues et caduques. L'inflorescence en cyme hélicoïde comprend entre 5 et 20 fleurs. Les boutons floraux sont coniques. La corolle est marron à pourpre (**Figure 16**), cyathiforme, avec des lobes de 7 mm unis à leur base, recourbés et vrillés. La couronne staminale est papilleuse, de 2,5-4,0 mm et dépasse en hauteur le gynostège qui est sessile. Elle est contortée et soudée avec les filets des étamines et avec la couronne inter-staminale sur plus de la moitié de la longueur de la couronne. Elle porte des ligules de même longueur que la couronne inter-staminale. Les appendices ailés des anthères sont plus courts que les anthères. La tête du style est cylindrique, jaune à marron, et porte un chapeau conique papilleux (Albers et Meve, 2004). Cette espèce appartient, comme *C. menarandrense*, au groupe de *C. macrolobum* mais son groupe voisin est *Cynanchum crassipedicellatum* qui présente aussi des lobes de la corolle contortés, charnus et papilleux comme caractère synapomorphique (Meve et Liede, 1994).



Figure 16 Fleur de *Cynanchum descoingsii* (Rauh, 1998)

2.3. Aspects phytochimiques du genre *Cynanchum*

La phytochimie du genre *Cynanchum* est assez variée puisqu'il synthétise des flavonoïdes (Fawzy et al., 2008), des coumarines (El-Demerdash et al., 2009), des acétophenones (Zhang et al., 2009), des monoterpènes et des triterpènes (Konda et al., 1992). Des alcaloïdes sont aussi isolés dans quelques espèces : *C. komarovii* et *Vincetoxicum hirundinaria* (ou 'dompte-venin', une espèce anciennement nommée *Cynanchum vincetoxicum*).

Les métabolites secondaires qui caractérisent le genre *Cynanchum* et qui constituent *a priori* des marqueurs chimiotaxonomiques du genre sont les **glycosides de prégnanes** (Ma, 2011). L'aglycone le plus courant est la désacétylmétaplexigénine ou son analogue réduit à la position 20, la sarcostine (Figure 17). Ces génines sont en effet décrites dans la plupart des travaux phytochimiques réalisées sur le genre *Cynanchum* (Chen, 2009; Ding et al., 2011; Jiang et al., 2011; H.-I. Lee et al., 2011; Peng et al., 2008; Shan et al. 2012; Warashina et Noro, 1997).

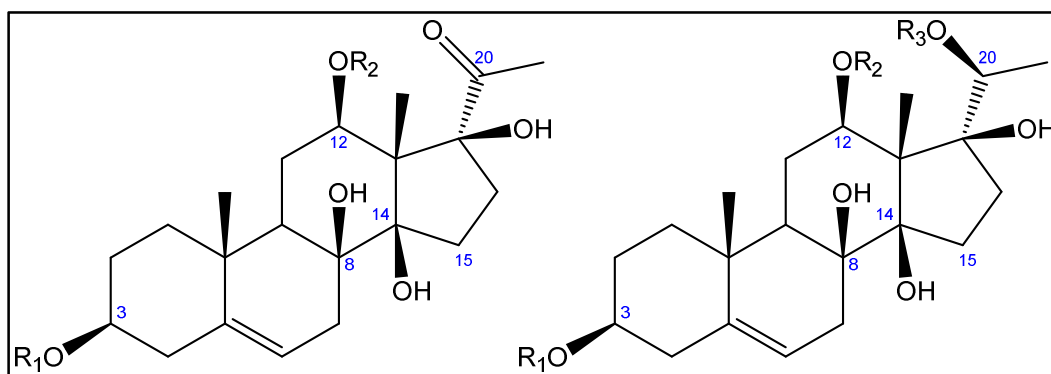
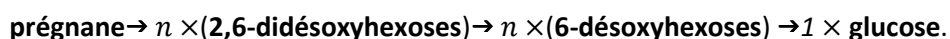


Figure 17 Noyaux de la désacétylmétaplexigénine à gauche et de la sarcostine à droite.

La liaison glycosidique en position 3 du noyau prégnane (substituant R_1 à la **Figure 17**) est constituée d'une chaîne linéaire composée de 1 à 7 oses. La plupart d'entre eux sont des 2,6-didésoxy-hexoses, méthoxylés ou non, comme le cymarose, l'oléandroso, le canarose et le diginose. En suivant la chaîne osidique, on peut observer que plus on s'éloigne de la génine, plus le degré d'hydroxylation des sucres augmente, le glucose étant souvent le dernier hexose. Cette observation peut se résumer de la manière suivante. (Kawanishi, 1972) :



Ce motif de glycosylation a été constaté sur tous les hétérosides des Asclépiadacées identifiés dès 1972, ce qui a été confirmé par la suite (Aquino et al., 1996) et jusqu'à ce jour, en examinant la littérature des glycosides prégnaniques.

Un bilan bibliographique des désoxyhexoses (**Figure 18**) identifiés chez les Asclepiadacées, montre que les hexoses de la série β sont en configuration D alors que ceux de la série α sont en conformation L (Vleggaar et al., 1993).

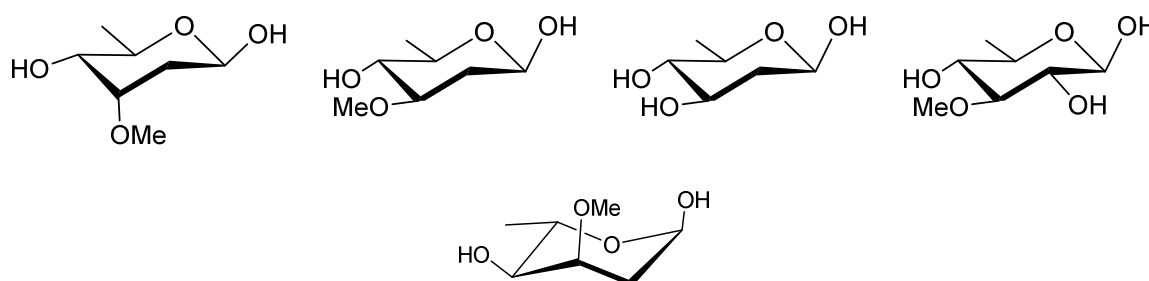


Figure 18 Exemples de désoxy-hexoses fréquents chez les Asclépiadacées. De gauche à droite: β -D-cymaropyranose, β -D-oléandropyranose, β -D-canaropyranose, β -D-thévetopyranose. En bas : α -L-cymaropyranose

Les hydroxyles des positions 12 et 20 (R_1 et R_2 respectivement **Figure 17**) peuvent être acylés avec les des groupements présentés à la **Figure 19**.

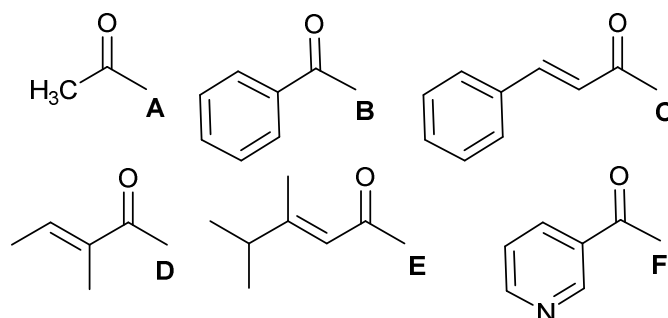
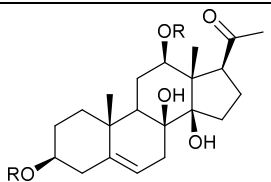
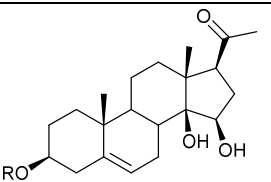
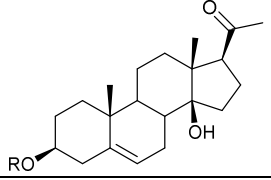
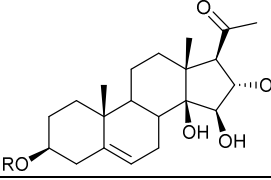
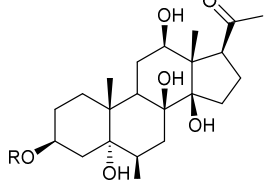
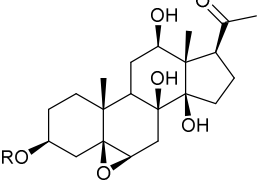


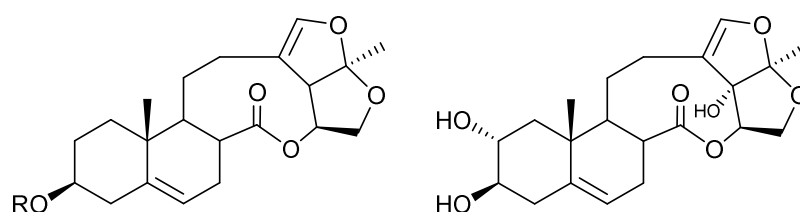
Figure 19 Substituants possibles des positions 12 et 20 du noyau prégnane : acétyl (A), benzoyl (B), *E*-cinnamoyl (C), tigloyl (D), 3,4-diméthyl-2-penténoyl (E) et nicotinoyl (F).

D'autres prégnanes identifiés dans le genre *Cynanchum* sont décrits dans la littérature avec un noyau plus ou moins hydroxylé par rapport à celui de la désacétylmetaplexigénine. (**Tableau 5**)

Tableau 5 Motifs d'hydroxylation du noyau prégnane moins fréquents chez les espèces de *Cynanchum*.

	<i>C. caudatum</i> <i>C. sibiricum</i>		<i>C. hancockianum</i> <i>C. forrestii</i>
	<i>C. komarovii</i>		<i>C. boerharifolium</i>
	<i>C. caudatum</i>		<i>C. caudatum</i>

Chez les *Cynanchum* asiatiques ainsi que chez le dompte-venin, des transformations au niveau du noyau D prégnanique peuvent conduire à des 14,15-secoprégnanes, par ouverture du noyau prégnane entre les carbones des positions 14 et 15 (**Figure 20**). C'est le cas des analogues de la glaucogénine ou de la hancogénine B (Bai, 2008; Chen et al., 2011; Fu et al., 2007; Lavault, 1999; Qiu et al., 1991; Warashina et Noro, 2006).

**Figure 20** noyaux de seco-prégnanes : glaucogénine (à gauche) et hancogénine B (à droite).

De plus, des nor-prégnanes (possédant 20 carbones au lieu de 21) comme la cynajapogénine (**Figure 21**) sont aussi décrits dans certains *Cynanchum* originaires d'Asie (Bai et al., 2009; Y. Liu et al., 2007; Yeo, 2002).

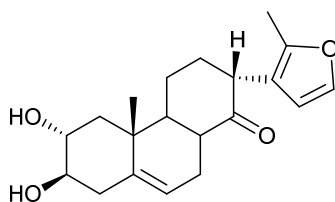


Figure 21 Structure d'un nor-prégnane : la cynajapogénine.

Il y a que deux références sur l'étude phytochimique d'espèces de *Cynanchum* africaines. L'étude de *C. africanum* a révélé des glycosides de prégnanes ayant la cynafogénine comme aglycone (Tsukamoto, 1985) (**Figure 22**).

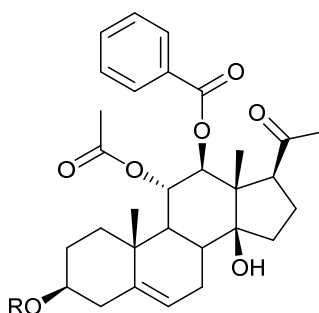


Figure 22 Structure de la cynafogénine, isolée de *C. africanum*

L'étude de *Cynanchum viminalis* (= *Cynanchum aphyllum* = *Sarcostemma viminalis*, (Albers et Meve, 2004)) a montré la présence de 8,14-secoprégnanes (**Figure 23**) (Kanchanapoom et al., 2002) ainsi que des analogues benzoylés de la sarcostine (Vleggaar et al., 1993).

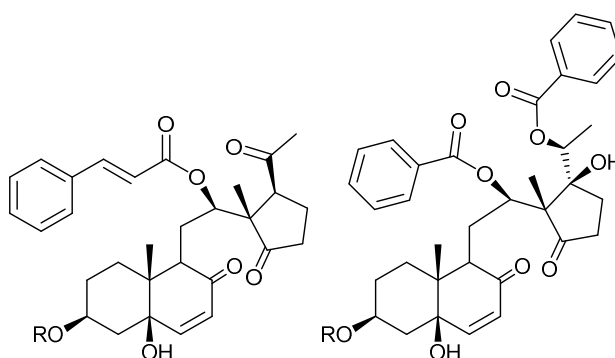


Figure 23 8,14-secoprégnanes isolés de *C. aphyllum*

3. Les prégnanes

La classe des métabolites qui caractérise toute la sous-famille des Asclépiadoïdées (comme les genres *Cynanchum*, *Hoodia*, *Caralluma*, *Ceropegia*) est celle des prégnanes. Ces métabolites présentent de grandes variétés structurales et un large éventail d'activités biologiques.

3.1. Biosynthèse

Les prégnanes sont des composés stéroïdiques composés de 21 carbones et proviennent d'une transformation des stérols. Leur biogenèse est en effet liée à la voie de biosynthèse des terpènes qui sont des produits de polymérisation de l'unité isoprène (Bruneton, 2009).

L'isoprène, qui est la base commune de tous les terpènes, est issu soit de la voie du mévalonate dans le cytoplasme, soit par la voie du MEP (méthyl-érythritol-4-phosphate) dans les plastides (Bruneton 2009). La condensation de deux unités isopréniques (5 carbones) conduit à la formation d'une unité géranylpyrophosphate (GPP à 10 carbones) dont la condensation avec une autre unité isoprénique conduira à la formation du farnésylpyrophosphate (FPP à 15 carbones). La condensation de deux unités FPP génère le squalène (à 30 carbones). Suite à l'oxydation en 2,3-époxy-squalène, la structure est cyclisée par la 2,3-époxy-squalène cyclase et génère un stérol tétracyclique (**Figure 19**, (Bruneton, 2009).

La cyclisation va transformer le groupement époxyde en un hydroxyle secondaire en position 3 qui constitue le groupe hydroxyle caractéristique de la plupart des triterpènes (sauf les hopanes et les farnanes). Chez les végétaux, la cyclisation va conduire majoritairement à la formation du cycloarténol, mais la transformation en noyau prégnane aura lieu majoritairement à partir du cholestérol (secondairement du stigmastérol) suite au clivage de la chaîne latérale en position 17 (Brown 1998; Bruneton 2009; Kreis et Mller-Uri 2010; Lindemann et Luckner 1997). Le cholestérol est un stérol caractéristique des animaux et issu de la transformation du lanostérol. Cependant, on le retrouve dans les végétaux en quantités plus ou moins importantes en fonction de l'espèce, notamment chez certaines espèces de Solanacées ou chez la digitale (Kreis et Mller-Uri, 2010).

La transformation du cholestérol en prégnénolone a été étudiée chez *Marsdenia tenacissima* qui appartient à la sous-famille des Asclepiadoïdées, ainsi que chez la digitale car le noyau prégnane est un intermédiaire de la biosynthèse des hétérosides cardiotoniques (Bruneton, 2009; Lindemann et Luckner, 1997). L'étape clé de cette transformation est le clivage de la chaîne latérale par la mono-oxygénase SCCE (*side chain-cleaving enzyme*) du cholestérol (à 28 carbones), ce qui va conduire à la formation de la prégnénolone (prégn-5 α -3 β -ol-20-one, à 21 carbones) (Bruneton, 2009; Lindemann et Luckner, 1997; Richter et Reymond, 1993; Zheng et al., 2014).

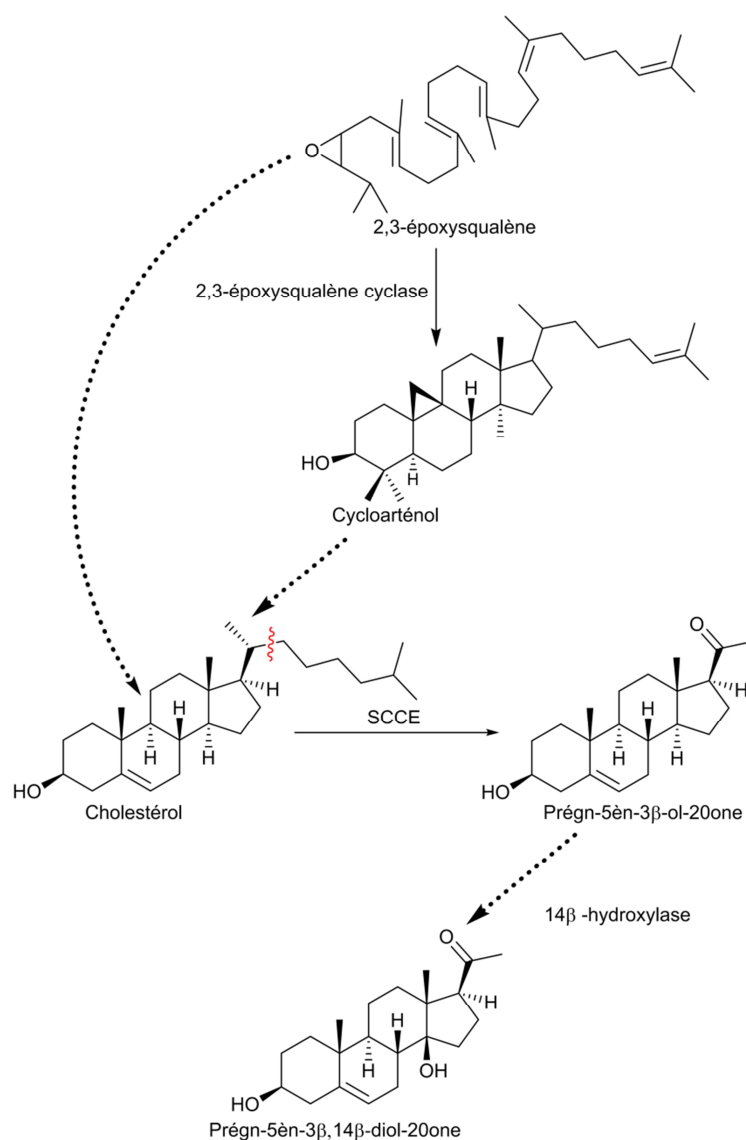


Figure 24 Schéma de biosynthèse des prégnanes. En pointillé des voies enzymatiques non encore élucidées (Kreis et Mller-Uri, 2010).

Des études par incubation des cellules de *Digitalis lanata* avec des précurseurs marqués, montrent que la 14β-hydroxylation du noyau prégnane est le résultat d'un procédé enzymatique et pas de l'hydroxylation d'un précurseur insaturé à cette position (Kreis et Mller-Uri, 2010). A ce jour, l'existence d'une 14β-hydroxylase n'a pas été confirmée par l'observation une activité enzymatique chez les plantes concernées, comme cela a été observé pour le mycélium du champignon *Curvularia lunata* (laderets et al., 2007).

3.2. Activités biologiques

Les glycosides prégnaniques présentent un large spectre d'activités biologiques :

- effets antiviraux et antifongiques (Yoon et al., 2011),
- effets inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Lee et al., 2005),
- effets anti-dépresseurs (Yang et al., 2011),
- effets immuno-modulateurs (Ma, 2011),
- effets cytotoxiques avec activité MDR (*Multi Drug Resistance*) (Ma, 2011), pro-apoptotiques (Peng et al., 2011) et anti-tumoraux (Peng et al., 2008).

Les effets anorexigènes de *Hoodia gordonii* ont été attribués au prégnane dénommé P57AS3 ou plus couramment P57 (**Figure 25**, Van Heerden, 2008). Des chercheurs ont observé des analogies structurales entre le P57 et les glycosides cardiotoniques et ont supposé l'implication du transporteur Na^+/K^+ ATPase. En effet, dans un modèle murin, l'administration intracérébrale du P57 entraîne une diminution de la prise alimentaire des animaux traités. Cet effet est médié par une diminution des niveaux ATP dans les hypothalami des souris traitées (MacLean et Luo, 2004).

En raison de l'absence de données pharmacocinétiques mettant en évidence la capacité du P57 à traverser la barrière hémato-encéphalique, une équipe de chercheurs a réalisé des essais *in vitro*, en utilisant la lignée HuTU-80 (cellules humaines d'intestin grêle proximal). Elle a montré que le P57 exerce ses effets coupe-faim en stimulant la sécrétion de l'hormone anorexigène, la cholécystokinine (CCK). En utilisant des outils d'électrophysiologie, les chercheurs ont observé que les cellules intestinales se dépolarisent suite à l'activation sélective de deux RCPG de perception de l'amertume, le TAS2R7 et le TAS2R14. Dans le cadre d'une étude de relation structure-activité, Il s'est avéré que l'aglycone du P57 est plus efficace que le P57 pour la stimulation de ces deux récepteurs. La substitution du noyau prégnane avec l'acide tiglique en position 12 s'est avérée indispensable pour l'activation des TAS2R car la saponification de cet ester abolit l'activation de ces récepteurs. Dans la même étude, un essai *ex vivo* (en exposant l'intestin des rats à une solution de P57 de 100 μM) a révélé une stimulation de 160 % de la sécrétion du GLP-1 (Le Nevé et al., 2010).

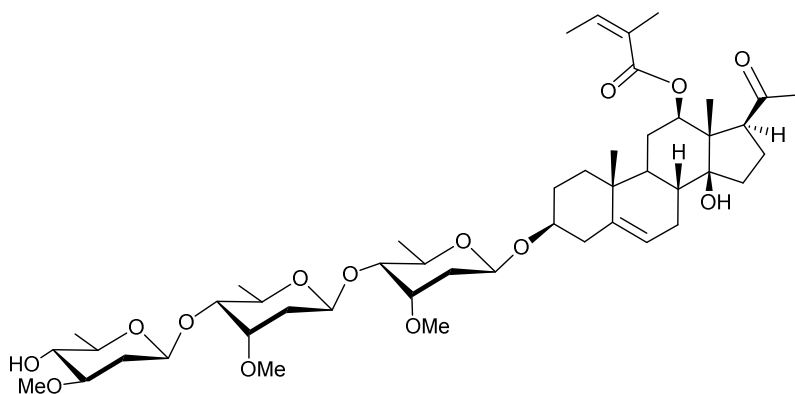


Figure 25 Structure du prégnane P57 de *Hoodia gordonii*

En 2014, Zhang et ses collègues ont mis en évidence le gordonoside F, un glycoside prégnanique portant un β -D-cymarose supplémentaire par rapport au P57, comme étant le composé responsable des effets anorexigènes et hypoglycémiant de *Hoodia gordonii*. Ses effets biologiques s'expliquent par l'activation du récepteur RCPG, le GPR 119, qui est localisé à la fois au niveau des cellules intestinales et pancréatiques. Dans un modèle *in vivo*, le gordonoside F s'est avéré être un sécrétagogue du GLP-1, avec 160 % de stimulation de cette incrétine (Shuyong Zhang et al., 2014).

Résultats et discussion

4. Analyses phytochimiques

Suite au criblage d'extraits issus du genre *Cynanchum* trois espèces ont été retenues pour leur activité biologique. Des lots de *Cynanchum marnierianum* et *Cynanchum menarandrense* ont été réceptionnés en quantité suffisante pour la séparation de métabolites secondaires tandis que l'extrait de *Cynanchum descoingsii* a été soumis à des analyses chromatographiques comparatives à l'échelle analytique.

4.1. Isolement bioguidé des métabolites de parties aériennes de *Cynanchum marnierianum* Rauh.

Différents lots ont été utilisés lors de cette étude, provenant de biotopes différents et récoltés à des stades végétatifs différents. Les deux premiers lots nous ont été gracieusement fournis par le Jardin Exotique de Monaco, et nous ont servi pour le criblage préliminaire afin de détecter et confirmer *in vitro* l'activité sécrétagogue de l'extrait éthanolique. *C. marnierianum* étant originaire de Madagascar, il était intéressant d'étudier d'éventuelles variations chez des spécimens poussant dans leur biotope naturel. Ainsi deux autres lots obtenus à des stades végétatifs différents nous ont été fournis par l'Arboretum d'Antoskay à Madagascar. Enfin, quatre pieds de *C. marnierianum* cultivés sous serre dans le Sud-Ouest de la France ont servi de biomasse pour la majorité du travail d'isolement. Ces différents lots seront codifiés de la façon suivante dans le manuscrit (Tableau 6) :

Tableau 6 Liste des lots de *C. marnierianum*

Code	Nature du lot
Cym_Mo_08_11	<i>C. marnierianum</i> récolté à Monaco en août 2011
Cym_Mo_03_12	<i>C. marnierianum</i> récolté à Monaco en mars 2012
Cym_Ma_05_12	<i>C. marnierianum</i> récolté à Madagascar en mai 2012
Cym_Ma_09_12	<i>C. marnierianum</i> récolté à Madagascar en septembre 2012
Cym_Fr_10_12	<i>C. marnierianum</i> récolté en France en octobre 2012

4.1.1. Comparaison par HPLC-DAD de différents lots de *Cynanchum marnierianum*.

Des analyses chromatographiques par HPLC-DAD (**Figure 26**) ont été réalisées avec le gradient (i) (voire 9.2 page 133) sur les extraits éthanoliques des lots de *C. marnierianum* issus de Monaco (Cym_Mo) ainsi que sur un des lots de Madagascar (Cym_Ma_05_12) afin d'obtenir des informations préliminaires sur la composition phytochimique de cette espèce et d'observer si le lieu ou la période de récolte influent sur celle-ci. Les profils UV des pics détectés à 198 nm ne sont pas été caractéristiques d'une classe spécifique des métabolites secondaires. La comparaison des empreintes chromatographiques des différents échantillons disponibles montre qu'il n'y a pas de variations qualitatives significatives du profil phytochimique des extraits ni en fonction de la période de récolte (pour les lots récoltés à Monaco en août 2011 et mars 2012) ni en fonction du biotope de récolte (lots provenant du jardin exotique de Monaco ou de l'Arboretum d'Antsokay de Madagascar).

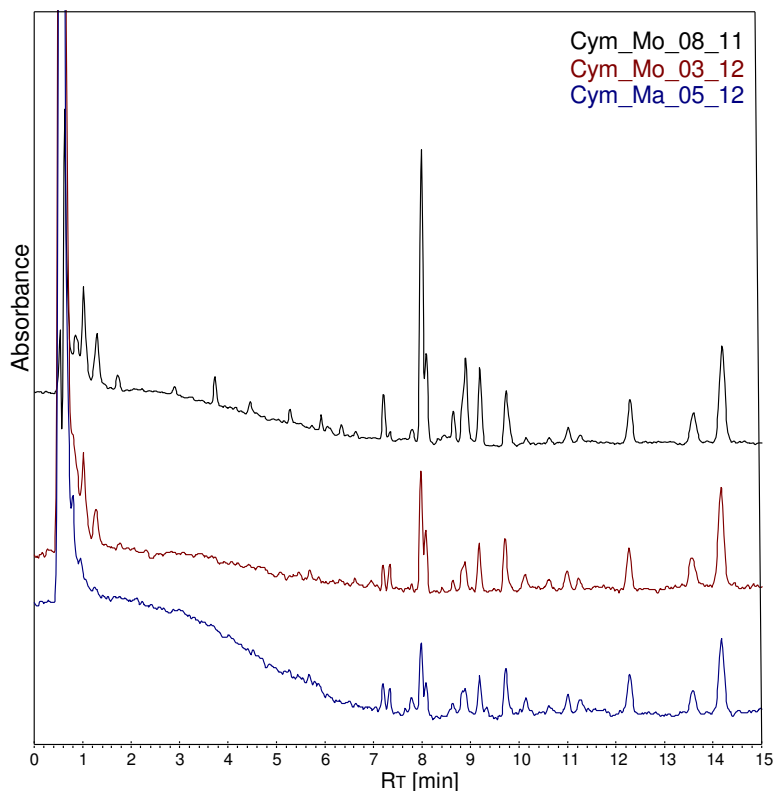


Figure 26 Comparaison des profils HPLC-DAD (198 nm) des extraits éthanoliques de différents lots de *C. marnierianum*. Gradient (i)

Pour des raisons d'approvisionnement suffisant en matière première, l'investigation phytochimique a été par la suite réalisée sur le lot de *C. marnierianum* provenant d'une serre dans le Gers (**lot Cym_Fr_10_12**) et sur le lot **Cym_Ma_09_12** provenant de l'arboretum d'Antsokay à Madagascar. Une analyse comparative des profils HPLC-DAD (**Figure 27**) en utilisant le gradient (ii) a révélé l'absence de différences qualitatives majeures entre ces deux lots.

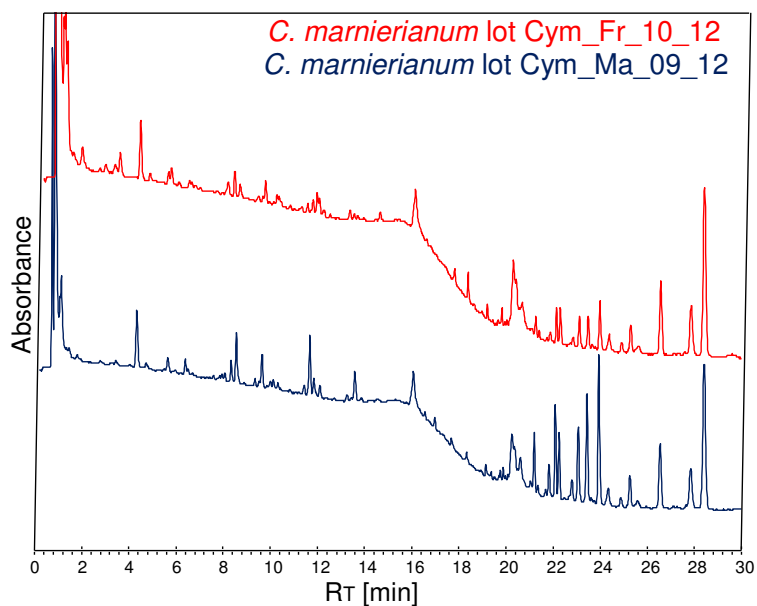


Figure 27 Comparaison des profils HPLC-DAD (198nm) des extraits éthanoliques de deux lots de *C. marnierianum* : cultivé (en rouge, lot Cym_Fr_10_12) et sauvage (en bleu, lot Cym_Ma_09_12). Gradient (ii)

4.1.2. Fractionnement bio-guidé du lot Cym_Fr_10_12

L'extrait méthanolique ainsi que la phase aqueuse issue du partage liquide/liquide (H_2O : cHex) de l'extrait éthanolique (CymF) de *C. marnierianum* n'ont pas présenté d'activité sécrétagogue GLP-1 *in vitro* contrairement à la phase cyclohexanique. Ainsi les analyses phytochimiques se sont concentrées sur cette fraction. Suite à son fractionnement par extraction sur phase solide de silice, 15 fractions A à O sont obtenues puis évaluées pour leur effet sécrétagogue GLP-1. La fraction L (éluee avec Et_2O : AcOEt 50:50) et la fraction M (éluee avec 100 % d'AcOEt) sont les plus actives (**Figure 28**). La fraction M a fait l'objet de fractionnements supplémentaires ; quant à la fraction L, sa complexité associée à la faible quantité disponible (97,3 mg) n'ont pas permis l'isolement de métabolites secondaires.

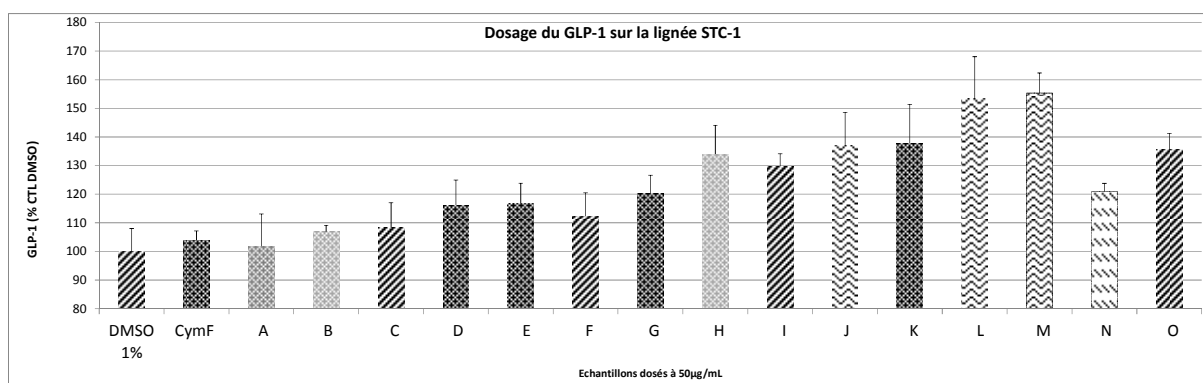


Figure 28 Evaluation de l'effet sécrétagogue GLP-1 des fractions SPE A à O de la phase AcOEt obtenues, n=2

Le fractionnement de la fraction bioactive M est réalisé en utilisant la chromatographie de partage centrifuge (CPC). La sélection du système biphasique est guidée par les données de la littérature : il s'agit de mélanges de solvants composés de *n*-hexane, AcOEt, méthanol et eau (HEMWat, Brent Friesen et Pauli 2005). Pour des raisons de sécurité, le *n*-hexane est remplacé par le cyclohexane. Suite aux essais de plusieurs proportions de ces solvants, c'est le système quaternaire cHex:AcOEt:MeOH: H_2O (6:5:6:5 ; v/v) qui est retenu pour ce fractionnement par CPC. Le choix de ce système est basé sur le calcul des coefficients de partage des composés majoritaires entre la phase supérieure et la phase inférieure. Ainsi, la phase supérieure est chargée dans le rotor CPC comme phase stationnaire et la phase inférieure sert de phase mobile. Lors d'une analyse de 150 minutes, 48 fractions sont collectées. 16 fractions supplémentaires sont également collectées pendant l'extrusion de la phase stationnaire.

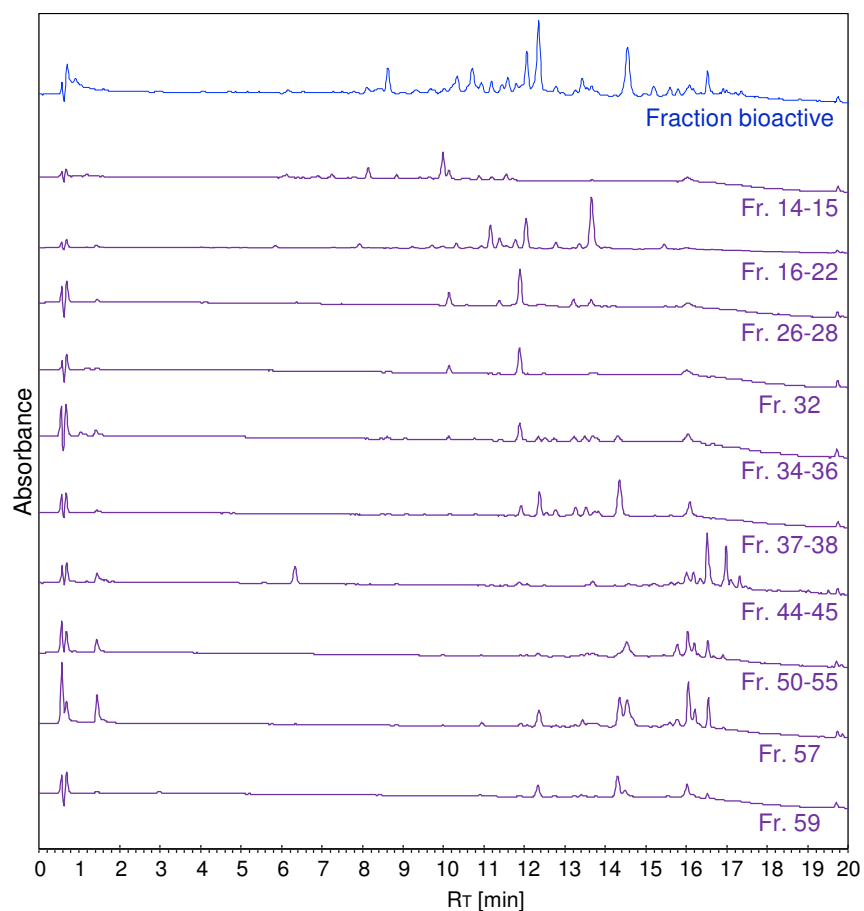


Figure 29 Analyse par HPLC-DAD (198 nm) avec le gradient (ii) de la fraction Cym M et des fractions principales issues de son fractionnement par CPC.

Le profil chromatographique de la fraction 32 (3,2 mg) (**Figure 29**) est considéré comme satisfaisant pour réaliser des analyses spectrales qui ont conduit à l'identification du composé **O**.

4.1.3. Isolement des métabolites ubiquitaires du lot Cym_Fr_10_12

4.1.3.i. Isolement des composés K, L et M

Parmi les 15 fractions A à O obtenues par extraction sur phase solide de la phase cyclohexanique, la fraction C éluée avec cHex : Et₂O (98 : 2) a été la fraction majoritaire (1198,6 mg soit 25,77 % de la fraction cyclohexanique). Bien que peu active, celle-ci fait l'objet d'analyses phytochimiques afin de contribuer à la connaissance de la composition chimique de *C. marnierianum*. La fraction C est fractionnée sur une cartouche SPE afin de donner les fractions CA, CB, CC et CD (**Figure 31**).

- La fraction CB a été ensuite fractionnée sur une colonne ouverte de silice en donnant 24 fractions. La fraction CB24 contient le composé **N** (2,4 mg).
- La fraction CC fait l'objet d'un fractionnement par CPC. Compte tenu du caractère très apolaire de la fraction, des systèmes biphasiques non-aqueux sont privilégiés pour que les composés se partagent entre les deux phases. En se basant sur la littérature relative à l'isolement des composés apolaires par CPC (Xiao, Yuan, et Li 2013; Yao et al. 2007) et suite à des optimisations, c'est le système biphasique Heptane:ACN:MeOH (5:5:3 ; v/v) qui est retenu. La phase supérieure est utilisée comme phase stationnaire et la phase inférieure est injectée avec un débit de 5 ml/min. La rotation du rotor a été fixée à 1100 rpm, permettant ainsi de purifier le composé majoritaire de cette fraction élué 45 minutes après l'injection de l'échantillon (**Figure 30**) (composé **M** 7,4 mg).

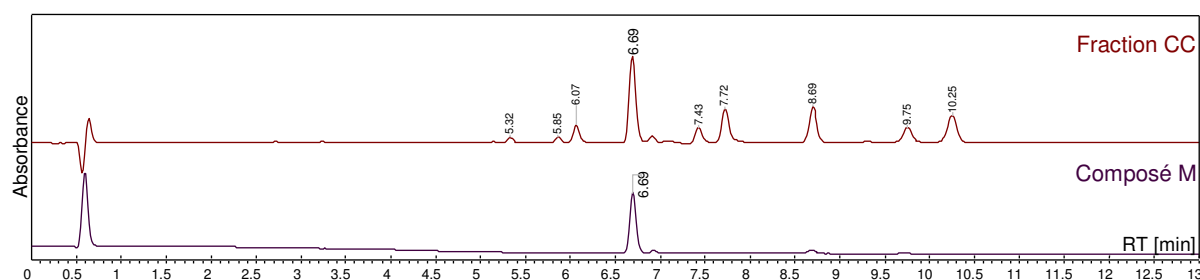


Figure 30 Profils HPLC-DAD (198 nm) de la fraction CC et du composé **M**, isolé par CPC. Analyse HPLC effectuée avec le gradient (iii).

- La fraction F est aussi fractionnée par CPC. Le système biphasique Heptane:ACN:MeOH (5:5:3 ; v/v) s'est avéré aussi adapté pour cette fraction. De la même manière, la phase supérieure est utilisée comme phase stationnaire à 1200 rpm et la phase inférieure est poussée avec un débit de 6 ml/min en conduisant à l'isolement du composé **L** (26,6 mg).

4.1.3.ii. Isolement du composé Q

Afin d'analyser la partie insoluble qui se forme entre la phase aqueuse et la phase cyclohexanique, celle-ci (347,5 mg) est solubilisée dans un mélange AcOEt : MeOH (1:1) et soumise à une chromatographie d'exclusion pour générer 4 fractions (I à IV, **Figure 31**). A partir de la fraction IV (5,4 mg), le composé **Q** (2,4 mg) est purifié par SPE-C18.

L'ensemble des étapes de fractionnement de l'extract éthanolique de *C. marnierianum* (Cym_Fr_10_12) se résume dans le schéma de la **Figure 31**.

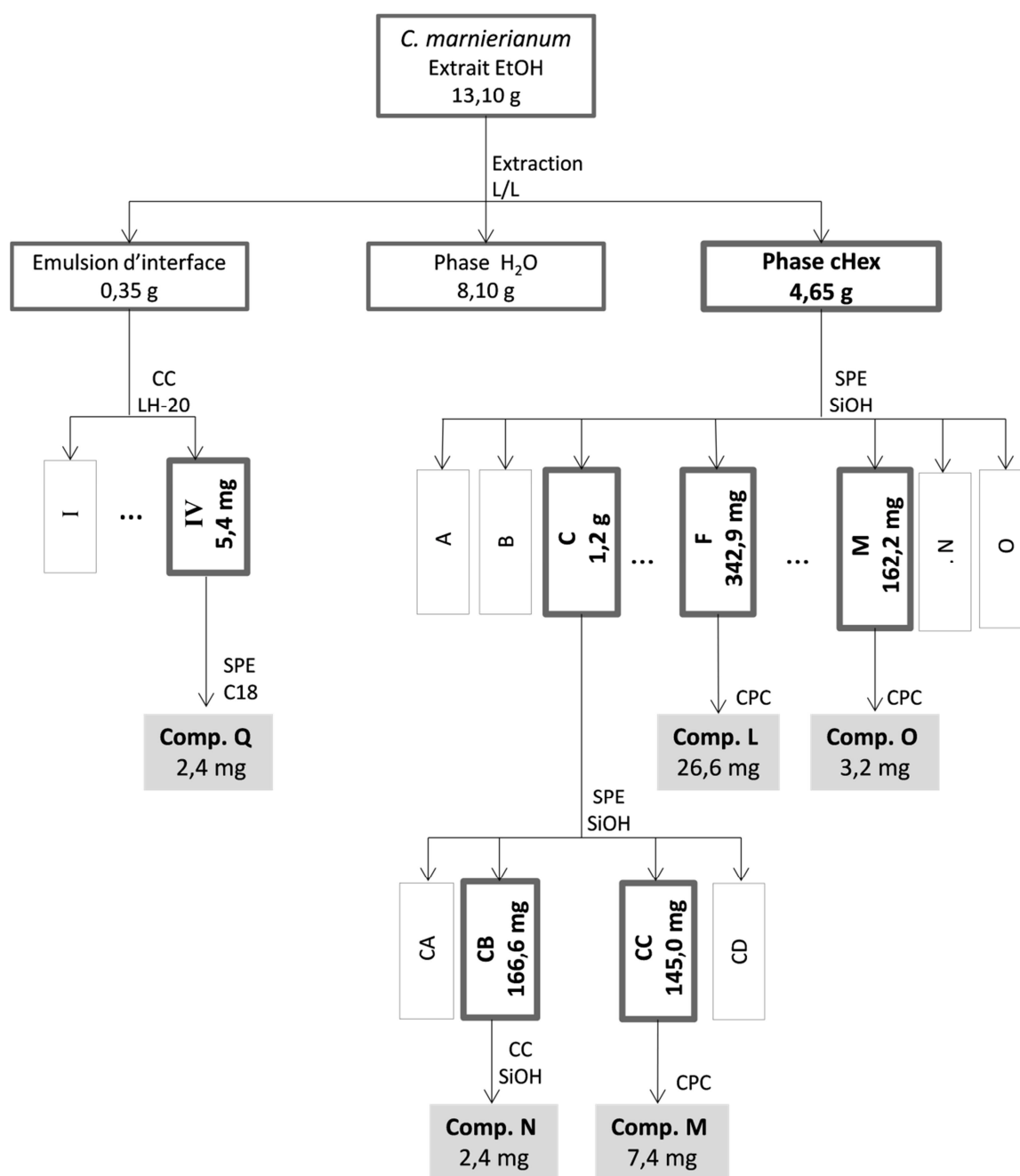


Figure 31 Schéma de fractionnement de l'extrait éthanolique de *C. marnierianum* (lot Cym_Fr_10_12)

4.1.4. Fractionnement du lot Cym_Ma_09_12

Compte tenu des fractions bioactives de polarité intermédiaire obtenues par isolement bio-guidé à partir du lot Cym_Fr_10_12, l'extrait éthanolique du lot Cym_Ma_09_12 est partagé entre une phase aqueuse et une phase AcOEt. Cette dernière est fractionnée sur une cartouche SPE de silice en donnant 19 fractions.

Comme pour le lot Cym_Fr_10_12, les analyses phytochimiques ont été focalisées sur la fraction éluée avec 100 % d'AcOEt. Cette dernière est soumise à un fractionnement par VLC suivi par une étape de purification par HPLC-semi-préparative afin de conduire à l'isolement du composé **P** (0,9 mg).

4.2. Isolement des métabolites de *Cynanchum menarandrense* Jum. & H. Perrier.

Deux lots de *Cynanchum menarandrense* ont été réceptionnés de l'arboretum d'Antsokay à Madagascar à deux dates de récolte différentes :

- Le lot Cyme _05_12 récolté en mai 2012 et
- Le lot Cyme_09_12 récolté en septembre 2012

L'extrait éthanolique du lot Cyme _05_12 a servi pour le criblage des échantillons du genre *Cynanchum*. L'isolement des métabolites de *C. menarandrense* a été réalisé à partir de l'extrait éthanolique du lot Cyme _09_12.

L'évaluation de l'activité biologique des prégnanes de *C. marnierianum* oriente l'étude phytochimique de *C. menarandrense* vers la recherche et l'analyse des fractions contenant également des composés de nature prégnanique. L'extrait éthanolique de *C. menarandrense* (lot Cyme _09_12) est fractionné avec un partage entre eau : AcOEt suivi par le fractionnement de la phase AcOEt sur une cartouche SPE de silice. L'analyse CCM des fractions à partir de la deuxième fraction éluée avec le mélange AcOEt : MeOH (70 : 30 ; v/v) (**fraction Cyme M**) met en évidence des taches jaunes et bleues suite à la révélation de la plaque par la vanilline sulfurique, laissant supposer la présence des composés de nature terpénique. (**Figure 32**).

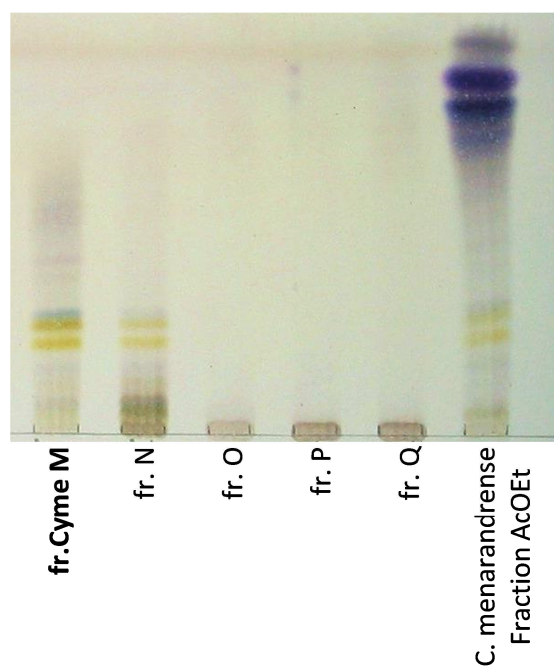


Figure 32 Analyse CCM des fractions SPE les plus polaires issues de la fraction AcOEt de *C. menarandrense* (lot Cyme _09_12, phase mobile : DCM : MeOH : H₂O 85 :15 :1, révélation : vanilline sulfurique 10 %).

Les analyses HPLC-UV-HRMS (**Figure 33**) de la fraction M suggèrent la présence de trois composés polaires de nature flavonoïdique d'après leur spectre UV ((Mabry, Markham, et Thomas 1970) ainsi que la présence d'autres composés de spectre UV non caractéristique (**Tableau 7**). La polarité de cette fraction M, les formules brutes calculées par la HRMS et la présence de des génines formées de 21 carbones, indique la présence de prégnanes au sein de cette fraction.

L'hydrolyse par la β -D-glucosidase d'un aliquote de la fraction M révèle que les composés les plus apolaires sont des hétérosides dont la partie osidique est le β -D-glucose. Au contraire, les trois composés les plus polaires, qui d'après leur spectre UV sont des flavonoïdes, ne sont pas affectés par la β -D-glucosidase. Ainsi en combinant les données HPLC-HRMS avec les observations de l'hydrolyse enzymatique, on peut déduire que cette fraction contient des prégnanes glycosylés avec du β -D-glucose et des flavonoïdes glycosylés avec une partie osidique ne comportant pas de β -D-glucose terminal.

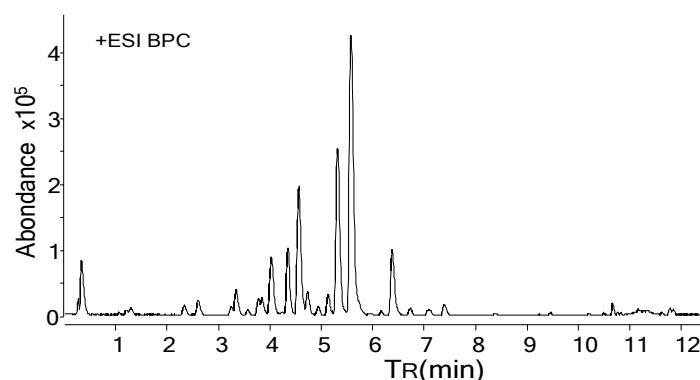


Figure 33 Chromatogramme HPLC-HRMS de la fraction Cyme M

Tableau 7 Résultats des analyses HPLC-UV-HRMS de la fraction Cyme M

T_R (min)	λ_{max} (nm)	Formule brute
3,33	204, 257 et 348	$C_{27}H_{30}O_{15}$
3,68	199, 280 sh	$C_{33}H_{52}O_{13}$
3,75	200, 263 et 342	$C_{27}H_{30}O_{14}$
3,97	200, 258 et 348	$C_{21}H_{20}O_{11}$
4,33	199, 280 sh	$C_{27}H_{42}O_9$
4,61	199, 280 sh	$C_{27}H_{42}O_9$
5,27	199, 280 sh	$C_{27}H_{42}O_8$
5,52	199, 280 sh	$C_{27}H_{42}O_8$
6,38	199, 280 sh	$C_{33}H_{52}O_{12}$

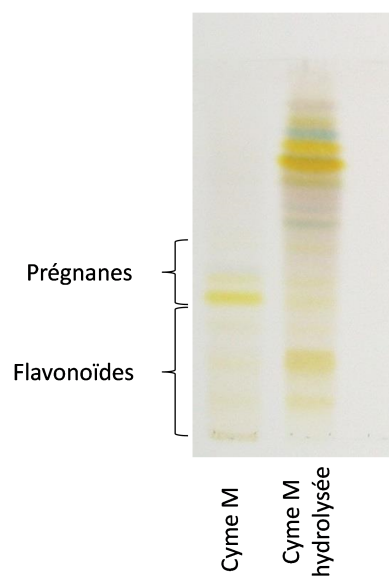


Figure 34 Suivi de l'hydrolyse enzymatique de la fraction M par CCM.

Phase mobile DCM:MeOH : H₂O 85:15:1, révélation : vanilline sulfurique (10 %)

4.2.1. Isolement des composés A-E et I-K

La fraction M a été fractionnée par HPLC semi-préparative pour donner 16 fractions dont 8 contiennent des produits purs : **A** (4,9 mg), **B** (2,3 mg), **C** (1,0 mg), **D** (3,8 mg), **E** (1,4 mg) ainsi que **I** (3,3 mg), **J** (4,0 mg) et **K** (0,7 mg).

Les analyses spectrales des composés isolés ont validé les analyses HPLC-DAD et HPLC-HRMS de la fraction C en démontrant que les composés **A-E** sont des prégnanes et que les composés **I-K** sont des flavonoïdes (**Figure 35**).

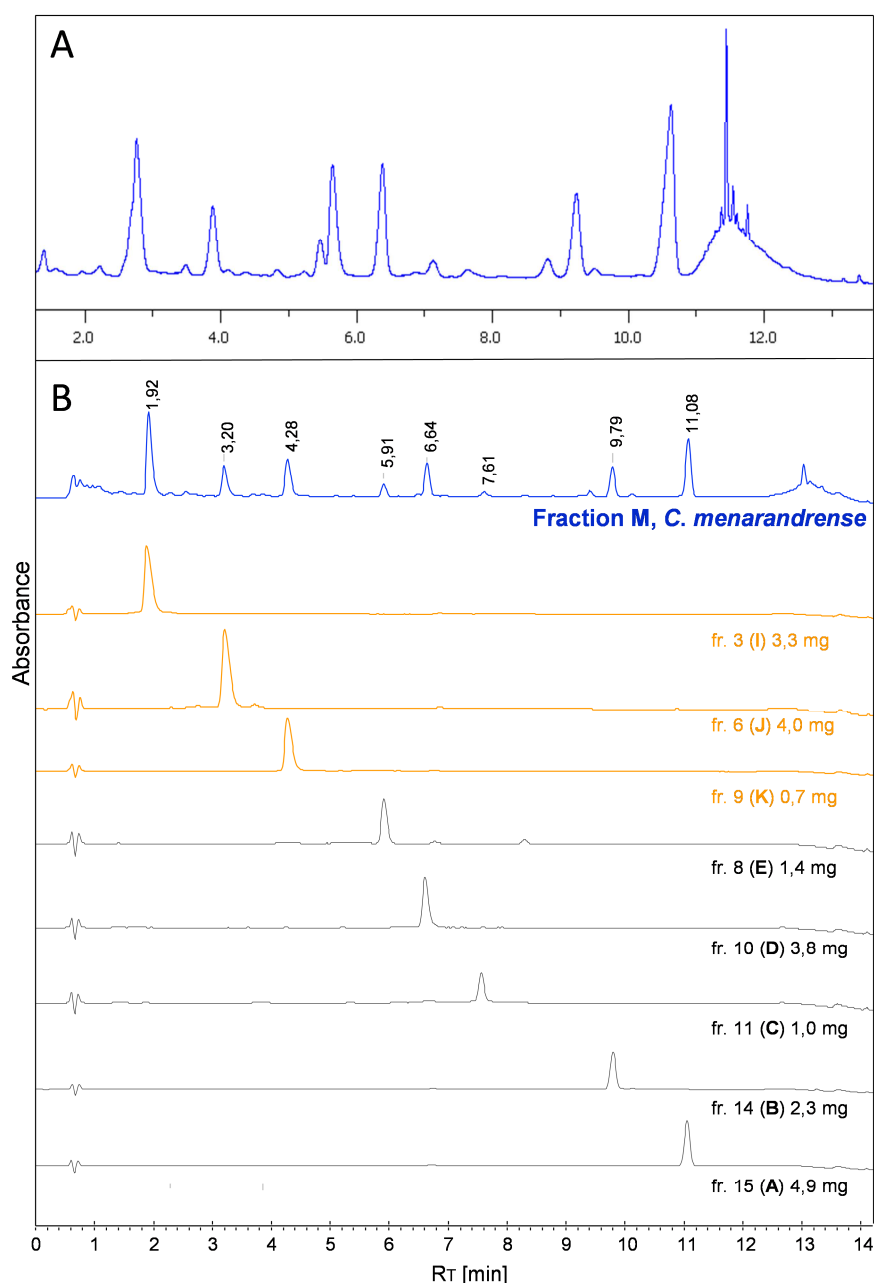


Figure 35 (A) Chromatogramme HPLC-UV-semi-préparative (200 nm) de la fraction Cyme M (B) Chromatogramme HPLC-DAD analytique (198 nm) de cette même fraction Cyme M ainsi que des fractions obtenues après fractionnement par HPLC semi-préparative. Les codes des composés purs sont indiqués entre parenthèse. En orange, les flavonoïdes (**I-K**) et en noir les prégnanes (**A-E**). Ces analyses ont été réalisées avec le gradient (iv).

4.2.2. Isolement des composés F, G et H

L'analyse par CCM de la fraction aqueuse de l'extrait de *C. menarandrense* a révélé des taches jaunes et bleues (**Figure 36**) comme celles observées lors de l'analyse de la fraction M de la phase AcOEt. Cette observation suggère la présence de prégnanes au sein de cette fraction. Ainsi la fraction aqueuse est soumise à une SPE en phase inverse en éluant avec un mélange d'acétonitrile et d'eau de polarité croissante, ce qui a généré 8 fractions.



C. menarandrense
Phase Aqueuse

Figure 36 Profil CCM de la phase aqueuse de l'extrait éthanolique de *C. menarandrense* (phase mobile : DCM : MeOH : H₂O 75 :15 :2,2 ; révélation à la vanilline sulfurique 10 %).

La fraction éluée avec ACN : H₂O (2:8) est par la suite soumise à un fractionnement par HPLC semi-préparative. Cette analyse conduit à l'isolement des composés **F** (2,4 mg) et **G** (1,8 mg) ainsi que des composés déjà isolés de la fraction Cyme M, les composés **C** (12,2 mg), **E** (10,0 mg) et **I** (3,8 mg).

La fraction éluée avec ACN : H₂O (3:7) est par la suite soumise à une SPE sur silice. La fraction éluée avec CHCl₃ : MeOH 85:15 contient le composé **H** purifié (3,4 mg).

L'ensemble des étapes de fractionnement de l'extrait éthanolique de *C. menarandrense* (Cyme _09_12) se résume dans le schéma de la **Figure 37**.

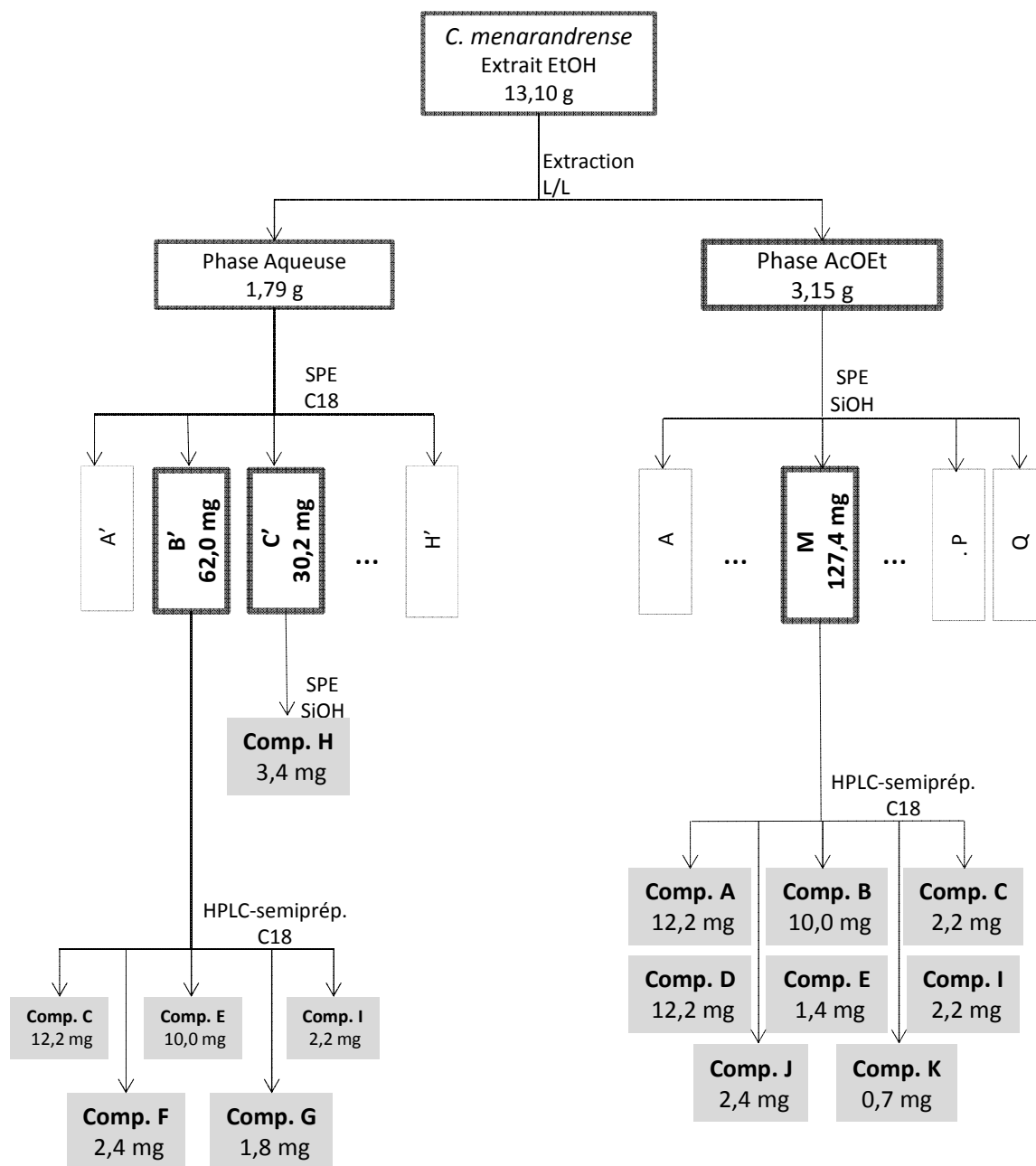


Figure 37 Schéma de fractionnement de l'extrait éthanolique de *C. menarandrense* (lot Cyme_09_12)

4.3. Analyse comparative de *C. descoingsii* avec *C. menarandrense*

La faible quantité de matière végétale de *C. descoingsii* reçue n'a pas été suffisante pour la réalisation des analyses phytochimiques à l'échelle semi-préparative. Comme l'extrait EtOH de cette espèce a été parmi les plus actifs, elle a été analysée par HPLC-DAD. Cette analyse, réalisée dans les mêmes conditions que celle de l'extrait de *C. menarandrense*, a mise en évidence des composés en commun entre les deux espèces. D'après leur spectre UV (199, 280 sh) et leur temps de rétention avec le gradient (iv), les composés détectés dans *C. descoingsii* correspondent aux composés **A**, **B**, **C**, **D**, **F** et **H** identifiés dans *C. menarandrense*.

L'analyse HPLC-UV-HRMS de l'extrait EtOH de *C. descoingsii* confirme cette observation par la déduction de formules brutes identiques à celles de ces composés.

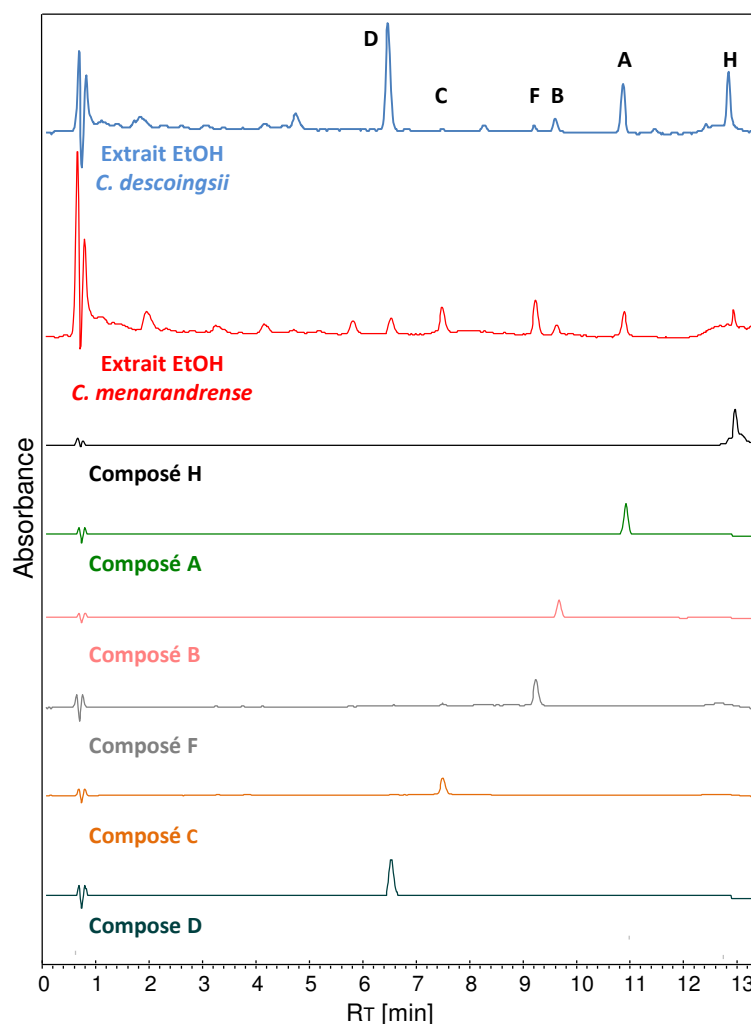


Figure 38 Comparaison des chromatogrammes HPLC-DAD analytiques (198 nm) des extraits EtOH de *C. descoingsii* et *C. menarandrense* ainsi que des composés isolés **A**, **B**, **C**, **D**, **F** et **H**. Ces analyses ont été réalisées avec le gradient (iv).

La présence des mêmes composés de nature prégnanique chez les espèces qui ont montré l'activité biologique la plus intéressante (voir 6.1.1 page 102), pourrait indiquer que les composés possédant un noyau prégnanique peuvent être responsables de l'activité biologique. De plus, on peut envisager l'utilisation de ces composés communs, comme des traceurs chimio-taxonomiques de certaines espèces malgaches de *Cynanchum*.

5. Détermination structurale des composés isolés

5.1. Détermination structurale des composés isolés de *Cynanchum menarandrense*

5.1.1. Détermination structurale du composé A

Le composé **A** est isolé sous forme de cristaux en forme d'aiguilles blanches. Le spectre UV du composé dans l'ACN présente un spectre UV non caractéristique (maximum à 199nm et épaule à 280nm).

L'analyse HPLC-ESI-HRMS en mode positif (**Figure 39**) indique la formule brute du composé **A** comme étant $C_{27}H_{42}O_8$ à partir de l'ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ observé à m/z 517,2764 (erreur 1,62 ppm). D'autres ions ont été observés à m/z 1011,5633 = $[2M+Na]^+$, 477,2838 = $[MH-H_2O]^+$, 333,2415 = $[MH-162]^+$, 315,2316 = $[MH-162-H_2O]^+$. L'ion à m/z 333,2415 = $[MH-162]^+$ peut être interprété comme le fragment du composé **A** ayant perdu un hexose, l'ion plus abondant à m/z 315,2316 = $[MH-162-H_2O]^+$ confirme la présence d'un hexose (L.-W. Qi, Chen, et Li 2009)

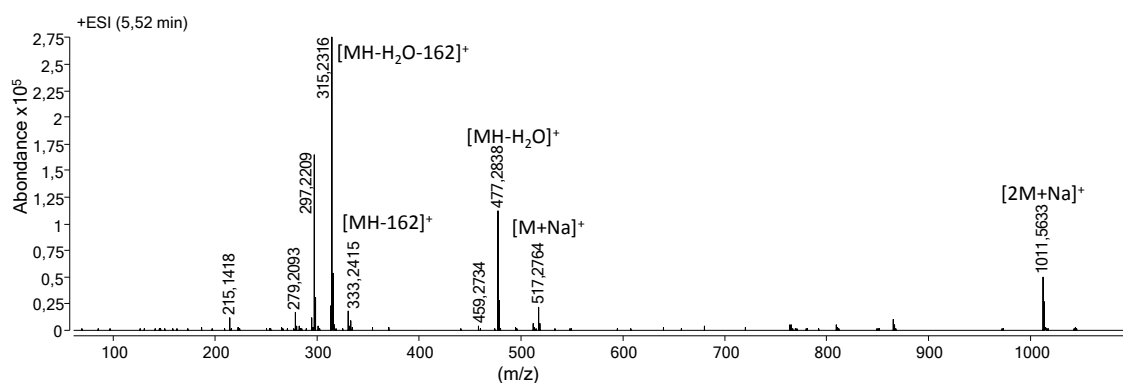


Figure 39 Spectre ESI-HRMS du composé **A**

Le spectre 1H -RMN (**Figure 40**) indique la présence d'un proton oléfinique (δ_{CH} 5,39), plusieurs protons dans la région des protons portés par des carbones oxygénés dont un étant caractéristique d'un proton anomérique. Plusieurs protons aliphatiques résonnent dans la région des hauts champs avec trois singulets qui intègrent pour trois protons chacun, suggérant la présence de trois méthyles.

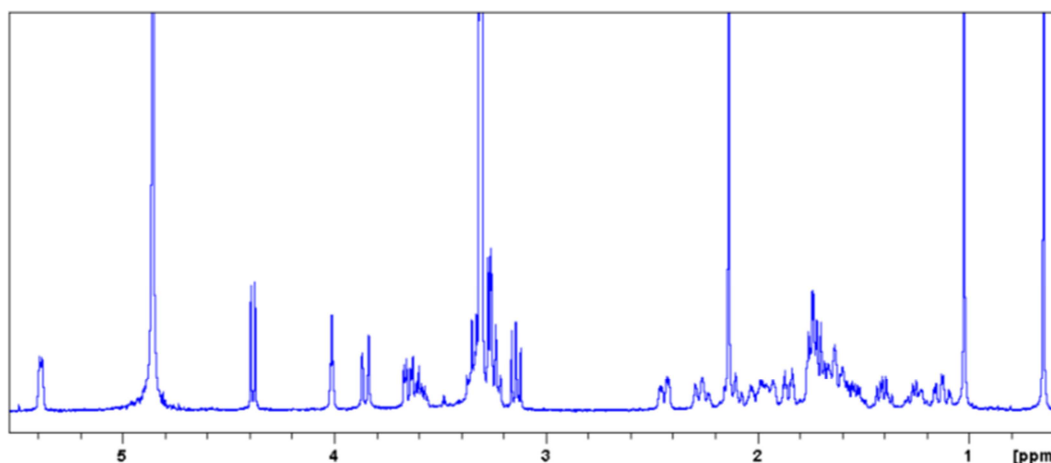


Figure 40 Spectre 1H -RMN du composé **A** (500MHz, méthanol- d_4)

Le spectre ^{13}C -RMN (**Figure 41**) confirme les informations obtenues par le spectre proton en validant en parallèle la présence de 27 carbones dans la structure du composé. De plus, à partir du signal à δC 212,9 la présence d'un groupement cétone est mise en évidence. En comparant les données du spectre ^{13}C -RMN avec celles des spectres DEPT-90° et DEPT-135°, le nombre des méthines (12), méthyles (3), méthylènes (8) et carbones quaternaires (4) est déduit (**Figure 41**).

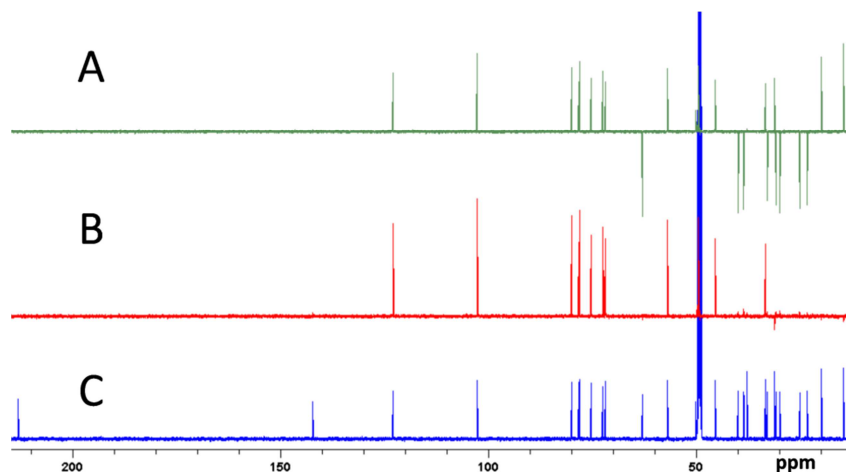


Figure 41 Comparaison des spectres DEPT-135°(A), DEPT-90°(B) et ^{13}C -RMN (C), du composé **A** (125MHz, méthanol- d_4)

La présence d'un hexose est vérifiée par les signaux ^{13}C -RMN et ^1H -RMN, notamment par les signaux de la position anomérique 1' (δC 102,6 et δH 4,39). La constante de couplage du proton anomérique de $J=7,8$ Hz avec le proton de la position 2' indique que l'hexose appartient à la série β . En observant les corrélations dans les spectres COSY et NOESY, on déduit qu'il s'agit du β -glucose avec les protons H1' (δH 4,39), H3' (δH 3,35) et H5' (δH 3,27) étant en dessous du plan du noyau pyrane et les protons H2' (δH 3,14), H4' (δH 3,26), H6'a (δH 3,85) et H6'b (δH 3,65) étant au-dessus du plan (**Figure 44**). L'hydrolyse avec la β -D-glucosidase (**Figure 42**) du composé **A** confirme qu'il porte du β -glucose en configuration D. La même observation est réalisée pour tous les prénanes isolés de *C. menarandrense*.

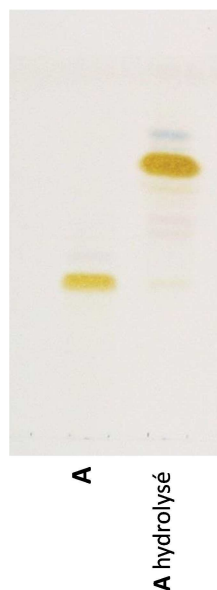


Figure 42 Suivi de l'hydrolyse enzymatique du composé **A** par CCM.

Phase mobile DCM:MeOH : H₂O 85:15:1, révélation : vanilline sulfurique (10 %)

Suite à la soustraction des carbones et des protons du glucose de la formule brute du glucoside, la formule brute de la génine est obtenue comme C₂₁H₃₂O₃ validée par le fragment à m/z 333,2415 = [MH-162]⁺ indiquant la nature prégnanique du composé **A**. Une observation qui est en accord avec la phytochimie du genre *Cynanchum* riche en prégnanes ainsi que le spectre UV non caractéristique des terpénoïdes. Les corrélations hétéronucléaires à longue distance HMBC (**Figure 45**) valident l'attribution des méthyles aux positions 18, 19 et 21 du noyau prégnane. Les déplacements chimiques des protons du méthyle de la position 21 (δ C 31,3 ; δ H 2,14) sont plus déblindés par rapport à ceux des autres méthyles à cause de la présence d'un groupement cétone en position α .

Les deux oxygènes de la génine sont portés par des méthines. Les corrélations observées dans les spectres COSY, HSQC et HMBC permettent leur détermination comme les méthines des positions 3 (δ H 3,60) et 12 (δ H 4,01). Le carbone du méthine de la position 3 corrèle dans le spectre HMBC avec le proton anomérique du glucose. Le glucose est donc fixé par une liaison β -glucosidique sur la position 3 du noyau prégnane. L'oxygène de la position 3 est d'orientation β (équatoriale) car l'orientation du proton de la position 3 (H-3) s'avère étant α (axiale) : le proton H-3 corrèle avec le proton H-1 α qui, à son tour, corrèle avec le proton H-9 dont l'orientation est définie comme α par la biosynthèse (voir 3.1, page 40). De plus la proximité dans l'espace du H-3 avec le proton anomérique H-1' du glucose est observée par la corrélation NOE entre les deux protons (**Figure 44**).

Le spectre ¹³C-RMN met en évidence deux carbones participant à une double liaison. Le spectre carbone et le spectre hétéronucléaire HSQC montrent qu'il s'agit d'un carbone quaternaire (δ C 142,1) et une méthine oléfinique (δ C 142,1 ; δ H 5,39). Les corrélations HMBC entre la méthine oléfinique et les carbones de la position 8 (δ C 33,3) et 4 (δ C 39,9) ainsi que les corrélations des protons de la position 1 (δ H 1,85 et 1,14) et 7 (δ H 2,00 et 1,61) avec le carbone oléfinique quaternaire permettent la détermination de la position de la double liaison entre les positions 5 et 6.

De plus les corrélations du spectre HMBC permettent la révélation de la position des autres carbones quaternaires aux positions 10 (δ_C 37,7), 13 (δ_C 49,2) et 20 (δ_C 212,9).

L'ensemble des données spectrales a permis la détermination du composé **A** comme étant un glucoside de la prégnénolone (3-hydroxy-prégn-5-èn-20-one) portant un hydroxyle supplémentaire à la position 12. De plus, les corrélations NOESY observées pour le composé **A** indiquent la même stéréochimie qui a été observée pour la prégnénolone ((Lancaster et al. 2007).

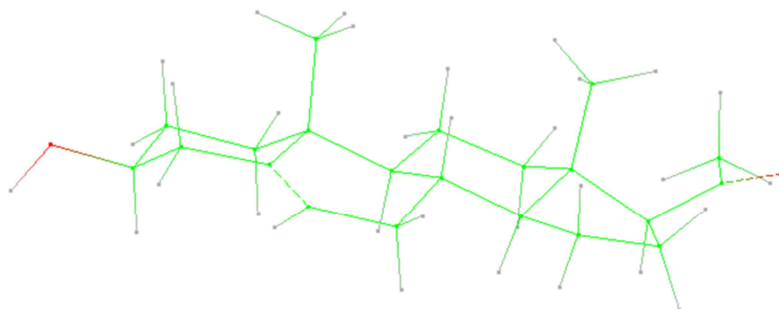
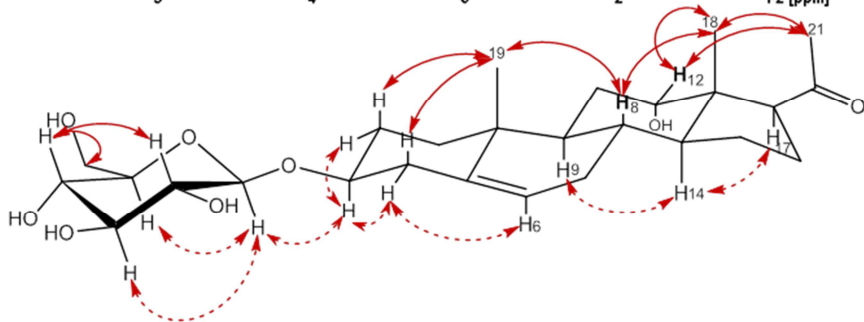


Figure 43 Structure de la prégnénolone (prégn-5-èn-20-one) par cristallographie aux rayons X (Lancaster et al., 2007)

L'orientation du proton H-12 (δ_H 4,01) s'est avérée comme étant β par sa corrélation NOE avec le méthyle-18. De plus, H-12 résonne comme un triplet large présentant une constante de couplage faible (2,7 Hz) qui confirme son orientation équatoriale, à savoir au-dessus du plan du noyau C prégnanique (**Figure 44**). Par conséquent, l'hydroxyle de la position 12 est d'orientation α . Dans le cas contraire, l'orientation équatoriale (β) de l'hydroxyle et axiale (α) du proton H-12, donnerait un doublet dédoublé avec des constantes de couplage de 11,9 et 3,5 Hz (Geoffroy et al. 2011).

1. Le proton H-17 s'avère d'orientation α par la corrélation NOESY qu'il présente avec le proton H-14 (**Figure 44**) et est déterminé par la biosynthèse des prégnanes qui est d'orientation α .
2. De plus, la cétone du groupement acétyle en orientation β résonne près des 210 ppm tandis que dans le cas contraire elle résonne vers 220 ppm (Garcia 2011).



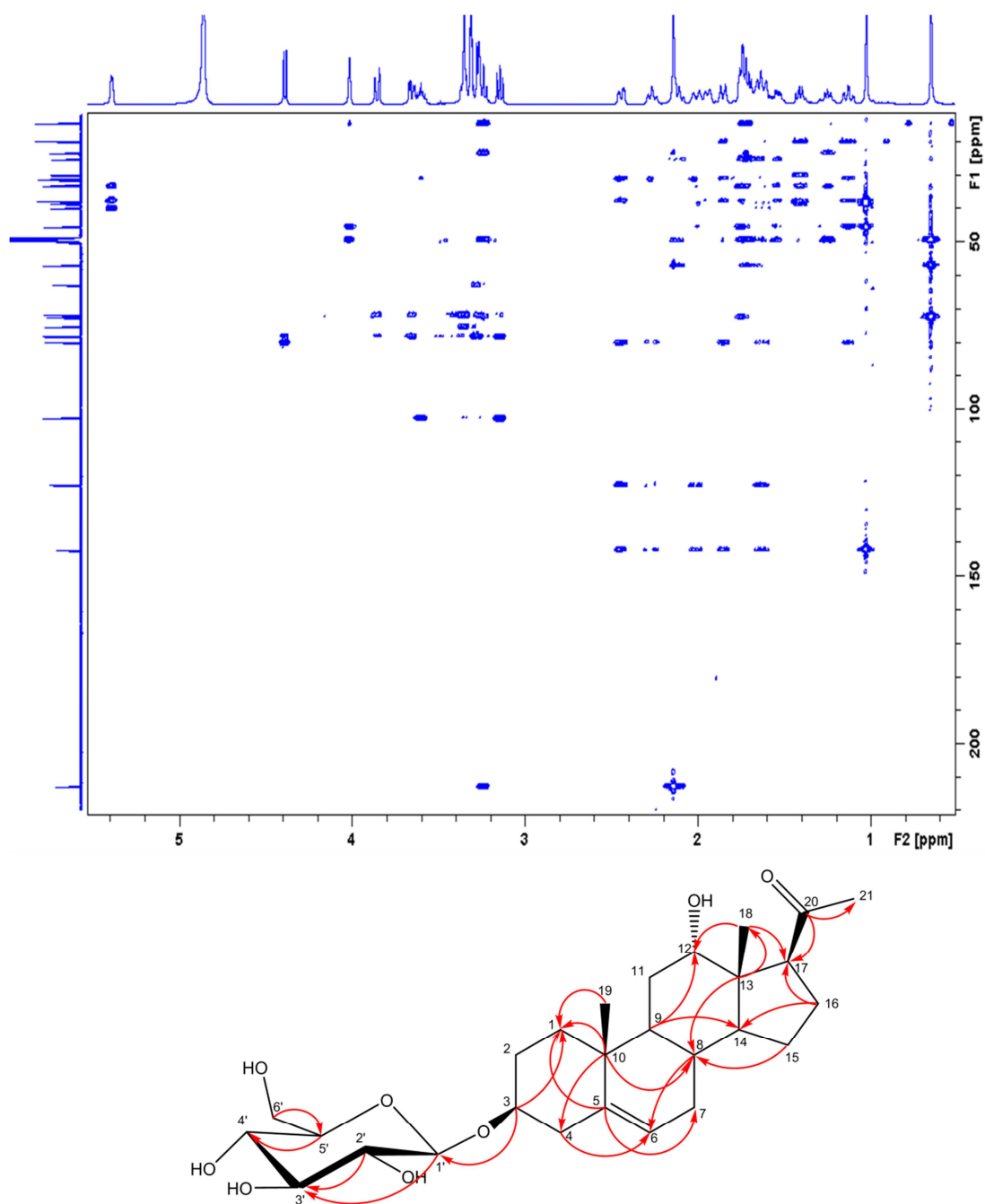


Figure 45 Spectre HMBC du composé **A** (500MHz, méthanol- d_4) avec la représentation schématique des corrélations C→H principales

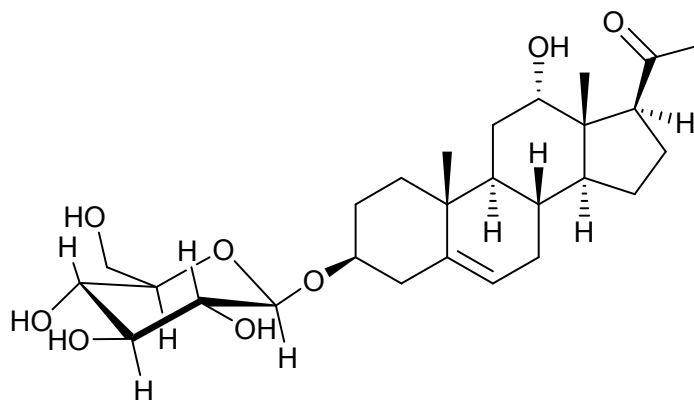


Figure 46 Structure du composé **A** : le ménarandroside I

Le composé **A** est un nouveau produit naturel que nous avons nommé **ménarandroside I**. La génine du ménarandroside I a été décrite comme produit intermédiaire de synthèse de la génine du prégnane P57 (Geoffroy et al., 2011). A noter que la présence de la génine, la 12 α -hydroxy-prégn-5-èn-20-one, a été signalée dans les sécrétions défensives du scarabée *Graphoderus cinereus*, illustrant un exemple de convergence de voies de biosynthèse dans les règnes animal et végétal (Schaaf, 2000).

5.1.2. Détermination structurale du composé B

Le composé **B** est obtenu sous forme de cristaux en forme d'aiguilles blanches. Le spectre UV du composé dans l'ACN n'est pas caractéristique car il présente un maximum à 199nm et un épaulement à 280nm.

L'analyse HPLC-ESI-HRMS en mode positif (**Figure 47**) a indiqué la formule brute du composé B comme étant C₂₇H₄₂O₈ à partir de l'ion pseudo-moléculaire [M+Na]⁺ observé à m/z 517,2764 (erreur 1,75 ppm). Il s'agit certainement d'un isomère de position du composé **A**. Le spectre ESI-HRMS révèle les ions à m/z 1011,5634 = [2M+Na]⁺, 477,2835 = [MH-H₂O]⁺, et 315,2316 = [MH-162-H₂O]⁺ qui indiquent la perte d'un hexose.

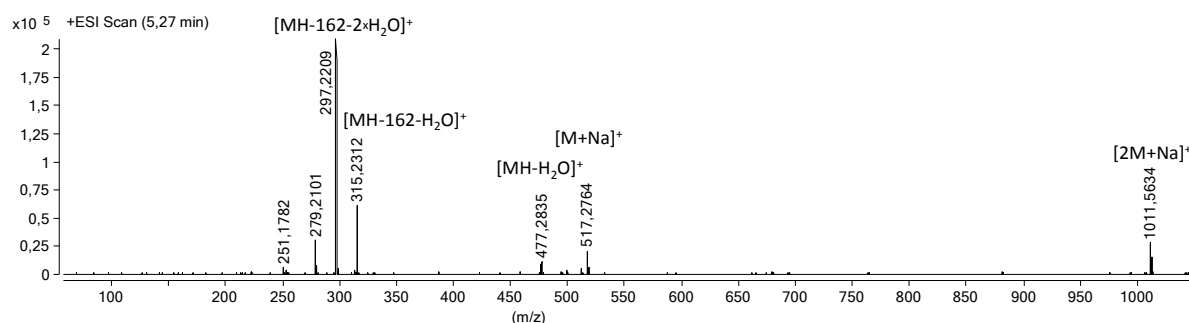


Figure 47 Spectre ESI-HRMS du composé **B**

Le spectre ¹H-RMN est similaire au spectre du composé **A**. Néanmoins, le signal caractéristique de la méthine oxygénée de la position 12 est absent. En parallèle, la résonance d'un quatrième carbone quaternaire est mise en évidence par le spectre ¹³C-RMN. Son déplacement chimique à 85,8 ppm suggère qu'il est porteur d'un hydroxyle. Les corrélations HMBC (**Figure 48**) de ce carbone quaternaire avec les protons des positions 15, 16 et le méthyle de la position 18 révèlent qu'il s'agit

du carbone de la position 14. L'hydrolyse avec la β -D-glucosidase du composé **B** confirme qu'il porte un β -D-glucose.

L'orientation de l'hydroxyle sur cet aglycone est déterminée par l'obtention des spectres RMN dans du DMSO- d_6 (voir annexe page 138) ainsi que par comparaison du déplacement chimique du carbone C-14 avec les données de la littérature (δ C-14 de la littérature étant à 85,1 ppm (Lee-Juian et al. 1994) Le composé **B** est donc le **3 β ,14 β -hydroxy-prègn-5-èn-20-one 3-O- β -D-glucopyranoside**, un isomère de position de l'hydroxyle du composé **A**.

La comparaison des données spectrales avec celles parues dans la littérature montre que le composé **B** est le **carumbelloside II**, précédemment isolé de *Caralluma umbellata* Haw (Lee-Juian et al. 1994). Le carumbelloside II possède des activités anti-nociceptives et anti-inflammatoires, mises en évidence *in vivo* (Ramesh et al. 1999). Il est à noter que *Caralluma umbellata* Haw comme d'autres espèces du genre *Caralluma*, sont traditionnellement utilisés pour leurs propriétés antidiabétiques. Cette activité antidiabétique a été validée par des études impliquant des expérimentations *in vitro* et des essais *in vivo* (Bellamakondi, Godavarthi, et Ibrahim 2014).

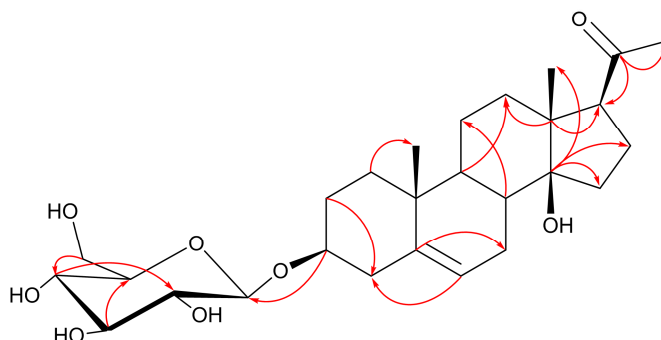
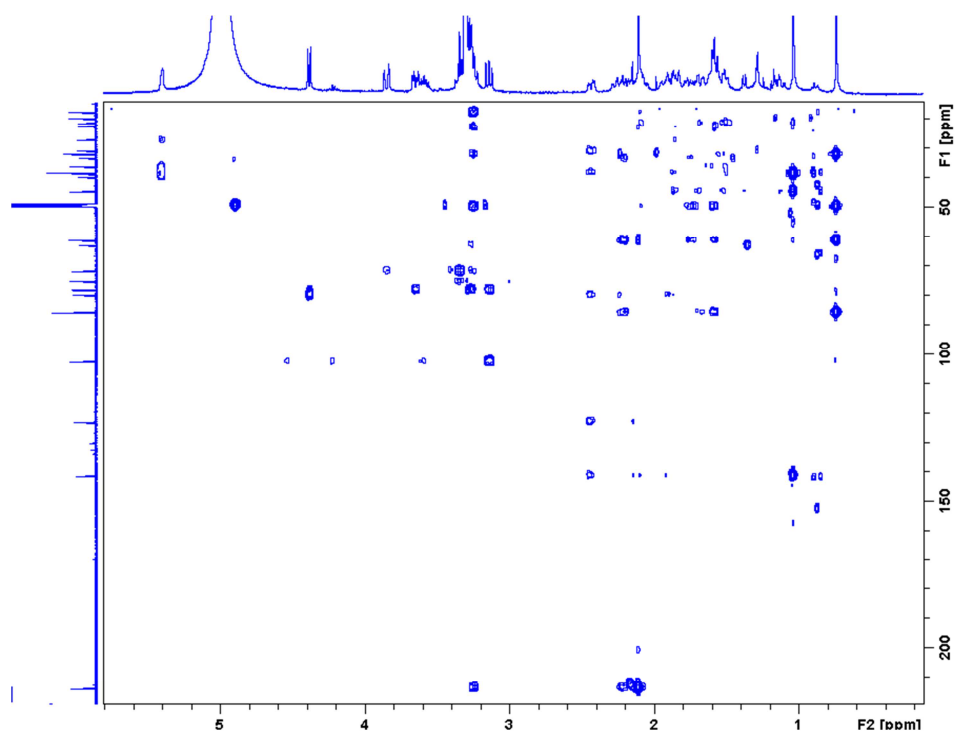


Figure 48 Spectre HMBC du composé **B** (500MHz, méthanol- d_4) avec la représentation schématique des corrélations $C \rightarrow H$ principales

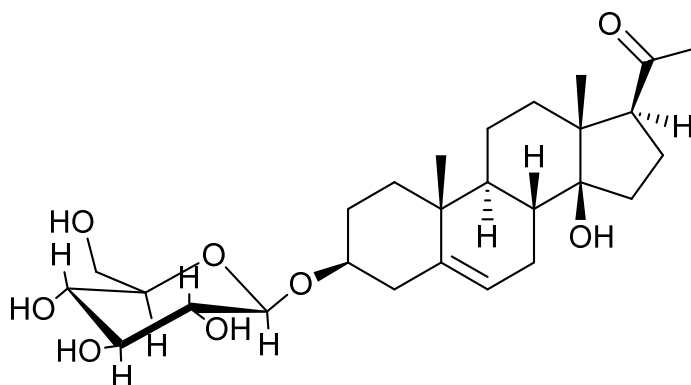


Figure 49 Structure du composé **B**: le carumbelloside II

5.1.3. Détermination structurale du composé C

Le composé **C** est isolé sous forme de poudre blanche. Le spectre UV du composé dans l'ACN n'est pas caractéristique et présente un maximum à 199nm et un épaulement à 280nm.

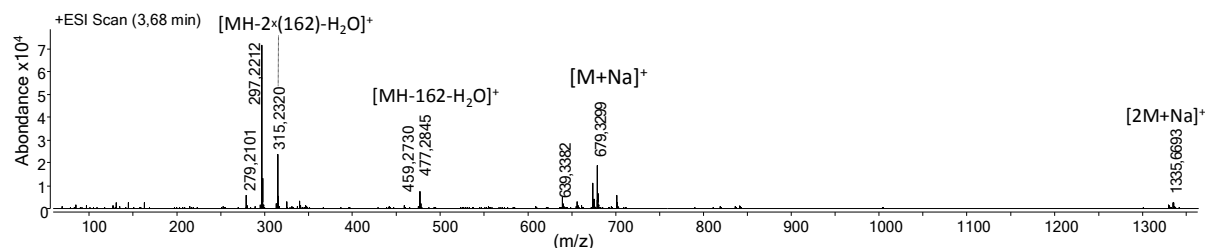


Figure 50 Spectre ESI-HRMS du composé **C**

L'analyse HPLC-ESI-HRMS en mode positif (**Figure 50**) indique la formule brute du composé **C** étant $C_{33}H_{52}O_{13}$ à partir de l'ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ observé à m/z 679,3299 (erreur 0,33 ppm). D'autres ions ont été observés à m/z 1335,6693 = $[2M+Na]^+$, 639,3382 = $[MH-H_2O]^+$, 477,2845 = $[MH-162-H_2O]^+$, 315,2320 = $[MH-2x(162)-H_2O]^+$. Sa masse moléculaire est supérieure de 162 Da et il porte six carbones de plus que les composés **A** et **B**, suggérant la présence d'un deuxième hexose fixé sur la structure du composé **C**.

Le spectre 1H -RMN est similaire au spectre du composé **B**. Les différences entre les deux composés sont observables dans la région des protons portés par des carbones oxygénés. Deux signaux caractéristiques des protons anomériques résonnent à δ 4,39 *d* (7,9 Hz) et 4,38 *d* (7,8 Hz) ainsi que quatre doublets dédoublés correspondant à deux groupements hydroxyméthyles à δ 4,12 *dd* (11,8, 1,9 Hz), 3,79 *dd* (11,5, 5,5 Hz) et à δ 3,87 *dd* (11,8, 1,9 Hz) et 3,67 *dd* (11,8, 5,0 Hz). Ces informations validées par les spectres 2D-RMN, confirment la présence de deux hexoses. Les spectres COSY et NOESY confirment que les deux sucres sont des β -glucoses.

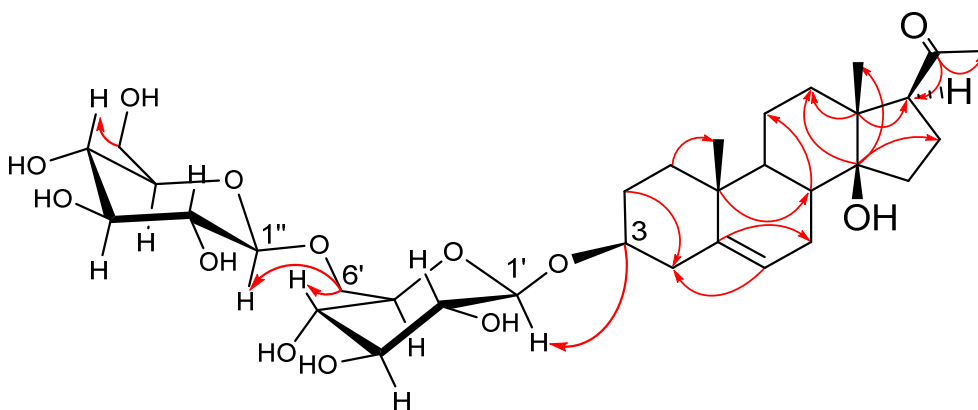


Figure 51 Représentation schématique des corrélations HMBC $C \rightarrow H$ principales du composé **C**

Les corrélations HMBC (**Figure 51**) permettent de valider que la génine du composé C est identique à celle du composé B. Le premier proton anomérique à 4,39 ppm corrèle avec le carbone de la position 3 de la génine (C-3 à 80,3 ppm) et le deuxième à 4,38 ppm avec le carbone de la position 6' du premier glucose (C-6' à 69,8 ppm). L'observation que le signal du carbone de la position 6' soit plus

déblindé que celui de la position 6'' valide que le deuxième glucose est fixé sur le premier grâce à une liaison β 1'' $\rightarrow$ 6' glucosidique. Compte tenu de l'hydrolyse du composé par la β -D-glucosidase, la partie osidique consiste en un enchainement gentiobiose (β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranose).

Afin de déterminer l'orientation de l'hydroxyle fixé sur le carbone quaternaire de la position 14, le composé **C** a été soumis à des analyses RMN solubilisé dans du DMSO- d_6 .

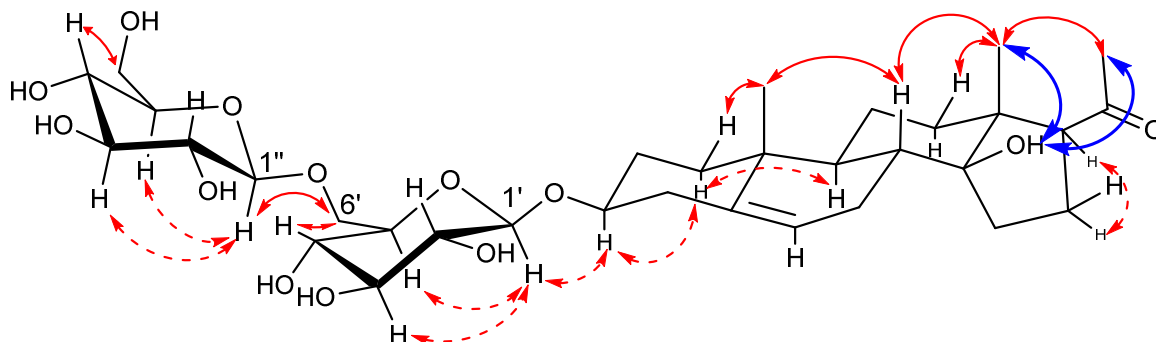


Figure 52 Représentation schématique des corrélations NOE en méthanol- d_4 : Rouge continue — : au-dessus du plan, rouge tiret ---- : en dessous du plan. Corrélations ROE de l'hydroxyle OH-14 en DMSO- d_6 bleue continue — : au-dessus du plan

A partir des corrélations HMBC du proton de l'hydroxyle résonnant à 4,52 ppm avec les carbones des positions 13 (δ_C 47,6) et 15 (δ_C 31,6), on déduit qu'il s'agit du proton de l'hydroxyle de la position 14. Le spectre 1D-ROESY sélectif met en évidence la proximité de l'hydroxyle OH-14 avec le méthyle de la position 18 (δ_H 0,61) dont l'orientation est β . L'hydroxyle OH-14 est donc au-dessus du plan du noyau cyclopentane (**Figure 52**).

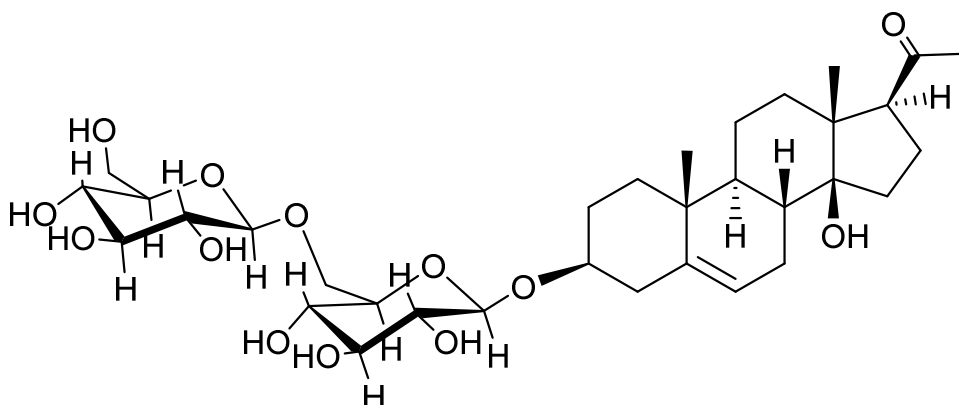


Figure 53 Structure du composé **C** : le carumbelloside **I**

L'ensemble des données spectrales permettent la détermination du composé **C** comme étant le **3 β ,14 β -dihydroxy-prégn-5-èn-20-one 3-O-gentiobioside** qui a été déjà décrit dans la littérature comme étant le **carumbelloside I** (**Figure 53**), isolé de *Caralluma umbellata* Haw, une espèce décrite pour ses propriétés antidiabétiques (Lee-Juian et al., 1994).

Le **carumbelloside I** comme son analogue mono-glucosylé, le carumbelloside II, possède des propriétés anti-nociceptives et anti-inflammatoires, démontrées *in vivo* (Ramesh et al., 1999).

5.1.4. Détermination structurale du composé D

Le composé **D** a été isolé sous forme d'aiguilles jaune pâle. Son spectre UV est similaire à celui des composés **A-C**.

L'analyse HPLC-ESI-HRMS en mode positif du composé **D** (**Figure 54**) indique une formule brute de $C_{27}H_{42}O_9$ à partir de l'ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ observé à m/z 533,2704 (erreur 2,81 ppm). Le composé **D** porte donc un oxygène de plus que les composés **A** et **B**. L'ion à m/z 475,2679 correspond à l'adduit proton du composé **D** ayant perdu deux molécules d'eau. Les ions à m/z 331,2247, 313,2154 et 295,2046 correspondent aux adduits proton du composé **D**, suite à la perte d'un hexose avec trois fragments issus de trois étapes de déshydratation consécutives.

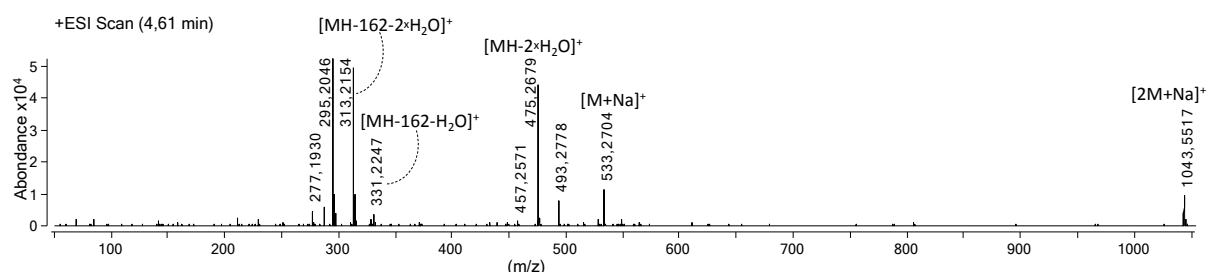


Figure 54 Spectre ESI-HRMS du composé **D**

Le spectre 1H -RMN est similaire à celui du composé **B** et confirme la présence de l'hexose ainsi que la présence de deux méthines oxygénés sur l'aglycone. Le spectre ^{13}C -RMN met en évidence un carbone quaternaire oxygéné à δC 87,3. Le spectre HMBC permet la détermination des deux méthines oxygénés étant les méthines des positions 3 (δH 3,62) et 12 (δH 4,12) et le carbone quaternaire portant un hydroxyle étant le carbone de la position 14.

L'ensemble des données spectrales a permis l'identification du composé **D** comme étant le **3 β ,12 α ,14 β -trihydroxy-prégn-5-èn-20-one 3-O- β -D-glucopyranoside** (**Figure 56**).

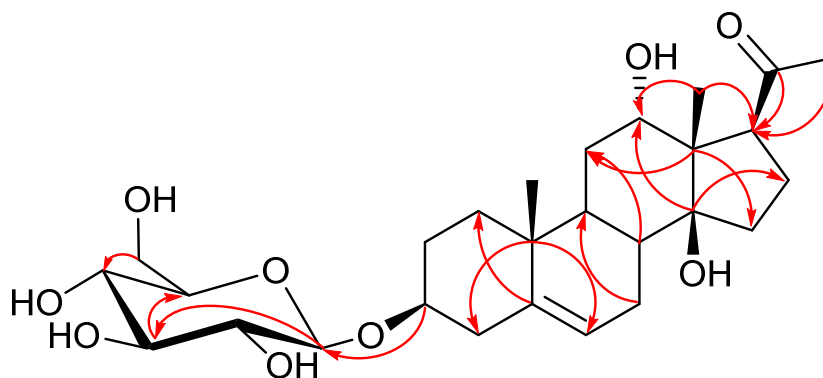


Figure 55 Représentation schématique des corrélations HMBC C→H principales du composé **D**

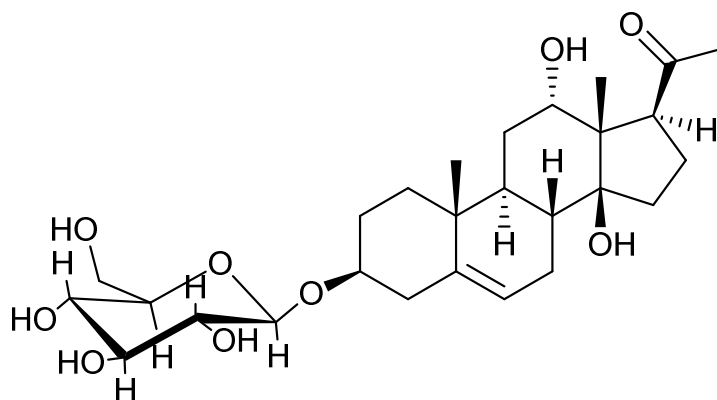


Figure 56 Structure du composé **D** : le ménarandroside III

Le composé **D** est un nouveau produit naturel, que nous avons dénommé le **ménarandroside III**. Son aglycone est décrit dans la littérature comme la **digipurpurogénine I**, isolée suite à des hydrolyses des hétérosides cardiotoniques de *Digitalis purpurea* L. et de *Digitalis thapsi* L. (Lorenz, Carraminana, et Primo 1958; Tschesche et Grimmer 1955). Son épimère de la position 12, la **digipurpurogénine II** ou **isoramanone**, est l'aglycone de base des glycosides identifiés dans le genre *Hoodia* ainsi que de la plupart des glycosides de la sous-famille des Asclépiadoïdées (Geoffroy et al., 2011).

5.1.5. Détermination structurale du composé **E**

Le composé **E** est isolé sous forme d'aiguilles jaune pâle. Son spectre UV a été similaire aux autres composés. L'analyse HPLC-ESI-HRMS en mode positif (Figure 57) a indiqué la formule brute du composé **E** étant $C_{27}H_{42}O_9$ à partir de l'ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ observé à m/z 533,2715 (erreur 1,27 ppm). Le composé **E** est donc un isomère du composé **D**.

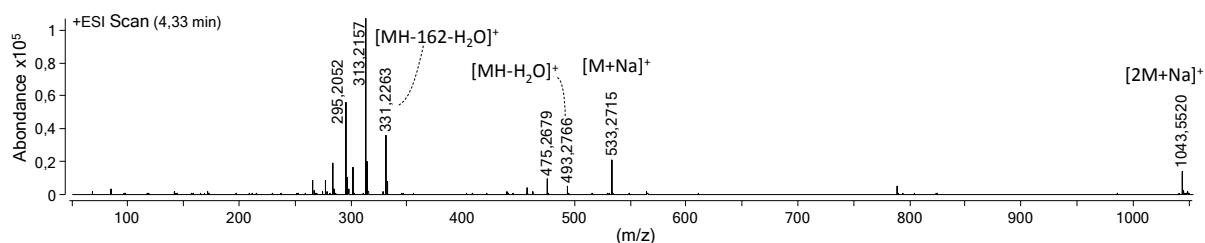


Figure 57 Spectre ESI-HRMS du composé **E**

Le spectre 1H -RMN du composé **E** est similaire à ceux des composés **A-D**. Néanmoins, l'absence des signaux indicatifs de la méthine portant le OH-12 et du méthyle de la position 19 avec l'apparition de deux doublets indicatifs d'un groupement hydroxyméthyle, suggèrent que le méthyle de la position 19 est remplacé par un groupement hydroxyméthyle. En effet, dans le spectre HSQC, on peut observer deux protons à δ_H 3,54 (d , 12,0 Hz) et δ_H 3,84 (d , 12,0 Hz) portés par le carbone à δ_C 63,5. Les protons de ce méthylène corrélaient dans le spectre HMBC avec les carbones C-1 (34,6 ppm), C-5 (136,7 ppm) et C-9 (47,8 ppm) en validant l'attribution de ce carbone au carbone de la position 19.

Tandis que l'environnement chimique du noyau D du composé **E** est identique à celui du composé **B**, on peut observer que les déplacements chimiques de la position 17 sont significativement différents.

Le proton H-17 (2,97 ppm) du composé **E** est blindé par rapport au proton H-17 (3,27 ppm) du composé **B**. Le phénomène inverse est observé avec les carbones de la position 17, avec le C-17 du composé **E** qui est déblindé de +2,7 ppm par rapport au C-17 du composé **B**. De plus, la multiplicité du proton H-17 (*dd*, 9,0 ; 4,6 Hz) est différente de la multiplicité du H-17 des composés **A-D** (triplet large ~ 9.0 Hz) observée. Cette modification indique une transformation au niveau de la stéréochimie de la position 17. En effet, la corrélation NOE entre le proton H-17 et le méthyle-18 démontre l'orientation β du proton H-17 et l'orientation α de l'acétyle fixé sur le carbone C-17.

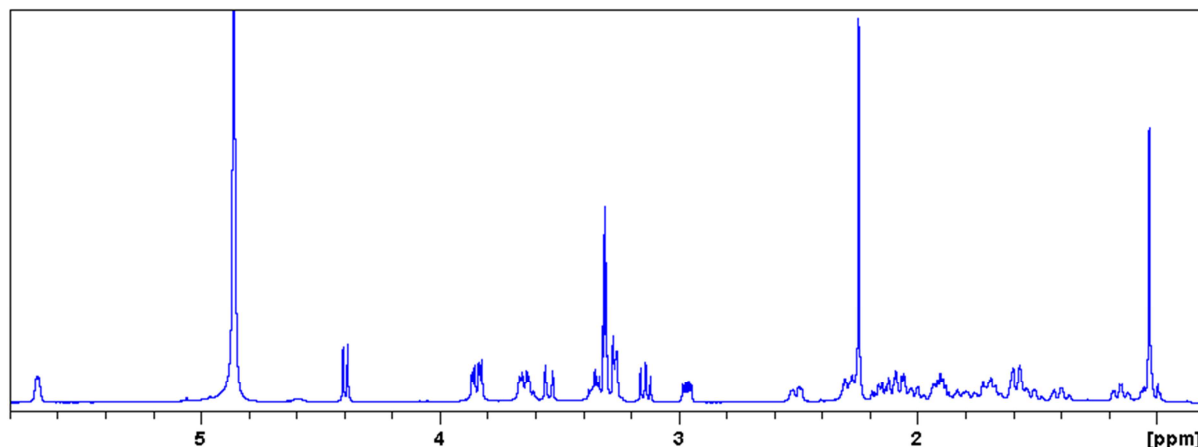


Figure 58 Spectre ^1H -RMN du composé **E** (500MHz, méthanol- d_4)

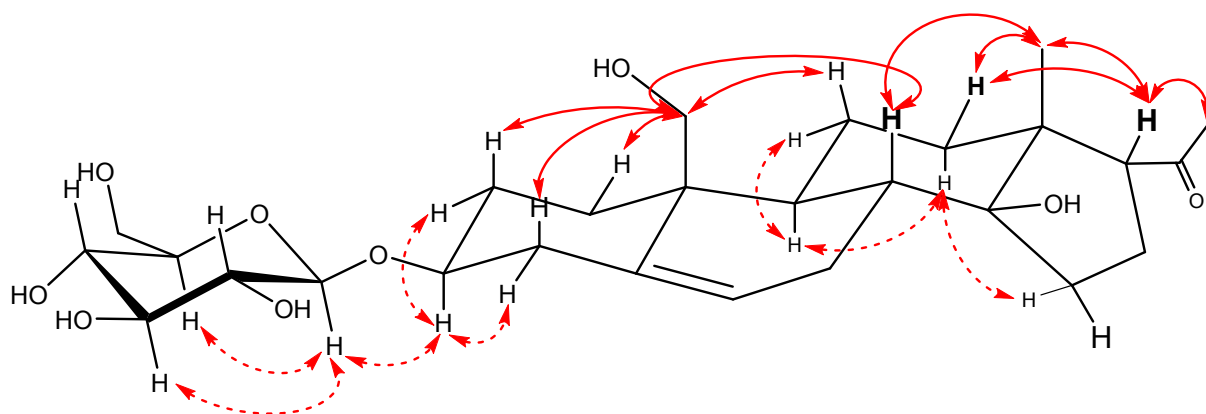


Figure 59 Représentation schématique des corrélations NOE principales observées pour le composé **E**. (Rouge continue — : au-dessus du plan, rouge tiret--- : en dessous du plan)

La résonance du carbone C-20 à 220,1 ppm, contrairement à celle du C-20 à ~ 213ppm des composés **A-D**, valide que le groupement acétyle est en dessous du plan du noyau cyclopentane (Garcia, 2011).

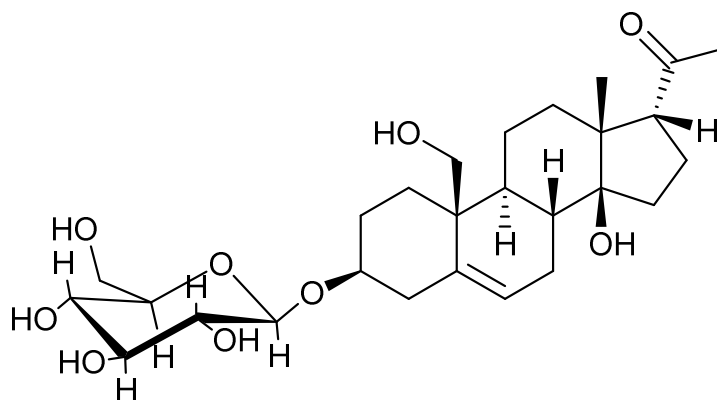


Figure 60 Structure du composé **E** : le ménarandroside **V**

L'ensemble des données spectrales ont permis la détermination du composé **E** comme étant le **3 β ,14 β ,19-trihydroxy-17 α -isoprégn-5-èn-20-one 3-O- β -glucopyranoside**. Il s'agit d'un nouveau composé naturel, baptisé **ménarandroside V** (Figure 60).

5.1.6. Détermination structurale du composé **F**

Le composé **F** est isolé sous forme de poudre blanche. Son spectre UV dans l'ACN n'est pas caractéristique : il présente un maximum à 199nm et un épaulement à 280nm.

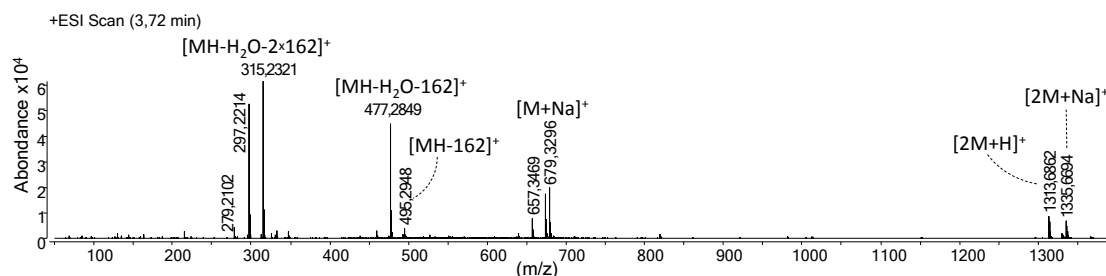


Figure 61 Spectre ESI-HRMS du composé **F**

L'analyse HPLC-ESI-HRMS en mode positif (**Figure 61**) indique la formule brute du composé **F** étant $C_{33}H_{52}O_{13}$ à partir de l'ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ observé à m/z 679,3296 (erreur 0,69 ppm). Le composé **F** est donc un isomère du composé **C**. D'autres ions ont été observés à m/z 1335,6694 = $[2M+Na]^+$, 1313,6862 = $[2M+H]^+$, 667,3469 = $[MH]^+$, 495,2948 = $[MH-162]^+$, 477,2849 = $[MH-162-H_2O]^+$, 315,2321 = $[MH-162-H_2O]^+$ avec deux fragments issus d'une déshydratation consécutive. Le motif de fragmentation est identique à celui du composé **C** révélant la présence de deux hexoses fixés sur un noyau dihydroxy-prégn-èn-one.

Les données RMN de l'aglycone sont identiques à celles du composé **A**. Le spectre 1H -RMN met en évidence deux β -hexoses à partir de deux signaux caractéristiques des protons anomériques presque superposés à δ 4,39 (d, $J = 7,9$ Hz) et 4,38 (d, $H = 7,8$ Hz). Les signaux des deux hexoses sont mieux observés dans le spectre HSQC (**Figure 64**, p.74) et se sont avérés identiques aux signaux RMN de la partie osidique du composé **C**, suggérant la présence d'un gentiobiose. En effet, les corrélations NOESY et HMBC (**Figure 62**, p.73) confirment la présence de deux β -glucoses liés avec une liaison

(1''→6')-β-glucosidique entre eux et fixés à la position 3 de la génine, correspondant à la 3β,12α-dihydroxy-prégn-5-èn-20-one.

Par conséquent, le composé **F** est le **3β,12α-dihydroxy-prégn-5-èn-20-one-3-O-gentiobioside**. Tout comme son analogue mono-glucosylé, le ménarandroside I, le composé **F** est un nouveau composé naturel, dénommé le **ménarandroside II** (Figure 63).

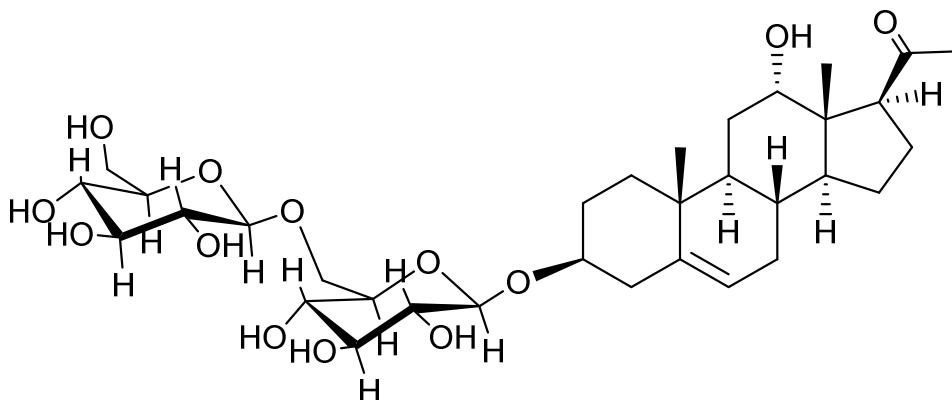


Figure 63 Structure du composé **F** : le ménarandroside II

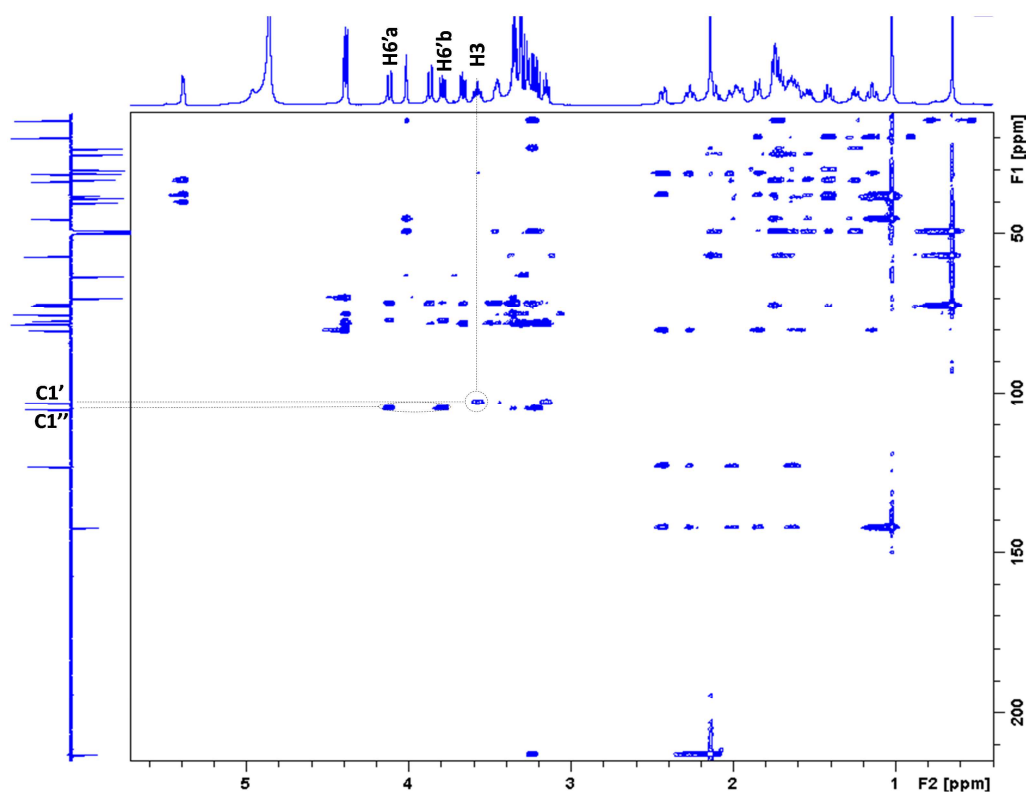


Figure 62 Spectre HMBC (500MHz, méthanol- d_4) du composé **F**

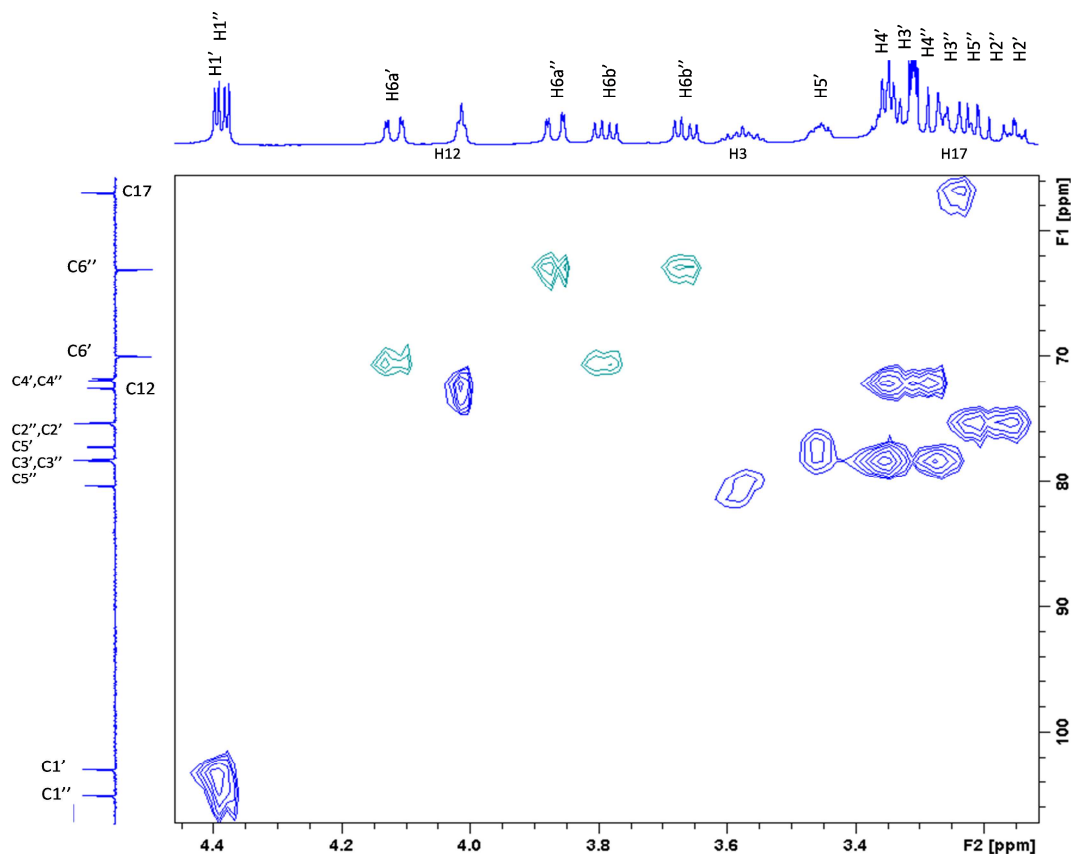


Figure 64 Corrélations HSQC (500MHz, méthanol- d_4) de la partie osidique du composé **F**

5.1.7. Détermination structurale du composé **G**

Le composé **G** est isolé sous forme de poudre blanche. Son spectre UV dans l'ACN n'est pas caractéristique car il présente un maximum à 199nm et un épaulement à 280nm.

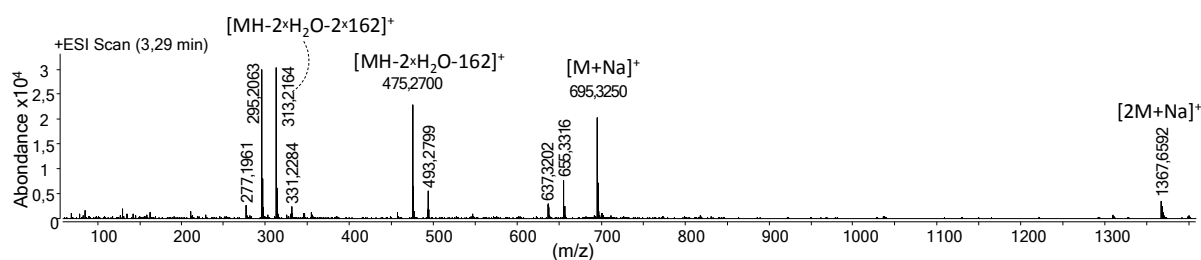


Figure 65 Spectre ESI-HRMS du composé **G**

L'analyse HPLC-ESI-HRMS en mode positif (Figure 65) indique la formule brute du composé **G** étant $C_{33}H_{52}O_{14}$ à partir de l'ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ observé à m/z 695,3250 (erreur 0,11 ppm). Or le composé **G** possède un groupement hydroxyle de plus que le composé **F**. Les fragments observés à m/z 656,3316 = $[MH-H_2O]^+$, 493,2799 = $[MH-162-H_2O]^+$, 331,2284 = $[MH-2 \times (162)-H_2O]^+$, 313,2164 = $[MH-2 \times (162)-2 \times H_2O]^+$ et ses deux fragments en plus, sont issus d'une déshydratation consécutive. Le motif de fragmentation est identique à celui du composé **C** révélant la présence de deux hexoses fixés sur un noyau $C_{21}H_{32}O_4$.

La comparaison des données ^1H -RMN (**Figure 66**) avec celles des composés **A-F** indique que le composé partage le même aglycone (3 β ,12 α ,14 β -trihydroxy-prégn-5-èn-20-one) avec le composé **D** confirmant l'aglycone d'une trihydroxy-prégn-èn-one ($\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_4$) comme indiqué par l'analyse HRMS. La partie osidique s'avère être le gentiobiose fixé à la position 3 de l'aglycone, comme dans le cas des liaisons glucosidiques des composés **C** et **F**.

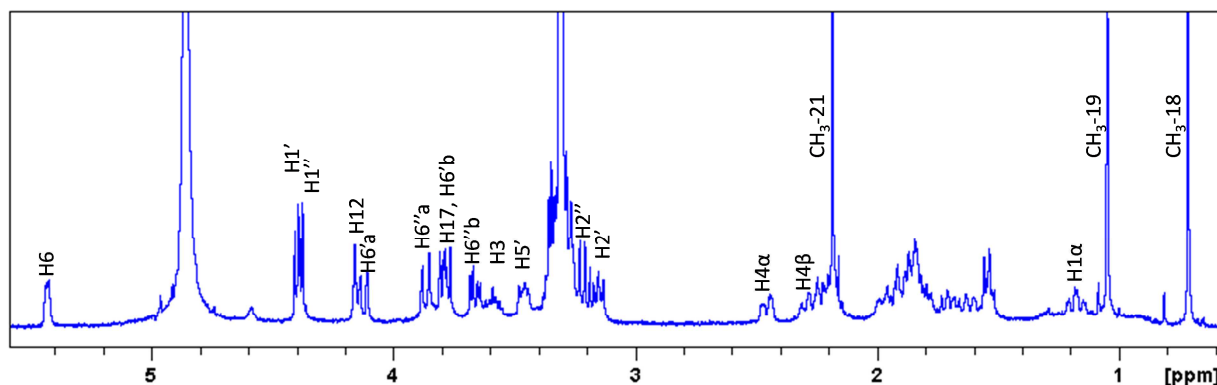


Figure 66 Spectre ^1H -RMN du composé **G** (500MHz, méthanol- d_4) avec l'attribution des signaux caractéristiques

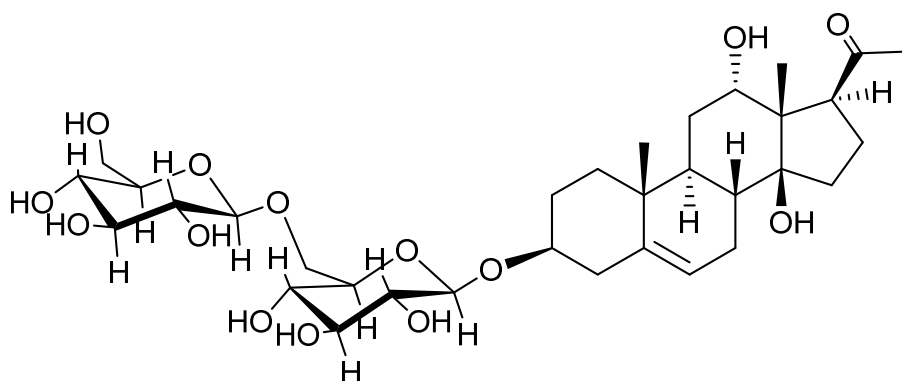


Figure 67 Structure du composé **G** : le ménarandroside IV

Les spectres HMBC et NOESY ont confirmé la structure du composé **G** étant le **3 β ,12 α ,14 β -trihydroxy-prégn-5-èn-20-one 3-O-gentiobioside**. Comme son analogue mono-glucosylé, le menarandroside III, le composé **G** est une structure nouvellement décrite et que nous avons appelée **ménarandroside IV**.

5.1.8. Détermination structurale du composé H

Le composé **H** est obtenu sous forme de poudre blanche. Son spectre UV dans l'ACN n'est pas caractéristique comme dans le cas des composés **A-G**.

L'analyse HPLC-ESI-HRMS en mode positif (**Figure 68**) indique la formule brute du composé **H** comme étant $C_{33}H_{52}O_{12}$ à partir de l'ion pseudo-moléculaire $[M+NH_4]^+$ observé à m/z 658,3816 (erreur 2,76 ppm) et confirmé par l'ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 663,3367 (erreur -2,05 ppm). Par conséquent, le composé **H** possède un groupement hydroxyle en moins que les composés **C** et **F**.

Les fragments observés à m/z 479,3025 = $[MH-162]^+$, 317,2484 = $[MH-2 \times (162)]^+$ et le plus abondant à 299,2383 = $[MH-2 \times (162)-H_2O]^+$ mettent en évidence la double substitution avec deux hexoses d'un aglycone $C_{21}H_{32}O_2$ pouvant correspondre à un noyau hydroxy-prégn-èn-one.

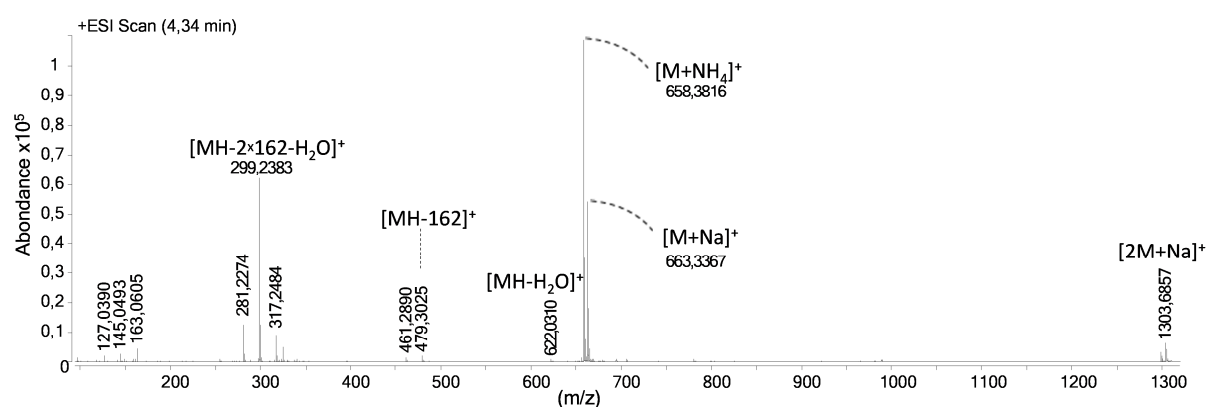


Figure 68 Spectre ESI-HRMS du composé **H**

Le spectre 1H -RMN présente les signaux caractéristiques du noyau prégnène. Le seul signal de proton porté par un carbone oxygéné, qui n'appartient pas à la partie osidique, est le proton H-3 à δ 3,56 (*tt*, $J=8,6$; 4,6 Hz). Les déplacements chimiques des carbones observés par le spectre DEPT et HMBC confirment l'absence des carbones oxygénés appartenant à l'aglycone. De plus, on peut observer la résonance d'une cétone à δ 211,5. Or, le composé **H** porte l'aglycone d'une hydroxy-prégn-èn-one qui est déterminée comme étant la prégnénolone (prégn-5-èn-3 β -ol-20-one) suite à l'analyse des spectres COSY et HMBC et NOESY.

La comparaison des données 1H -RMN de l'aglycone du composé **G** et d'un témoin de prégnénolone révèle une transposition de la plupart des signaux (**Figure 69**). La glycosylation de l'hydroxyle de la position 3 de la prégnénolone entraîne un déblindage de +0,02 à +0,24 ppm pour les protons du noyau cyclohexanique A. Ce déblindage concerne les positions 2 (H2 α +0,15 ppm, H2 β +0,13 ppm), 3 (H3 α +0,16 ppm) et 4 (H4 α +0,24 ppm, H4 β +0,02 ppm). Concernant les données ^{13}C -RMN, la glycosylation entraîne un déblindage du carbone de la position 3 (+7,5 ppm).

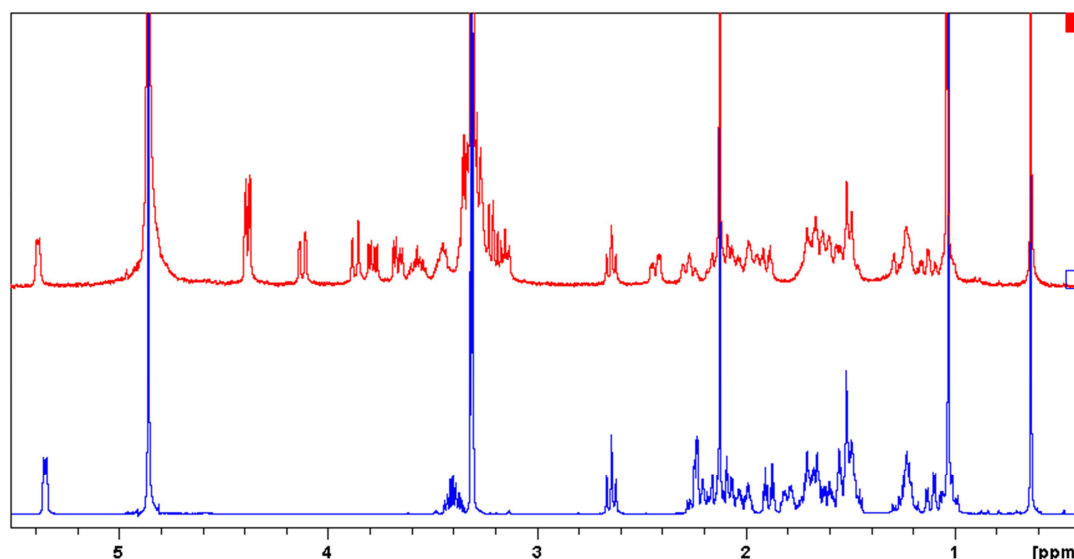


Figure 69 Spectres ^1H -RMN du composé **G** en haut (400MHz, méthanol- d_4) et de la prégnénolone en bas (400MHz, méthanol- d_4)

Les deux protons correspondant à des protons anomériques à δ 4,36 (d , 7,9 Hz) et 4,38 (d , 8,0 Hz) valident la présence de deux hexoses qui sont déterminés comme des glucoses par leurs corrélations NOE. La résolution entre les deux pics des protons anomériques a permis l'acquisition des spectres 1D-TOCSY sélectifs (**Figure 70**) pour mieux observer les signaux des deux glucoses. Leur enchaînement s'avère identique à celui des glucoses des composés **C**, **F** et **G** constituant le gentiobiose. L'hydrolyse enzymatique du composé **H** par de la β -D-glucosidase prouve la nature de la partie osidique comme étant composée de deux β -D-glucoses. De plus, elle confirme que l'aglycone est la prégnénolone suite à la comparaison des R_f de l'hydrolysate et du témoin de prégnénolone.

Par conséquent, l'ensemble de ces données indique que le composé **H** est le **3 β -hydroxy-prégn-5- α -20-one-3-O-gentiobioside (Figure 71)**. Ce composé a déjà été décrit au préalable dans l'extrait des écorces de racines du laurier rose, *Nerium oleander* L. (syn. *Nerium odorum* Aiton) (Yamauchi, 1972)

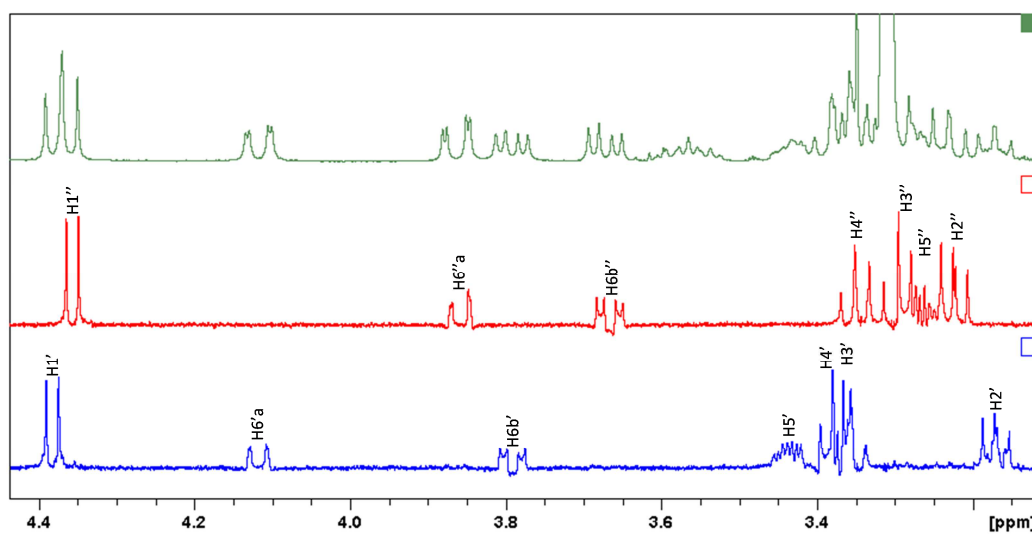


Figure 70 Région des signaux osidiques ^1H -RMN des du composé **H** (500MHz, méthanol- d_4) en vert
Spectre 1D-TOCSY du glucose terminal (500MHz, méthanol- d_4) en rouge
Spectre 1D-TOCSY du glucose fixé sur la génine (500MHz, méthanol- d_4) en bleu

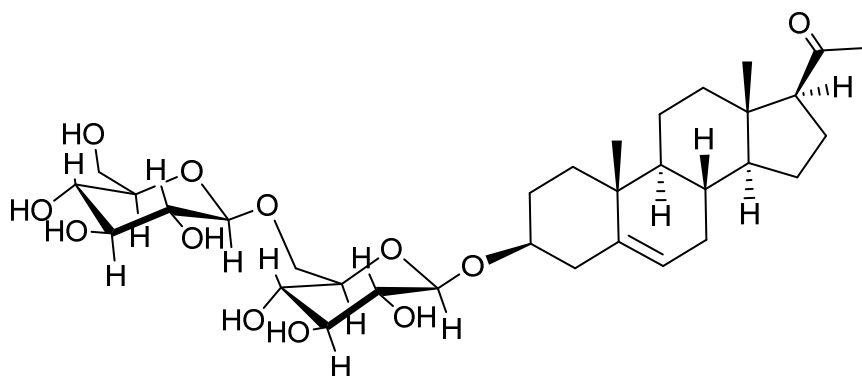


Figure 71 Structure du composé **H**

5.1.9. Détermination structurale du composé I

Le composé I a été isolé sous forme de solide jaune amorphe. La couleur du composé ainsi que son spectre UV présentant des λ_{max} à 257 et 348 nm suggèrent la présence d'un noyau flavonoïdique (Mabry, Markham, et Thomas 1970).

L'analyse HPLC-ESI-HRMS en mode positif (**Figure 72**) a indiqué la formule brute du composé I étant $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$ à partir de l'ion pseudo-moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ observé à m/z 595,1637 (erreur 3,61 ppm). Les ions à m/z 449,1061 = $[\text{MH}-146]^+$ et à 303,0488 $[\text{MH}-2\times 146]^+$ peuvent être interprétés comme les fragments du composé I suite à deux pertes consécutives de deux désoxy-hexoses. Le dernier ion révèle la formule de l'aglycone comme étant $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$.

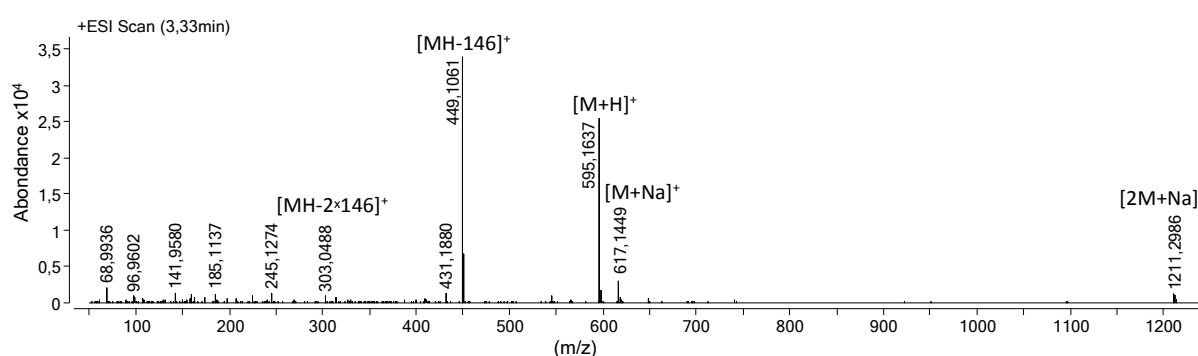


Figure 72 Spectre ESI-HRMS du composé I

Compte tenu de l'absence d'un signal correspondant à la position 3 des flavones ou flavanones dans le spectre ^1H -RMN (**Tableau 8**), on déduit qu'il s'agit d'un flavonol. De plus, le spectre ^1H -RMN met en évidence deux systèmes aromatiques.

Le premier est composé de deux protons résonnant comme deux doublets à δH 6,48 et 6,74 présentant un couplage *meta* ($J=2,1$ Hz) entre eux. Le deuxième système consiste en un système ABX à δH 7,35 (*dd*, $J = 8,1, 2,0$ Hz), 6,92 (*d*, $J = 8,1$ Hz) et 7,37 (*d*, $J=2,0$ Hz). Le motif de substitution du noyau flavonol pouvant corrélérer avec ce motif de résonnement est celui de la 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone (la **quercétine**).

Tableau 8 Données RMN du composé I

	Position	δC	δH	mult	J	HMBC	NOESY
Quercétine	2	160,1				H2', H6'	
	3	136,6				H1''	
	4	180					
	5	163,7				H6, H8	
	6	100,7	6,48	<i>d</i>	2.1	H8	H1'''
	7	163,1				H1''', H6, H8	
	8	95,8	6,74	<i>d</i>	2.1	H6	H1'''
	9	158,2				H8	
	10	107,7				H6, H8	
	1'	122,9				H5'	
	2'	117,2	7,37	<i>d</i>	2.0	H5'	
	3'	146,6				H5', H2'	
	4'	150,2				H2', H5', H6'	
	5'	116,6	6,92	<i>d</i>	8.1		H6'
	6'	123,2	7,35	<i>dd</i>	8.1, 2.0	H2'	
3-O-Rhamnose	1''	100	5,38	<i>d</i>	1.5		H2'''
	2''	72	4,22	<i>dd</i>	3.4, 1.6		H3'''
	3''	72,2	3,75	<i>dd</i>	9.3, 3.3	H1''	H6'
	4''	73,4	3,34	<i>br. t</i>	9.5	H3'', H5''	H6''
	5''	72,2	3,44	<i>dq</i>	9.5, 6.1	H4''	H6'', H2', H3''
	6''	17,8	0,95	<i>d</i>	6.1	H4''	
7-O-Rhamnose	1'''	103,7	5,56	<i>d</i>	1.3		H2'''
	2'''	71,8	4,02	<i>dd</i>	3.2, 1.7	H1''', H4'''	H3'''
	3'''	72,2	3,83	<i>dd</i>	9.7, 3.3		
	4'''	73,7	3,48	<i>t</i>	9.5	H3''', H5''', H6'''	
	5'''	71,4	3,6	<i>dq</i>	9.5, 6.2	H6'''	H6''', H6
	6'''	18,2	1,27	<i>d</i>	6.2	H4'''	H6'''

Le spectre 1H -RMN présente les signaux caractéristiques de deux α -hexoses dont les protons anomériques résonnent à 5,38 (*d*, $J = 1,5$ Hz) et 5,56 (*d*, $J = 1,3$ Hz). Les corrélations des systèmes spin du spectre COSY ainsi que les corrélations NOESY (**Tableau 8**) ont permis la détermination de ces deux α -hexoses comme deux α -rhamnoses.

La corrélation HMBC entre le proton anomérique H-1'' à δ 5,38 ($d, J = 1,5\text{Hz}$) et le carbone C-3 à δ 136,6 ainsi que la corrélation HMBC entre le proton anomérique H-1''' à δ 5,56 ($d, J = 1,3\text{ Hz}$) et le carbone C-7 à δ 163,1, révèlent que la quercétine est substituée avec les deux α -rhamnoses. Compte tenu de l'observation qu'au sein du regne végétal, seul le α -L-rhamnose a été décrit (Ramm et al., 2003), le composé **I** est donc le **quercétine 3,7-di-O- α -L-rhamnopyranoside (Figure 73)**. Les données spectrales expérimentales sont identiques à celles publiées dans la littérature acquises dans le même solvant (méthanol- d_4) (C.-Y. Chen 2004; Mulinacci et al. 1995; Toker, Memisoglu et al. 2004).

Le **quercétine 3,7-di-O- α -L-rhamnopyranoside** est un métabolite secondaire assez répandu. Ses activités biologiques sont nombreuses : effet antioxydant (Abdennacer et al. 2015), antimicrobien, antifongique (Özçelik, Orhan, et Toker 2006) , anti-inflammatoire et anti-nociceptif (Toker, 2004) . Sa présence expliquerait l'effet antidépresseur de *Tilia cordata* (Negri, 2013) et l'effet hypoglycémiant des espèces du genre *Bauhinia* (Menezes et al., 2007). En plus, dans un modèle *in vitro*, ce flavonol s'avère actif en prévention de la stéatose hépatique, une pathologie qui est associée au syndrome métabolique (Morikawa et al., 2012).

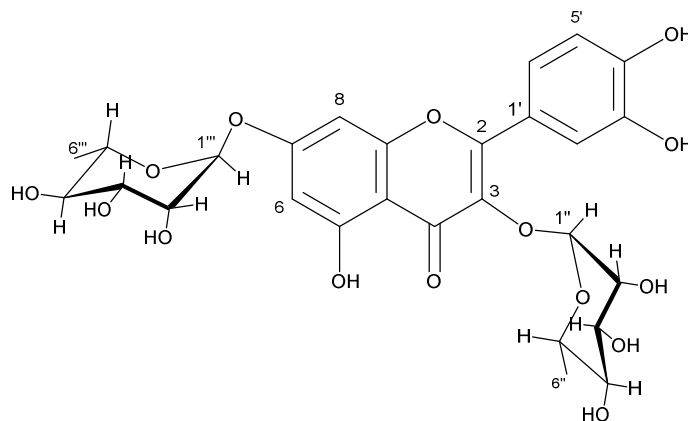


Figure 73 Structure du composé **I**, le quercétine 3,7-di-O- α -L-rhamnopyranoside

5.1.10. Détermination structurale du composé **J**

Le composé **J** a été isolé sous forme de solide jaune amorphe. Tout comme le composé **I** précédemment décrit, la couleur du composé ainsi que son spectre UV présentant des λ_{max} à 263 et 342 nm suggèrent la présence d'un noyau flavonoïdique (Mabry, 1970)

L'analyse HPLC-ESI-HRMS en mode positif (**Figure 74**) indique la formule brute du composé **J** comme étant $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$ à partir de l'ion pseudo-moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ observé à m/z 579,1689 (erreur 2,84 ppm). Les ions à m/z 433,1116 = $[\text{MH}-146]^+$ et à 287,146 $[\text{MH}-2\times 146]^+$ peuvent être interprétés comme les fragments du composé **I** suite à deux pertes consécutives de deux déoxy-hexoses. Le dernier ion révèle la formule de l'aglycone comme étant $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$. Donc, la genine du composé **J** porte un groupement hydroxyle en moins que le composé **I**.

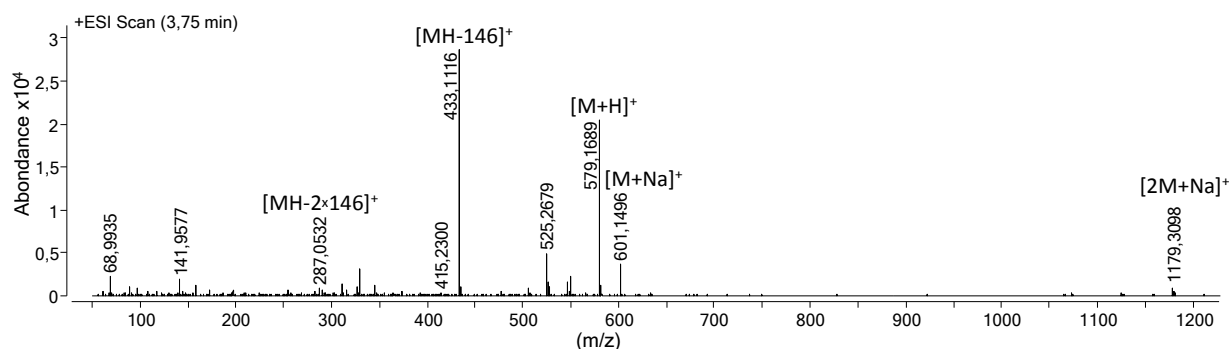


Figure 74 Spectre ESI-HRMS du composé **J**

L'absence de cet hydroxyle est observable dans le spectre ^1H -RMN. Les protons du noyau B résonnent dans un système AA'BB'. Les protons des positions 2' et 6' sont équivalents et résonnent à 7,81 ppm (d , $J = 8,8$ Hz) ainsi que les protons 3' et 5' à 6,95 ppm (d , $J = 8,7$ Hz). Les protons des positions 6 et 8 résonnent au même déplacement chimique que les protons correspondants du composé **I**. Par conséquent, la génine du composé **J** s'avère être la 3,4',5,7-tétrahydroxyflavone (le **kaempférol**). De plus, dans le spectre ^1H -RMN, la partie osidique est identique à celle du composé **I**.

Ainsi, le composé **J** correspond au **kaempférol-3,7-di-O- α -L-rhamnopyranoside** ou **kaempféritrine**.

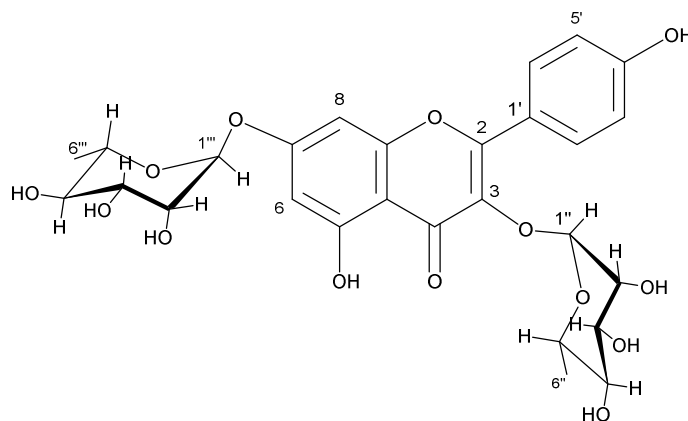


Figure 75 Structure du le composé **J** : le kaempférol-3,7-di-O- α -L-rhamnopyranoside.

La quantité du composé n'était pas suffisante pour l'acquisition des spectres ^{13}C -RMN. Néanmoins, le spectre NOESY confirme la substitution des hydroxyles des positions 3 et 7 avec un rhamnose. L'attribution de la structure est confirmée par la transposition des données ^1H -RMN acquises avec celles de la littérature (Takaya et al., 2003; Toker, Memisoglu et al., 2004).

Tableau 9 Données ^1H -RMN et corrélations NOESY observées
pour le composé **J** (500 MHz, méthanol- d_4)

	Position	δH	mult	J (Hz)	NOESY
Kaempférol	6	6,48	br. s.		H1'''
	8	6,75	br. s.		
	2', 6'	7,81	<i>d</i>	8.8	H2'', H3'', H5''
	3', 5'	6,95	<i>d</i>	8.7	H2', H6'
3-O-Rhamnose	1''	5,41	br. s		H2''
	2''	4,22	<i>dd</i>	3.2, 1.7	H3''
	3''	3,72	<i>dd</i>	8.9, 3.3	H5''
	4''	3,33	<i>m</i>		
	5''	3,35	<i>m</i>		
	6''	0,93	<i>d</i>	5.6	H5''
7-O-Rhamnose	1'''	5,56	br. s.		H2''
	2'''	4,01	<i>dd</i>	3.0, 1.7	H3'''
	3'''	3,83	<i>dd</i>	9.4, 3.4	H5'''
	4'''	3,48	<i>t</i>	9.5	
	5'''	3,6	<i>dq</i>	9.3, 6.3	
	6'''	1,26	<i>d</i>	6.3	H5''', H4'''

La kaempféritrine est un métabolite secondaire ubiquitaire qui a notamment été identifié dans une espèce de *Cynanchum*, *Cynanchum chinense* R. BR. (Z. Zhang et al., 2011). Elle possède des activités antioxydantes (Cao et al., 2013) et, comme son dérivé structurellement proche la quercétine 3,7-di-O- α -L-rhamnopyranoside, elle inhibe la topoisomerase II (Tselepi et al., 2011). Elle peut ainsi entraîner l'apoptose des cellules cancéreuses (Alonso-Castro et al., 2013). Elle possède également des propriétés antimicrobiennes (Qi, 2010; Tatsimo et al., 2012), antivirales (Özçelik, 2006), anti-inflammatoires et anti-nociceptives (Toker, Küpeli, et al. 2004) ainsi qu'anti-hypertensives (Gohar et Elmazar, 1997).

Sa présence est associée aux propriétés antidiabétiques des espèces du genre *Bauhinia* (Menezes et al. 2007). La kaempféritrine augmente la réponse des tissus aux effets hypoglycémisants de l'insuline (Tzeng et al., 2009, 3). En 2014, il a été démontré que la kaempféritrine peut stimuler la 1-phosphofructokinase, une enzyme qui catalyse l'étape cinétiquement déterminante de la glycolyse, dans les tissus adipeux, musculaire et hépatique. De plus, la kaempféritrine est décrite comme inhibiteur de l' α -glucosidase (Choi et al., 2012).

5.1.11. Détermination structurale du composé K

Le composé **K** a été isolé sous forme de solide jaune amorphe. Sa couleur ainsi que son spectre UV présentant des λ_{max} à 200, 258 et 348 nm, suggèrent la présence d'un noyau flavonoïdique (Mabry, Markham, et Thomas 1970).

L'analyse HPLC-ESI-HRMS en mode positif (**Figure 76**) a indiqué la formule brute du composé **K** comme étant $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$ à partir de l'ion pseudo-moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ observé à m/z 449,1065 (erreur 2,96 ppm). L'ion majoritaire à m/z 303,0487 = $[\text{MH}-146]^+$ indique la perte d'un déoxy-hexose. A partir de ce dernier fragment, la formule brute de l'aglycone est calculée comme étant $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$. Ainsi, l'aglycone du composé **K** est soit la quercétine soit son isomère.

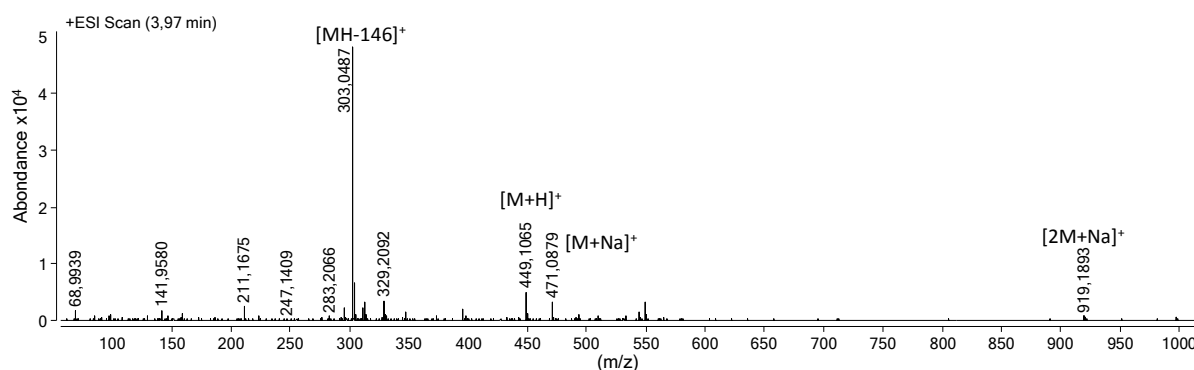


Figure 76 Spectre ESI-HRMS du composé **K**

La perte de 146 Da correspond à la perte d'un rhamnose. Les données ^1H -RMN, COSY et NOESY confirment la nature de la partie osidique du composé **K**.

Le spectre ^1H -RMN révèle que l'aglycone est la quercétine avec le motif caractéristique de résonance ABX du noyau B. Les protons du noyau A résonnent comme deux doublets couplant entre eux avec une constante de 2,0 Hz mais ils sont plus blindés par rapport aux protons correspondants du composé **I**. Cette modification indique un changement dans l'environnement chimique du noyau A.

L'absence des signaux d'un deuxième proton anomérique dans le spectre ^1H -RMN pourrait justifier le blindage des protons H-6 et H-8. En effet, les corrélations NOE entre les protons du noyau B et les protons du rhamnose indiquent la glycosylation de l'hydroxyle de la position 3 et non pas de l'hydroxyle de la position 7. De plus, les déplacements chimiques du rhamnose sont identiques aux déplacements chimiques du rhamnose fixé en position 3 de la quercétine 3,7-di-O- α -L-rhamnopyranoside. Par conséquent, le composé **K** est le **quercétine 3-O- α -L-rhamnopyranoside** ou **quercitrine**. L'attribution de la structure est validée par la comparaison des données ^1H -RMN acquises avec les données ^1H -RMN issues de la bibliographie (Jagan et al., 2002; Jayaprakasha et al. 2006).

La quercitrine est un métabolite secondaire ubiquitaire connu pour ses effets antioxydants (Hou et al. 2004; Jayaprakasha et al. 2006) et anti-inflammatoires. Ces effets sont dûs à l'inhibition du facteur de transcription NF κ -B et à l'inhibition de la sécrétion concomitante des facteurs pro-inflammatoires (Fang, 2008).

Compte tenu de la capacité de la quercitrine d'inhiber l'aldose réductase et la production des protéines glyquées, elle pourrait être impliquée dans la prévention de la néphropathie diabétique (Kim et al., 2013).

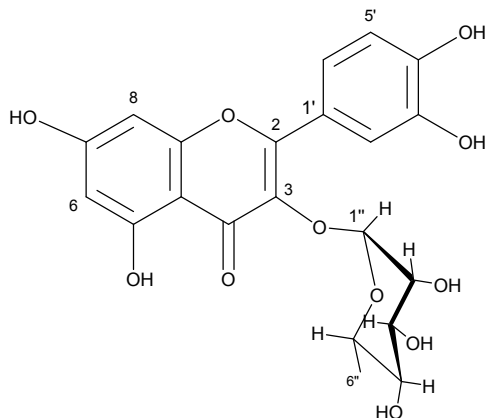


Figure 77 Structure du composé **K** : la quercitrine

Tableau 10 Données ^1H -RMN et corrélations NOESY observées pour le composé **K**
(500 MHz, méthanol- d_4)

	Position	δH	mult	J (Hz)	NOESY
Quercétine	6	6,19	<i>d</i>	2,1	
	8	6,35	<i>d</i>	2,1	
	2'	7,33	<i>d</i>	2,0	H2'', H3'', H5''
	5'	6,91	<i>d</i>	8,2	
	6'	7,31	<i>dd</i>	8,2 ; 2,0	H5'
3-O-Rhamnose	1''	5,35	<i>d</i>	1,4	H2''
	2''	4,22	<i>dd</i>	3,3 ; 1,7	H3''
	3''	3,75	<i>dd</i>	9,3 ; 3,3	H5''
	4''	3,33	<i>br. t</i>	9,9	H6''
	5''	3,41	<i>m</i>		H6''
	6''	0,94	<i>d</i>	6,1	

5.2. Détermination structurale des composés isolés de *Cynanchum marnierianum*

5.2.1. Détermination structurale du composé L

Le composé **L** a été isolé comme un solide blanc amorphe. Compte tenu de son caractère apolaire et de sa coloration violette suite à la révélation par la vanilline sulfurique sur CCM, le composé **L** est probablement de nature triterpénique.

Le dénombrement de 6 méthyles résonant entre 0,7 et 1,2 ppm dans le spectre ^1H -RMN (**Figure 78**) confirme que le composé **L** est un triterpène. De plus, la résonance de deux protons oléfiniques couplant entre eux avec une constante de 2,0 Hz indique la présence d'un exométhylène.

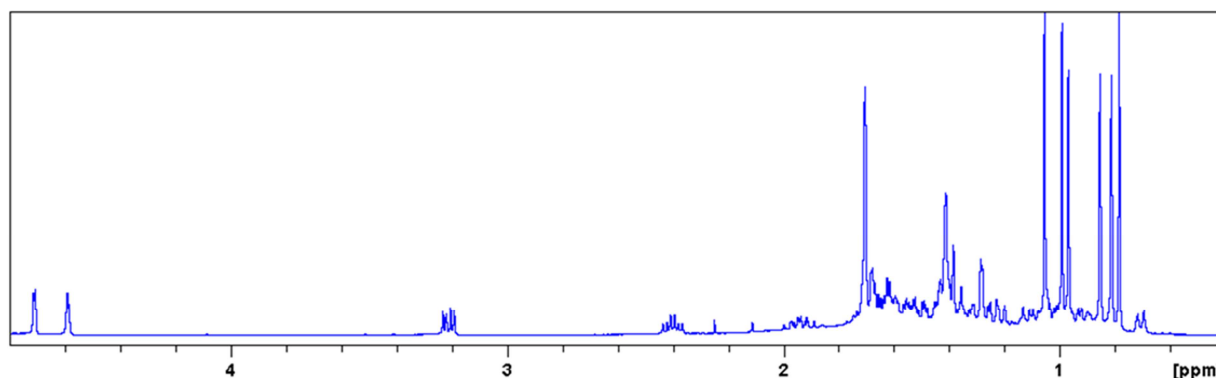


Figure 78 Spectre ^1H -RMN du composé **L** (500 MHz, chloroforme-*d*)

La comparaison des données ^1H -RMN (**Tableau 11**) avec les données ^1H -RMN de la littérature (Fotie et al. 2006; Kweyu et al. 2008) conduisent à la détermination structurale du composé **L** comme étant le **lupéol** (**Figure 79**). Hypothèse confirmée avec la comparaison des temps de rétention (analyses HPLC-DAD) et des R_f (analyses CCM) du composé **L** et d'un témoin commercial de lupéol.

Tableau 11 Signaux caractéristiques ^1H -RMN du composé **L** (500 MHz, chloroforme-*d*)

Position	δH	mult	J (Hz)
3	3,20	<i>dd</i>	11,2 ; 5,1
19	2,38	<i>td</i>	11,0 ; 6,0
23	0,97	<i>s</i>	-
24	1,04	<i>s</i>	-
25	0,77	<i>s</i>	-
26	0,84	<i>s</i>	-
27	0,80	<i>s</i>	-
28	0,95	<i>s</i>	-
30	1,69	<i>s</i>	-
29a	4,70	<i>d</i>	2,5
29b	4,57	<i>dd</i>	2,5 ; 1,2

Le lupéol est un métabolite secondaire ubiquitaire. Ses effets biologiques ont été beaucoup étudiés et ont montré des propriétés anti-inflammatoires, anti-tumorales, hépato-protectrices, cardio-protectrices, anti-protozoaires, anti-microbiennes et anti-virales. De plus, le lupéol exerce un léger effet inhibiteur de l' α -amylase (Gallo et Sarachine, 2009).

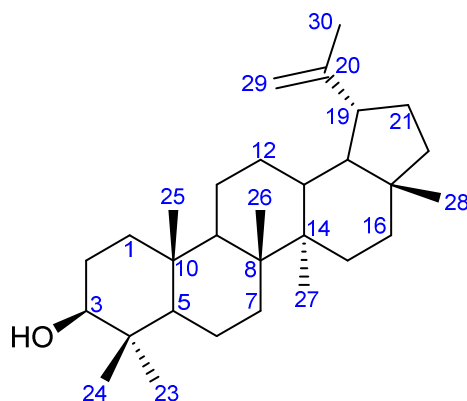


Figure 79 Structure du composé L : le lupéol

Le lupéol est également **un inhibiteur efficace de la DPP-4**, pouvant ainsi prolonger le temps de demi-vie du GLP-1 dans la circulation sanguine (Saleem et al., 2014).

5.2.2. Détermination structurale du composé M

Le composé **M** a été isolé comme un solide blanc amorphe. Comme pour le composé **L**, la nature triterpénique du composé **M** a été supposée en raison de son caractère apolaire et de la coloration violette suite à la révélation par la vanilline sulfurique des plaques CCM.

Le spectre ^1H -RMN du composé **M** est similaire à celui du composé **L**. Pourtant, un septième singulet intégrant pour 3 protons résonne à 2,01 ppm. Son déplacement chimique indique qu'il appartient à un groupe acétyle. Le déblindage intense (+1,27 ppm) du proton H-3 par rapport au proton H-3 du lupéol indique que la position 3 du composé **M** est acétylée. La comparaison des données ^1H -RMN (**Tableau 12**) avec celles publiées dans la littérature (Barla et al. 2006), confirme l'attribution de la structure comme étant l'**acétate de lupéol** (**Figure 80**).

Tableau 12 Signaux ^1H -RMN principaux du composé M (500 MHz, chloroforme-*d*)

Position	δH	mult	J
3	4,47	<i>dd</i>	10,0 ; 5,5
19	2,38	<i>td</i>	11,0 ; 5,8
23	0,86	<i>s</i>	-
24	0,79	<i>s</i>	-
25	0,85	<i>s</i>	-
26	1,03	<i>s</i>	-
27	0,94	<i>s</i>	-
28	0,84	<i>s</i>	-
29a	4,69	<i>d</i>	2.0
29b	4,57	<i>dd</i>	2.5 ; 1.5
30	1,69	<i>s</i>	-
Acétyle	2,05	<i>s</i>	-

L'**acétate de lupéol** entraîne un effet vaso-dépresseur important, mis en évidence sur un modèle *in vivo* (Barla et al. 2006). Il possède des propriétés anti-inflammatoires (Lucetti et al. 2010), antimicrobiennes contre les souches à Gram positives, est un inhibiteur de la topoisomérase II. Enfin, il serait capable de neutraliser les effets toxiques induits par les venins de la vipère *Daboia russelii* et du cobra *Naja kaouthia* (Gallo et Sarachine, 2009).

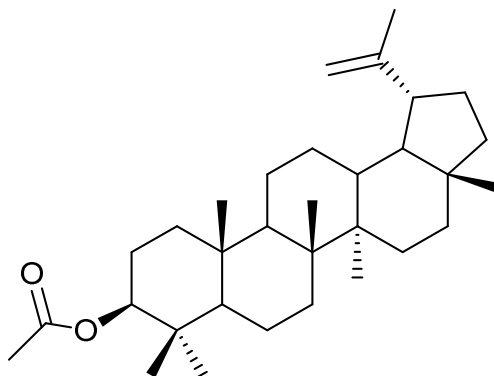


Figure 80 Structure du composé **M** : l'acétate de lupéol

5.2.3. Détermination structurale du composé N

Le composé **N** a été isolé comme un solide blanc amorphe. Comme pour les composés **L** et **M**, la nature triterpénique du composé **N** a été supposée en raison de son caractère apolaire, de la coloration violette du spot correspondant révélé par la vanilline sulfurique sur CCM ainsi que par la multitude des signaux ^1H -RMN dans la région des hauts champs.

Le spectre ^1H -RMN révèle un proton oléfinique à 5,13 ppm résonnant comme un triplet ($J = 3,6$ Hz). L'absence d'un autre signal oléfinique indique que la double liaison est située entre une méthine et un carbone quaternaire. Ce carbone est mis en évidence par le spectre ^{13}C -RMN résonnant à 139,6 ppm.

Dans le spectre ^1H -RMN, il n'y a qu'un proton porté par un carbone oxygéné et il est observé à 4,51 ppm (dd , $J = 9,9$; $7,9$ Hz). Son déplacement chimique assez élevé suggère l'estérification du carbone qui le porte. Le carbonyle observé à 171,0 ppm et corrélant avec ce proton ainsi qu'avec un méthyle à 2,05 ppm, indique l'estérification avec un groupement acétyle.

Le spectre HSQC permet l'association des protons avec leurs carbones porteurs et le spectre HMBC permet l'attribution des groupements caractéristiques à leur position. L'ensemble des données spectrales a révélé la structure du composé **N** comme étant l'**acétate d' α -amyrine**. La comparaison des données ^{13}C -RMN expérimentales avec celles de la littérature (Mahato et Kundu, 1994) confirme l'attribution de cette structure.

L' α -amyrine est capable de diminuer significativement l'hyperglycémie dans un modèle *in vivo* en exerçant en même temps un effet hépato-protecteur (Karan et al., 2013).

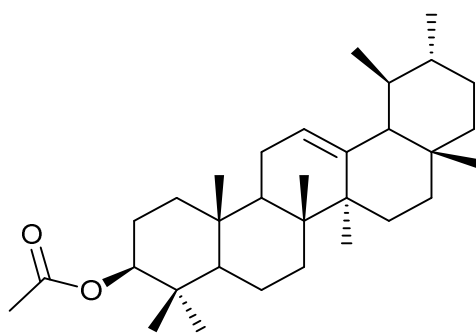


Figure 81 Structure du composé **N** : l'acétate d' α -amyrine

5.2.4. Détermination structurale du composé O

Le composé **O** a été isolé sous forme de poudre blanche amorphe. Son spectre UV avec des maxima à 195, 229 nm et un épaulement à 274 nm, indique la présence de groupements aromatiques (Baum et McClure 1979).

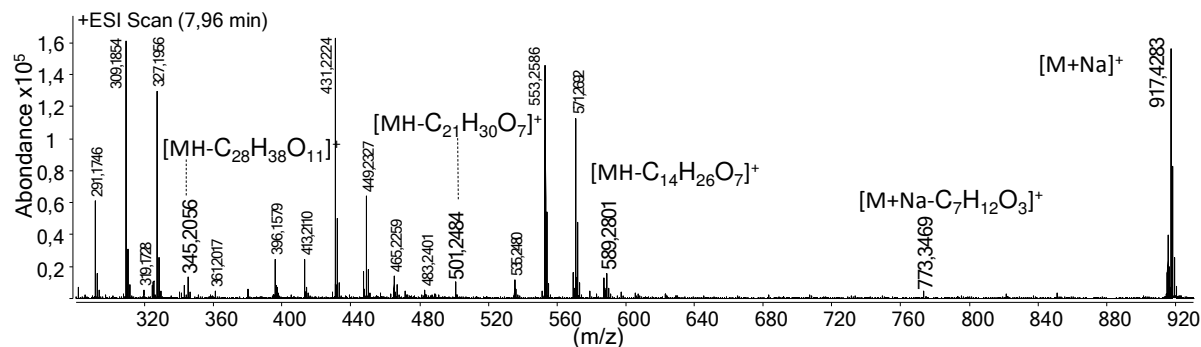


Figure 82 Spectre ESI-HRMS du composé **O**

L'analyse HPLC-ESI-HRMS en mode positif (**Figure 82**) a donné la formule brute du composé en étant $C_{49}H_{66}O_{15}$ à partir de l'ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ observé à m/z 917,4283 (erreur 0,17 ppm).

Le spectre ^{13}C -RMN confirme la présence de 49 carbones et suite à la comparaison des spectres DEPT-90° et DEPT-135°, la présence de 24 méthines, 8 méthylènes et 7 méthyles dont 2 méthoxyles est déduite. La comparaison du spectre DEPT-135° avec celui du ^{13}C -RMN a montré la présence de 10 carbones quaternaires dont 2 carbonyles qui, d'après leur déplacement chimique (δ_C 166,7 et 167,9), seraient des carbonyles de deux groupements ester.

La confirmation de la présence de systèmes aromatiques vient du spectre 1H -NMR où on peut observer 10 protons aromatiques résonant dans deux systèmes AA'BB'X et indiquant la présence de deux noyaux benzéniques monosubstitués (**Figure 83**). Dans le spectre HMBC, les protons en position *ortho* de la substitution de chaque noyau (7,60 et 7,65 ppm *dd* $J = 7,8 ; 1,5$ Hz) corrélerent avec un carbonyle participant à un groupement ester à δ 166,7 et 167,9 respectivement, observation qui met en évidence deux groupements d'un acide benzoïque estérifiés.

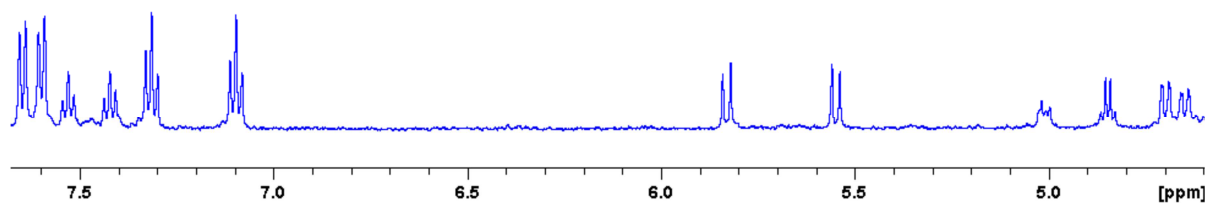


Figure 83 Zone des protons aromatiques, oléfiniques et oxygénés déblindés du spectre 1H -NMR du composé **O** (500 MHz, méthanol- d_4 , avec suppression du signal du méthanol et de l'eau)

Deux protons anomériques présents à δ H 4,65 (*dd* 9,6 ; 1,9 Hz) et 4,70 (*dd* 9,6 ; 1,7 Hz) portés par les carbones à δ C 100,0 et 101,5 respectivement indiquent la présence de deux sucres (**Figure 83**). Le suivi du système des spins dans le spectre COSY montre que les positions 2 et 6 ne sont pas oxygénées. Cette observation fait preuve de la présence de deux 2,6-didésoxy sucres. Les signaux HMBC entre le carbone de la position 3 de chaque sucre avec les protons d'un méthoxyle montre la méthylation de la position 3. Il s'agit donc de deux 2,6 didésoxy-hexoses méthoxylés, ce qui est validé par les fragments à m/z 773,3469 = $[M+Na-C_7H_{12}O_3]^+$ et à m/z 589,2801 = $[MH-C_{14}H_{26}O_7]^+$ observés dans le spectre HRMS.

En revenant au spectre HRMS du composé **O**, après l'attribution des fragments dus à la perte des deux 2,6 didésoxy-hexoses méthoxylés, les fragments à 501,2484 = $[MH-C_{21}H_{30}O_7]^+$ et 345,2056 = $[MH-C_{28}H_{38}O_{11}]^+$ correspondent à l'aglycone du composé **O** suite à deux pertes consécutives de groupements benzoyles.

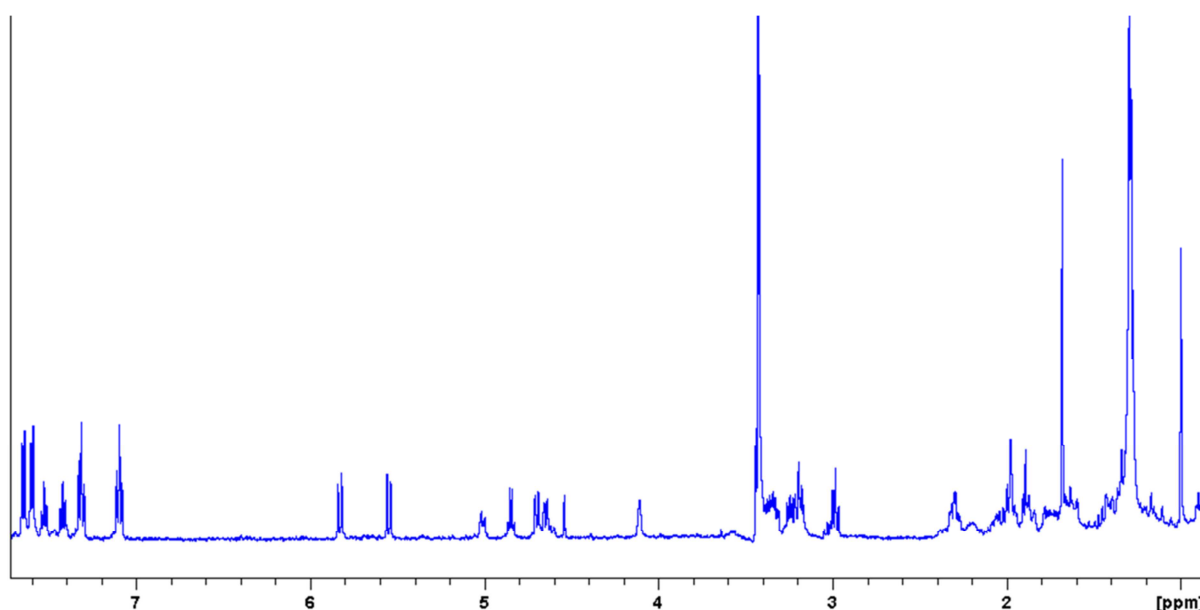


Figure 84 Spectre $^1\text{H-NMR}$ du composé **O** (500 MHz, méthanol- d_4 , avec suppression du signal du méthanol et de l'eau)

Des nombreux protons résonants dans la région des protons aliphatiques du spectre $^1\text{H-NMR}$ indiquent la nature terpénique du composé **O** (**Figure 84**). La soustraction des carbones de deux acides benzoïques et des deux didésoxy-hexoses méthoxylés de la formule brute du composé **O** conduit à un noyau de base portant 21 carbones (fragment observé à m/z 345,2056) ce qui valide la nature prégnanique de ce composé. La présence de trois méthines oxygénées, de quatre carbones quaternaires oxygénés ainsi que la comparaison des données spectrales avec celles de la bibliographie suggère la présence d'un noyau prégnane poly-hydroxylé (voir 2.3, page 36). Grâce aux corrélations COSY, HSQC et HMBC, on peut vérifier la présence d'un système pentacyclique composé de trois cyclohexanes et d'un cyclopentane. Dans le spectre HMBC, les carbones quaternaires à 76,1 et 40,1 ppm corrélient avec les méthylènes de la position 1 (1,78 et 1,42 ppm) et 4 (1,99 et 1,76 ppm). Ainsi, on détermine qu'il s'agit des carbones C-10 (40,1 ppm) et C-5 (76,1 ppm). De plus, les protons du méthyle de la position 19 corrélient avec les C-1 (28,0 ppm), C-5 (76,1 ppm) et C-9 (37,1 ppm). La résonance des deux protons oléfiniques en position *cis* à δ 5,55 et 5,85 comme deux doublets qui couplent entre eux avec une constante de couplage de 10,3 Hz, montre la présence d'un noyau prégnène. Sur la base des corrélations HMBC entre le H-7 (5,83 ppm) et le C-5 (76,1 ppm) et entre le

H-6 (5,55 ppm) et le C-8 oxygéné (74,8 ppm), la position de la double liaison est attribuée entre le C-6 et le C-7.

Le composé **O** est donc identifié comme un pregnène $\Delta^{6,7}$, comme les pregnanes isolés de *Caralluma quadrangula* (Abdallah et al. 2013), *Gymnema alternifolium* (Yoshikawa et al., 1998; Yoshikawa et al., 1999), *Stephanotis lutchuensis* var. *japonica* (Yoshikawa et al., 1996) et *Araujia sericifera* (Warashina et Noro, 2003), des espèces appartenant aussi à la sous-famille des Asclépiadoïdées. De plus, le proton oléfinique H-7 (5,83 ppm) corrèle avec un carbone quaternaire oxygéné qui s'est avéré comme étant le carbone de la position 14 (δC 88,9). L'orientation α de l'hydroxyle 5 et l'orientation β des hydroxyles des positions 8 et 14 sont les seules observées dans les composés isolés à ce jour. Ici, elles sont confirmées par comparaison des déplacements chimiques des carbones C-5, C-8 et C-14 respectivement, avec les données bibliographiques obtenues par l'acquisition des spectres dans la pyridine au lieu de méthanol deutéré (**Tableau 13**).

	<i>Cynanchum marnierianum</i> Marnieranoside A	<i>Gymnema alternifolium</i> (Composé 6)	<i>Araujia sericifera</i> (Composé 16)
Position	δC	δC	δC
1	28,0	27,9	27,7
2	27,0	26,9	26,6
3	75,9	75,1	74,9
4	39,4	39,4	39,2
5	76,1	75,0	74,8
6	136,5	136,2	136,8
7	127,6	127,4	127,3
8	74,8	74,2	74,1
9	37,1	37,3	36,8
10	40,1	39,9	39,7
11	24,1	24,0	23,7
12	76,8	76,0	75,8
13	59,1	58,4	58,2
14	88,9	88,4	88,3
15	33,5	33,5	33,2
16	35,0	34,6	34,3
17	88,8	87,9	87,8
18	12,4	12,8	12,4
19	21,3	21,9	21,5
20	75,7	75,5	75,4
21	15,6	16,0	15,6

Tableau 13 Comparaison des données ^{13}C -RMN du composé A (en méthanol- d_4) avec les composés portant la même génine isolés (en pyridine- d_5) des Asclépiadoïdées *Gymnema alternifolium* (Yoshikawa et al., 1998) et *Araujia sericifera* (Warashina et Noro, 2003).

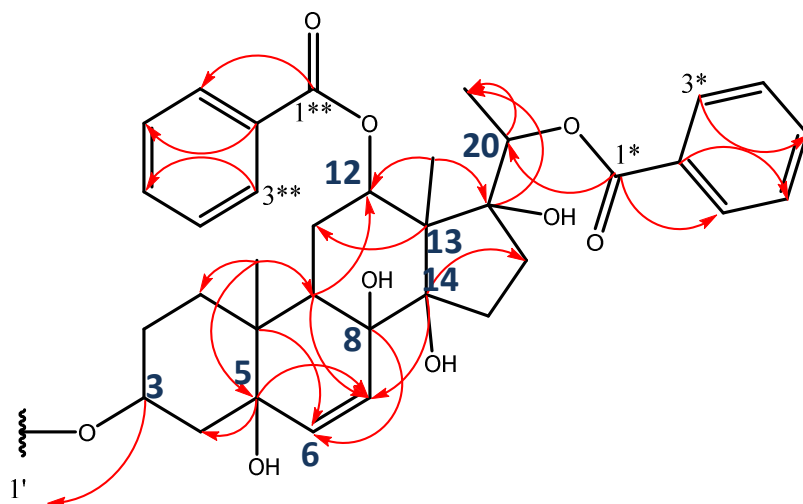


Figure 85 Représentation schématique des corrélations HMBC C $\rightarrow$ H principales du composé **O**

Le déplacement chimique du proton H-12 indique la présence d'un oxygène sur le C-12 comme chez les composés **A**, **D**, **E** et **F**. Néanmoins, les déplacements chimiques du C-12 et H-12 sont plus déblindés que chez les composés isolés de *C. menarandrense* et leur comparaison avec les données bibliographiques (Yoshikawa 1999) suggèrent l'estérification de l'hydroxyle de la position 12. L'orientation de cet hydroxyle est déterminée comme β (équatoriale) sur la base de la corrélation ROE entre le H-12 et le H-9 qui est prédéfini par la biosynthèse en orientation α (**Figure 86**). Cette observation est en accord avec la large constante de couplage ($J_{\text{axial-axial}}$) observée pour le H-12 (dd 10,2 ; 4,3), faisant preuve de son orientation axiale (α).

Dans le spectre HMBC, le CH₃-18 corrèle avec le carbone quaternaire oxygéné du C-17 qui, à son tour, par les corrélations HMBC indique le CH₃-21 et la méthine oxygénée de la position 20. La comparaison du déplacement chimique du carbone C-17 (88,8 ppm) avec les données de la littérature indique que le groupement OH de la position 17 est en orientation β . Cette indication est validée par la corrélation ROESY entre les protons H-12 et H-20 (Li et al., 2006).

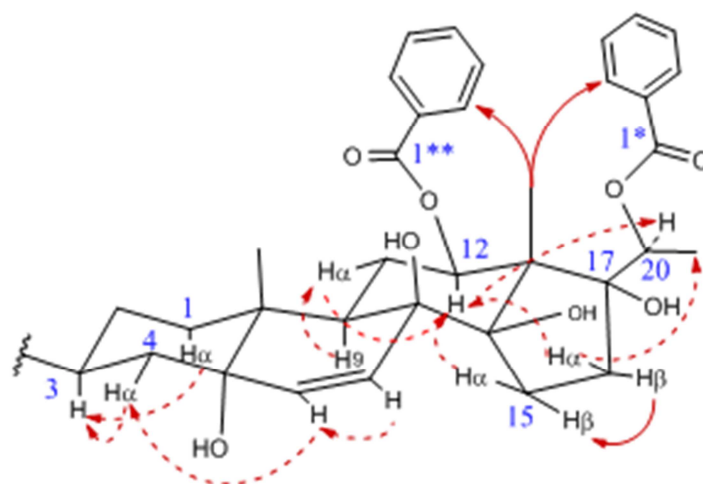


Figure 86 Représentation schématique des corrélations ROE principales observées pour la génine du composé **O**. (Rouge continu — : au-dessus du plan, rouge tiret---- : en dessous du plan)

Les déplacements chimiques du C-20 (75,7 ppm) et du H-20 (4,84 ppm) suggèrent l'estérification de l'hydroxyle fixé sur le C-20, ce qui est confirmé par la corrélation HMBC du carbonyle à δ 166,7 avec le H-20. En revanche, la corrélation de H-12 avec le carbonyle du deuxième acide benzoïque n'a pas pu être observée. La validation de l'estérification de ce groupement benzoyle sur l'hydroxyle de la position 12 a été faite sur la base de l'absence des autres déplacements chimiques indicatifs d'une estérification et des corrélations ROE entre H3** et les protons du méthyle CH₃-18 qui fait preuve de leur proximité dans l'espace (**Figure 86**).

La configuration absolue de la position 20 est déterminée en se basant sur les données bibliographiques. Lors d'une étude de réduction de 20-prégnanones en 20-prégnanols, il a été prouvé que le déplacement chimique du carbone des positions 16 et 20 est modifié en fonction de la configuration absolue de la position 20 (Kimura et al. 1982). En configuration 20S, les carbones C20 et C16 sont plus déblindés ($\Delta\delta C \approx +5$ ppm). Ce phénomène est expliqué par l'encombrement stérique entre les méthyles des positions 18 et 21 (Kimura et al. 1982; Al-Massarani et al. 2012). Ainsi, on déduit que la position 20 est en configuration S suite à la comparaison des données expérimentales du composé **O** (δC -16 : 35,0 et δC -20 : 75,7) avec celles des composés ayant le même environnement chimique au niveau du noyau D parus dans littérature (δC -16 : 33,6 -34,5 et δC -20 : 74,3 - 75,9) (Warashina et Noro 2003; Yoshikawa et al. 1996; Yoshikawa et al. 1998).

Les constantes de couplage larges des protons anomériques nous ont permis de déterminer qu'il s'agit de β sucres. De plus, tous les β 2,6-didésoxy sucres chez les Asclépiadoïdées appartiennent à la série D et tous les α 2,6-didésoxy sucres à la série L. Le déplacement chimique du carbone de la position 2 du sucre est aussi indicatif de la configuration du sucre. Dans le cas des β -D sucres, il résonne entre 35,0 et 38,0 ppm tandis que dans le cas des α -L-2,6-didésoxy sucres, il résonne entre 30,0 et 32,0 ppm (Vleggaar et al. 1993). Compte tenu du δC -2' (37,8) et δC -2'' (37,9), on peut déduire que les deux 2,6-didésoxy sucres sont de la série β -D. Les corrélations ROE ont permis la détermination de l'identité de ces deux 2,6-didésoxy sucres. Le proton anomérique H-1'' (4,70 ppm *dd* 9,6, 1,7 Hz) corrèle avec H-3'' (3,20 ppm *ddd* 11,6, 8,7, 4,9 Hz) et H-5'' (3,24 ppm *dq* 9,5, 6,2 Hz), les trois étant en dessous du plan du sucre. Le H-4'' (2,98 ppm *br t* 9,1 Hz) corrèle avec le CH₃-6'' (1,31 ppm *d* 6,0 Hz) au-dessus du niveau du plan du sucre. Le sucre est donc le **β -D-oléandropyranose** (**Figure 87**). L'autre sucre est identifié comme un **β -D-cymaropyranose** sur la base des corrélations ROE entre H-1' (4,65 ppm *dd* 9,6 ; 1,9 Hz) et H-5' (3,35 ppm *dq* 9,5 ; 6,2 Hz) en dessous du plan du noyau du sucre et les corrélations ROE entre H-3' (3,34 ppm *dt* 12,7 ; 6,3 Hz), H-4' (3,19 ppm *dd* 12,9 ; 6,0 Hz) et H-6' (1,27 ppm *d* 6,2 Hz) au-dessus du plan du sucre (**Figure 87**). La corrélation HMBC entre le C-1'' de l'oléandrose avec le H-4' du cymarose montre la liaison 1 $\rightarrow$ 4 entre les deux sucres.

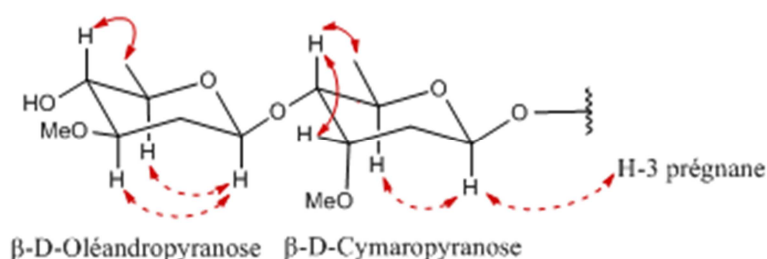


Figure 87 Représentation schématique des corrélations ROE principales observées pour la partie osidique du composé **O**. (Rouge continu — : au-dessus du plan, rouge tiret--- : en dessous du plan)

L'ensemble de ces données spectrales nous a permis de faire la détermination structurale du composé **O** comme étant le **12 β ,20S -O-dibenzoyle-prégn-6-èn-3 β ,5 α ,8 β ,14 β ,17 β -tétraol-3-O- β -D-oléandropyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranoside**. Il s'agit d'un nouveau produit naturel que nous avons décidé de nommer **marnieranoside A**.

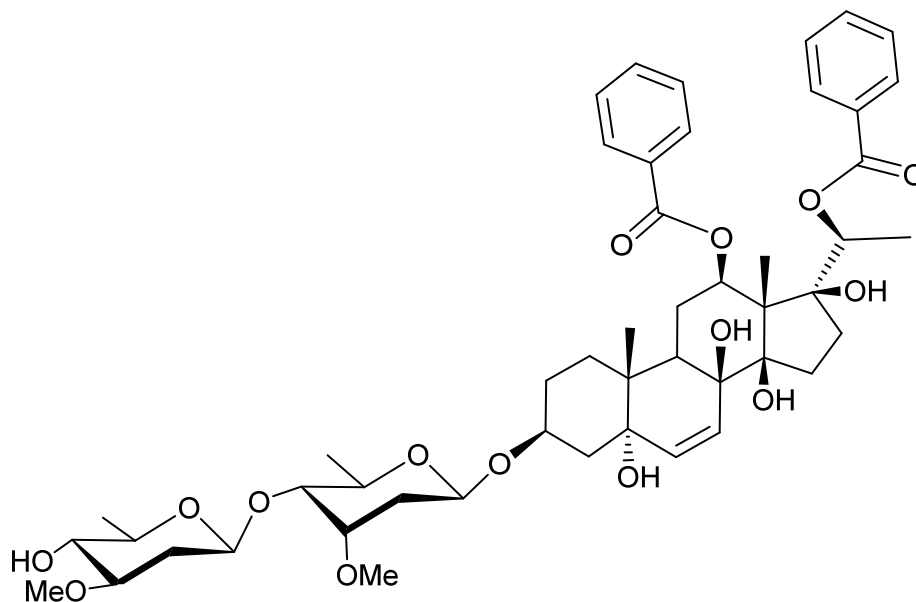


Figure 88 Structure du composé **O** : le marnieranoside A

5.2.5. Détermination structurale du composé P

Le composé a été isolé sous forme d'une poudre blanche amorphe. Son spectre UV avec des maxima à 229 et un épaulement à 274 nm indiquent la présence des groupements aromatiques comme dans le composé **O**.

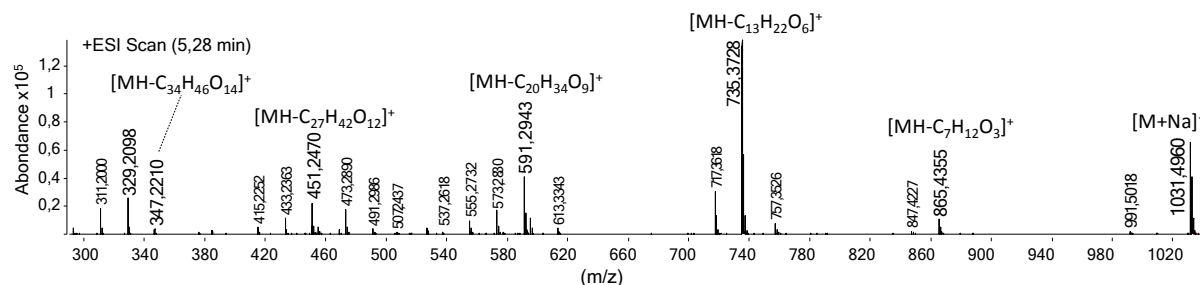


Figure 89 Spectre ESI-HRMS du composé P

L'analyse HPLC-ESI-HRMS en mode positif (Figure 89) a donné la formule brute du composé comme étant $C_{55}H_{76}O_{17}$ à partir de l'ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ observé à m/z 1031,4960 (erreur 2,16 ppm).

Le haut poids moléculaire du composé ainsi que le spectre 1H -RMN ressemblant à celui du composé **O** indiquent la nature du composé **P** comme étant un prégnane substitué avec des sucres et des groupements aromatiques.

Le spectre HSQC du composé **P** démontre la présence de trois protons anomériques ($\delta H1'$ 4,66 ; $\delta H1''$ 4,71 et $\delta H1'''$ 4,62) qui d'après le spectre COSY sont des 2,6-didésoxy-hexoses. On peut observer deux méthoxyles qui, d'après les corrélations HMBC, sont fixés sur le premier et le dernier 2,6-didésoxy-hexose, respectivement. Cet enchaînement des sucres est confirmé par les fragments à m/z 865,4355 $[MH-C_7H_{12}O_3]^+$ (correspondant à la perte d'un didésoxyhexose méthoxylé), 735,3728 $[MH-C_{13}H_{22}O_6]^+$ (correspondant à la perte d'un didésoxyhexose) et 591,2943 $[MH-C_{20}H_{34}O_9]^+$ (correspondant à la perte d'un didésoxyhexose méthoxylé). De la même façon que pour le composé **O**, les constantes de couplage des proton anomériques, les déplacements chimiques des carbones et des protons ainsi que les corrélations ROE (Figure 90) ont permis l'identification de ces sucres comme étant le β -D-cymaropyranose, le β -D-canaropyranose et à la fin de l'enchaînement osidique, le β -D-oléandropyranose. Les corrélations HMBC montrent que les sucres sont liés avec des liaisons 1 $\rightarrow$ 4 glycosidiques.

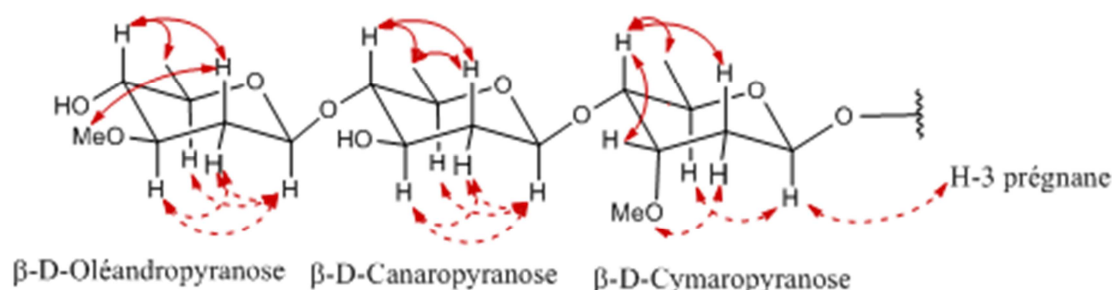


Figure 90 Représentation schématique des corrélations ROE principales observées pour la partie osidique du composé **P**. (Rouge continu — : au-dessus du plan, rouge tiret --- : en dessous du plan)

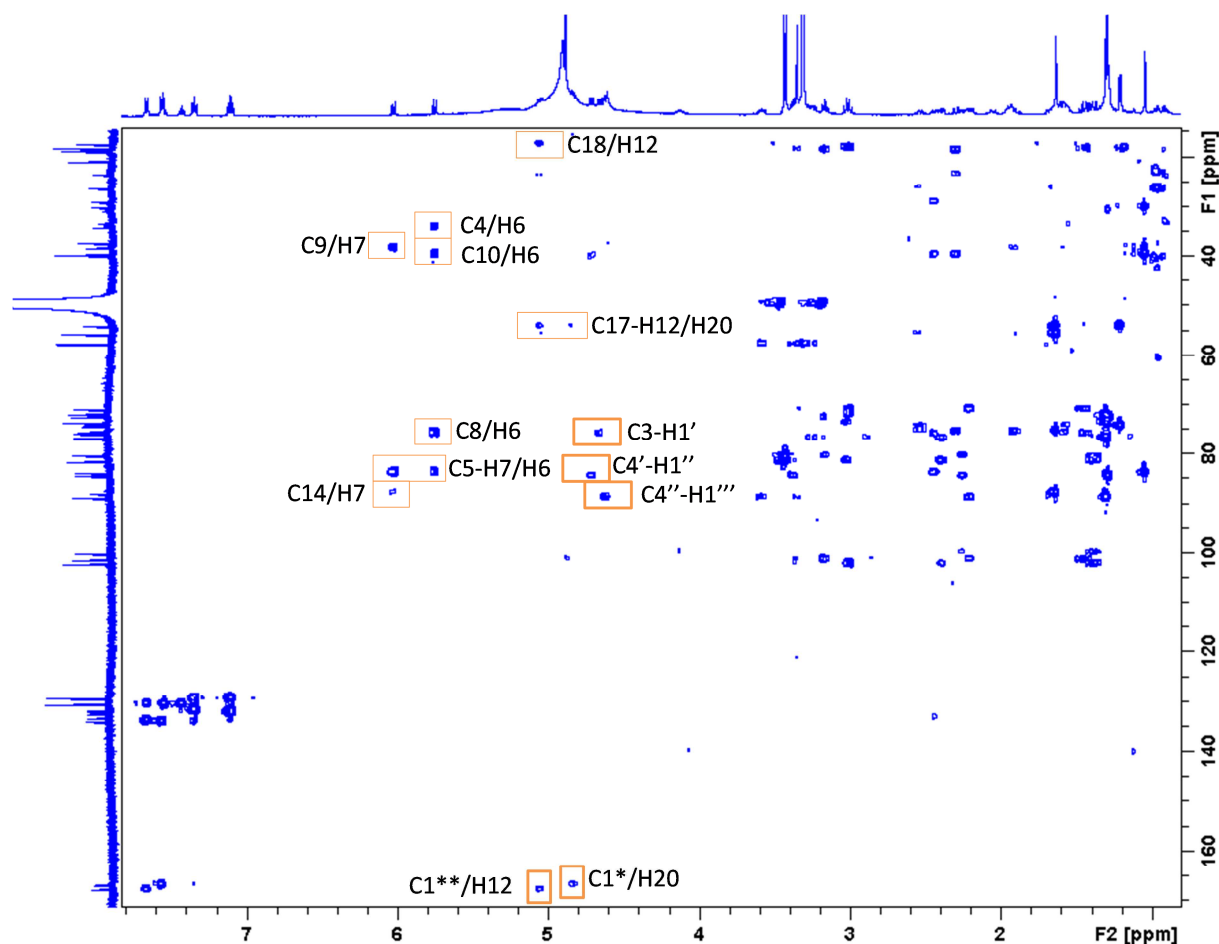


Figure 91 Spectre HMBC (500MHz, méthanol- d_4) du composé **P** avec les corrélations les plus importantes annotées.

Le spectre ^1H -RMN montre 10 protons aromatiques résonnant dans deux systèmes AA'BB'X aux mêmes déplacements chimiques que les protons aromatiques du composé **O**. Les corrélations HMBC entre les carbonyles et les protons des noyaux aromatiques monosubstitués confirment qu'il s'agit des groupements benzoyles. Les carbonyles corréleront aussi avec les protons H-12 (5,06 ppm) et H-20 (4,83 ppm) du noyau prégnane, indiquant où les groupements benzoyle sont fixés.

Contrairement au composé **O**, la position 17 est constituée d'une méthine à la place d'un carbone quaternaire oxygéné. L'orientation de H-17 est déterminée comme α par les corrélations ROE avec les H-15 α et H-16 α ainsi que par l'absence de corrélation ROE avec le CH₃-18 (orientation β par biosynthèse). Comme pour le composé **O**, en comparant les déplacements chimiques des C-16 (26,3 ppm) et C-20 (74,3 ppm) avec les données spectrales de 17-H prégnanes, on déduit que la configuration absolue de la position 20 est *R* (Abdel-Sattar et al. 2008; Al-Massarani et al. 2012). Dans les cas contraire, à savoir pour une configuration 20*S*, le C-16 résonne à 19,0 ppm et le C-20 à 65,5 ppm (Warashina et Noro 2003).

Tableau 14 Déplacements chimiques des positions 16 et 20 du spectre ^{13}C -RMN indiquant la configuration absolue de la position 20 (Al-Massarani et al., 2012)

Position	20 R	20 S
δ C-16	26,0	18,9
δ C-20	75,0	65,8

Les déplacements chimiques des carbones C-5 à C-7 présentent des différences significatives avec les données spectrales du composé **1** et celles publiées sur les $\Delta^{6,7}$ prégnènes. La différence la plus accentuée étant celle du C-5 qui est déblindé de +7 ppm, suggérant une stéréochimie différente de ce carbone avec l'hydroxyle étant au-dessus du plan. Dans ce cas, la fusion *cis* entre les noyaux A et B prégnaniques engendrant une modification de la configuration du noyau B, peut expliquer les modifications des déplacements chimiques (carbone et proton) des positions 6 et 7 (voir Annexe : tableaux RMN des prégnanes isolés, page 138).

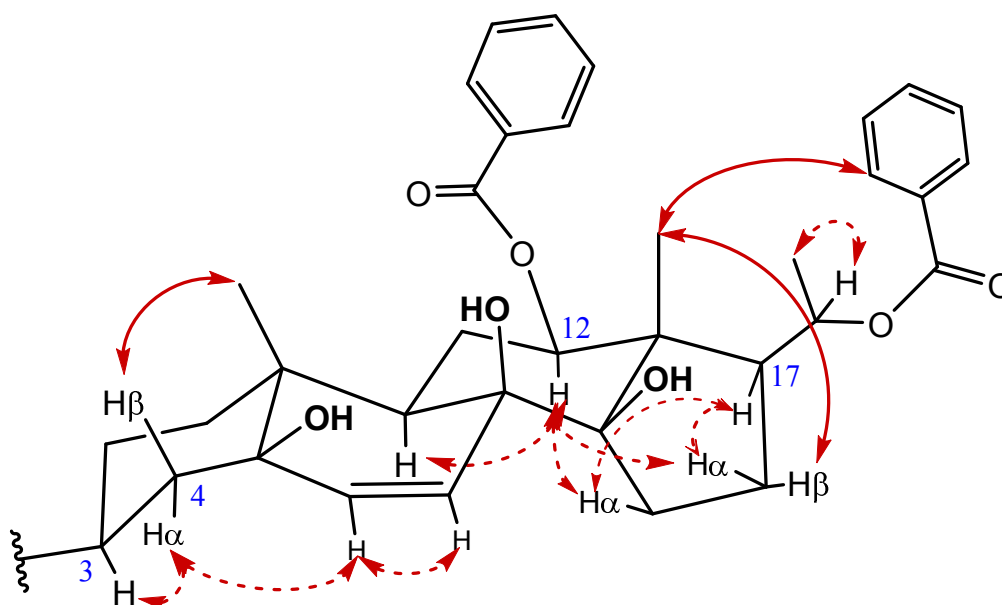


Figure 92 Représentation schématique des corrélations ROE principales, observées pour la partie osidique du composé **P**. (Rouge continu —: au-dessus du plan, rouge tiret ----: en dessous du plan)

L'ensemble de ces données spectrales nous a permis de déterminer la structure du composé **O** comme étant le 12 β ,20 R -*O*-dibenzoyle-prégn-6-èn-3 β ,5 β ,8 β ,14 β -triol-3-*O*- β -D-oléandropyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-canaro-pyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-cymaropyranoside. Il s'agit d'un nouveau produit naturel que nous avons décidé de nommer **marnieranoside B**.

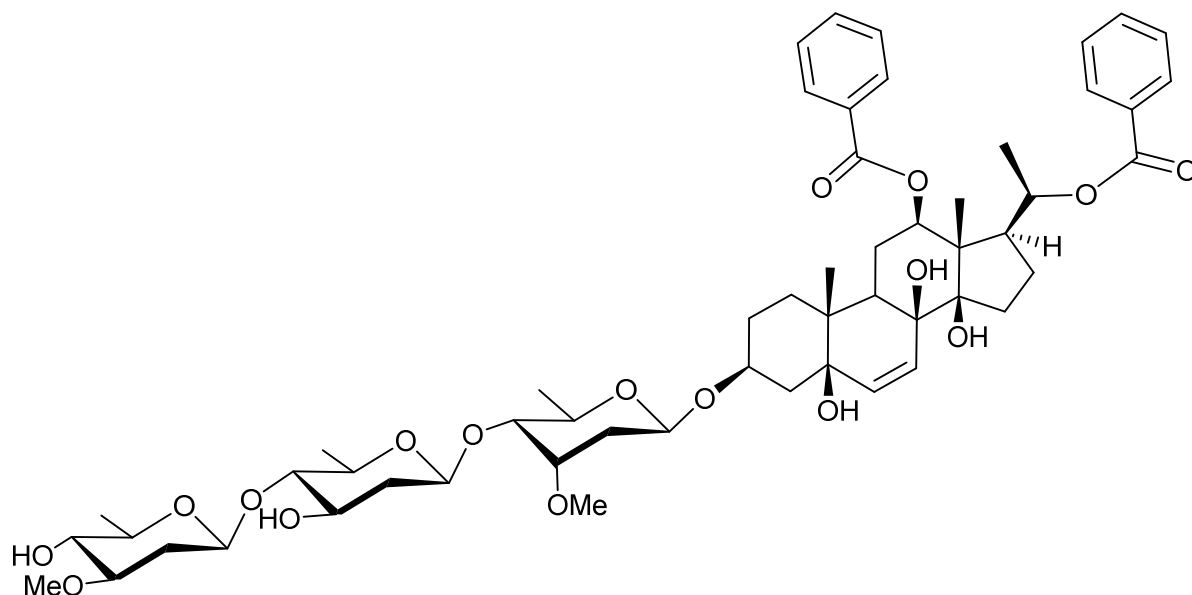


Figure 93 Structure du composé **P** : le marnieranoside B

5.2.6. Détermination structurale du composé Q

Le composé Q a été isolé sous forme d'un solide jaune. Son spectre UV présentant des maxima à 261 nm et à 321 nm suggère que ce composé est un flavonoïde (Mabry, Markham, et Thomas 1970).

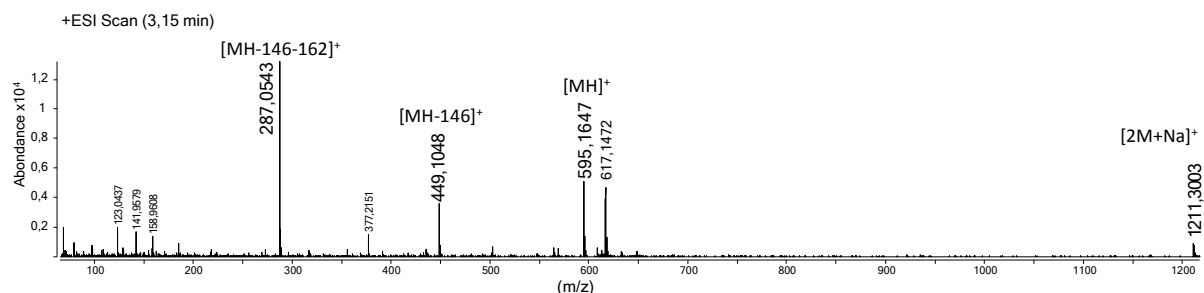


Figure 94 Spectre ESI-HRMS du composé Q

L'analyse HPLC-ESI-HRMS en mode positif (Figure 94) a indiqué la formule brute du composé Q comme étant $C_{27}H_{30}O_{15}$ à partir de l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ observé à m/z 595,1547 (erreur 0,96 ppm). Les ions à m/z 449,1048 = $[MH-146]^+$ et à 287,0543 $[MH-146-162]^+$ peuvent être interprétés comme les fragments du composé Q suite la perte d'un désoxy-hexose et la perte d'un hexose. Le dernier ion révèle la formule de l'aglycone comme étant $C_{15}H_{10}O_6$. Le motif de résonance des protons aromatiques dans le spectre 1H -RMN indique, comme dans le composé J, que l'aglycone du composé Q est le kaempférol, ce qui confirme la formule brute indiquée par la HRMS. De plus, deux protons anomériques sont observés et résonnent à δ_H 5,74 (d ; 7,3 Hz) et 5,24 (d ; 1,2 Hz) indiquant un β et un α hexose. Les constantes de couplage et les corrélations observées dans les spectres COSY et NOESY ont permis l'identification de ces hexoses comme étant le β -glucose et l' α -rhamnose. Le proton anomérique du rhamnose H1''' corrèle dans le spectre HMBC avec le carbone C2'' faisant preuve de la 1 $\rightarrow$ 2 liaison glycosidique. Le proton anomérique du glucose H1'', par contre, ne corrèle pas avec un carbone de l'aglycone. L'attribution de la fixation de la chaîne glycosidique à la position 3 du kaempférol est réalisée en se basant sur la corrélation NOE entre les protons H2' et H6' avec le proton H2'' du glucose, permettant de le situer entre les noyaux B et C du flavonoïde.

La comparaison des déplacements chimiques avec les données de la littérature (Kazuma, Noda, et Suzuki 2003) confirme l'attribution de la structure du composé Q comme étant le kaempférol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside ou **kaempférol-3-O-néohespéridoside**.

Tableau 15 Données ^1H -RMN et corrélations NOESY observées pour le composé **Q**
(500 MHz, méthanol- d_4)

	Position	δC	δH	mult	J (Hz)	NOESY
Kaempférol	6	99,7	6,18	d	1,6	
	8	94,5	6,37	d	1,7	
	2', 6'	132,0	8,05	d	8,8	H3'/H5', H2'', H6'''
	3', 5'	116,0	6,90	d	8,8	
3-O-Glucose	1''	100,3	5,74	d	7,3	H5'', H3''
	2''	80,0	3,62	dd	9,2 ; 7,8	
	3''	78,8	3,57	dd	9,2 ; 8,1	
	4''	71,8	3,30	dd	9,7 ; 8,7	
	5''	78,4	3,24	ddd	10,0 ; 8,0 ; 3,3	
	6''a		3,74	dd	13,5 ; 2,0	H5'' H6''b
	6''b	62,7	3,52	dd	12,2 ; 6,0	
2''-O-Rhamnose	1'''	102,5	5,24	d	1,2	H2'', H5'''
	2'''	72,3	4,01	m	-	H3''', H5''', H6'''
	3'''	72,2	3,79	dd	9,7 ; 3,8	
	4'''	73,9	3,34	t	9,6	
	5'''	69,9	4,04	m	-	
	6'''	17,4	0,96	d	6,2	

Il est à noter que le kaempférol-3-O-néohespéridoside exerce des **effets insulino-mimétiques** pouvant augmenter la capture du glucose par les muscles. Par contre, suite à l'essai du kaempférol et du néohespéridoside, il s'est avéré que cette activité est due à sa partie osidique (Yamasaki et al., 2011).

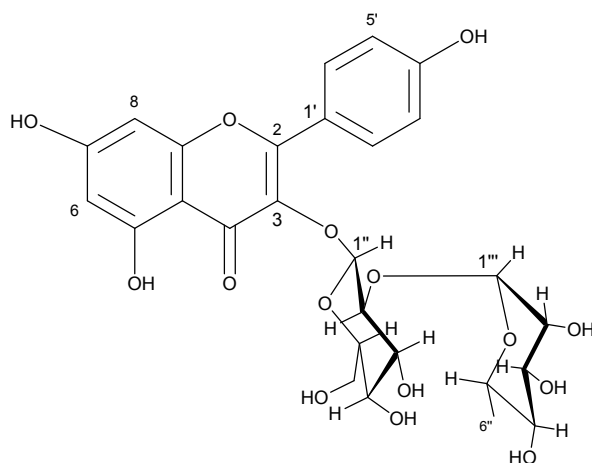


Figure 95 Structure du composé **Q** : le **kaempférol-3-O-néohespéridoside**

6. Evaluation des effets biologiques

Lors de cette étude, des expériences *in vitro* ont été réalisées afin d'orienter la sélection du matériel végétal et de réaliser son fractionnement bio-guidé. La validation de cette stratégie a été poursuivie en vérifiant les effets biologiques des composés isolés. Ces expériences consistent notamment en l'évaluation de l'effet GLP-1 sécrétagogue des extraits, fractions ou composés purifiés mais aussi en la mesure de la viabilité cellulaire après traitement.

6.1. Modèle *in vitro* utilisant la lignée STC-1

6.1.1. Criblage initial

La sélection du matériel végétal a été basée au départ sur des critères taxonomiques. En effet, des échantillons d'espèces taxonomiquement proches de *Hoodia gordonii*, à savoir appartenant à la sous-famille des Asclépiadoïdées, ont été réceptionnés du jardin exotique de Monaco. Ces échantillons, récoltés en août 2011, comprenaient des représentants des genres *Apteranthes*, *Caralluma*, *Ceropegia*, *Cynanchum* et *Stapelianthus*. La capacité de leurs extraits éthanoliques de stimuler la sécrétion du GLP-1 a été évaluée après mise en contact avec des cellules intestinales murines de la lignée STC-1. Ce criblage préliminaire a été effectué au sein de l'entreprise Phytodia selon un protocole d'évaluation de sécrétion du GLP-1 validé en interne. Les résultats sont résumés dans la Figure 96.

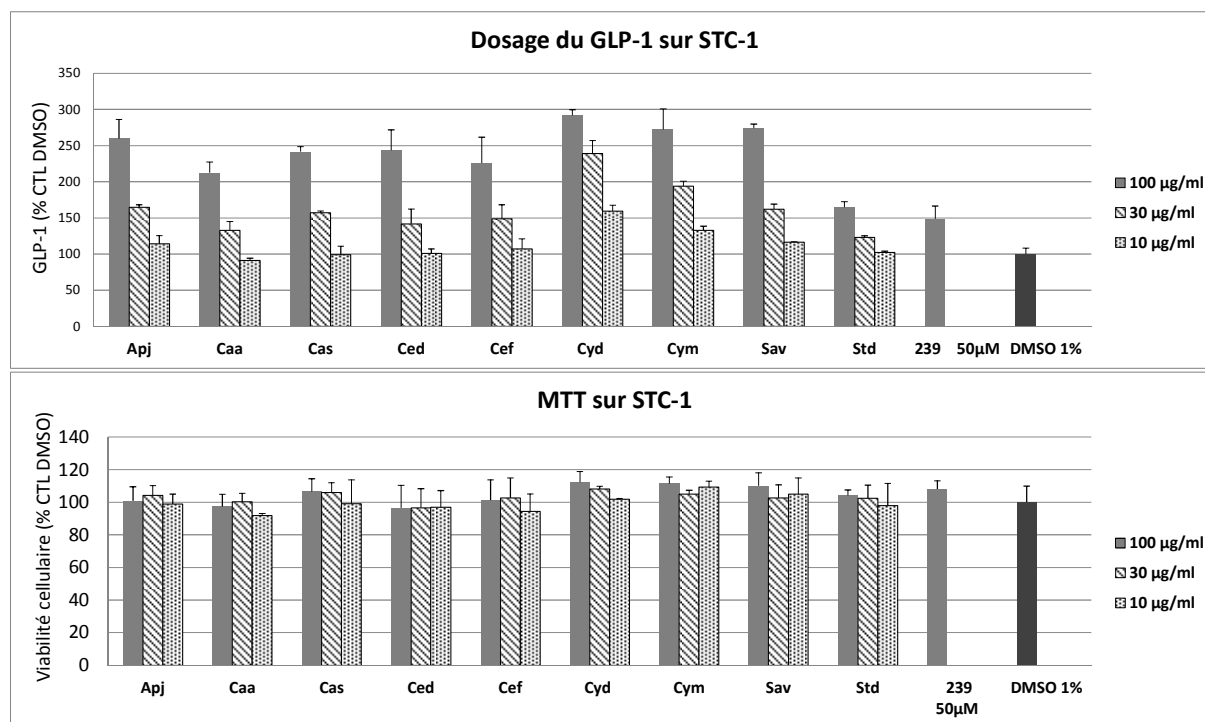


Figure 96 En haut : Résultats du criblage GLP-1 pour la sélection du matériel végétal provenant du jardin exotique de Monaco. En bas : Evaluation de la viabilité cellulaire exprimée en pourcentage sur le témoin négatif (DMSO 1 %) par MTT des extraits éthanoliques des mêmes échantillons d'Asclépiadoïdées Apj : *Apteranthes joannis*, Caa : *Caralluma acutangula*, Cas : *Caralluma speciosa*, Ced : *Ceropegia dichotoma*, Cef : *Ceropegia fusca*, Cyd : *Cynanchum descoingsii*, Cym : *Cynanchum marnierianum*, Sav : *Sarcostemma viminalis*, Std : *Stapelianthus dearyi*, 239 : témoin positif ; n=2

Pour ce criblage, les cellules sont en contact durant 30 minutes avec l'échantillon ou le témoin positif qui correspond à un triterpène hémisynthétique « RG239 » (50 μ M). Ce triterpène est capable de stimuler la sécrétion du GLP-1 via l'activation du récepteur TGR5 (Genet et al. 2010). Les traitements ont été appliqués à trois concentrations différentes (10, 30 et 100 μ g/ml), ce qui nous a permis d'observer une **réponse dose-dépendante**. Les espèces les plus actives ont été deux représentants du genre *Cynanchum* : ***Cynanchum marnierianum*** (lot Cym_Mo_08_11) et ***Cynanchum descoingsii***. En effet, leurs extraits ont stimulé la sécrétion du GLP-1 entre 250 % et 300 % par rapport aux cellules traitées uniquement avec le solvant de dissolution des extraits (témoin négatif, DMSO 1 %). De plus, les extraits ont présenté un effet sécrétagogue GLP-1 sans cytotoxicité apparente d'après l'essai avec le réactif MTT, même à la concentration de traitement la plus élevée (**Figure 96**).

Sur la base de ces résultats, c'est une concentration de 50 μ g/ml qui a été fixée pour le traitement des cellules avec des extraits ou des fractions issues d'espèces de *Cynanchum*.

Les résultats de ce criblage préliminaire nous ont orientés sur le genre *Cynanchum* et plus précisément sur le taxon des ***Cynanchum aphyllés malgaches***. Un deuxième lot de *C. descoingsii* et de *C. marnierianum* (lot Cym_Mo_03_12) récoltés en mars 2012 au jardin exotique de Monaco a été extrait à l'EtOH dans le but de confirmer leur effet sécrétagogue GLP-1. Dans la mesure où un effet significatif a bien été observé, nous avons pris contact avec l'arboretum d'Antsokay à Madagascar afin d'étudier des espèces issues de leur biotope naturel et de nous approvisionner d'un plus grand nombre d'échantillons de *Cynanchum* malgaches : *C. floriferum* (= *Folotsia floribunda* Desc.), *C. humbert-capuronii* Liede & Meve, *C. petignati* Liede & Rauh, *C. menarandrense* Jumelle & Perrier ainsi que quatre espèces de *Cynanchum* non encore botaniquement identifiées. Un nouvel échantillon de *C. marnierianum* (lot Cym_Ma_09_12) a également été fourni par l'arboretum mais son extrait alcoolique a été moins actif que le lot (Cym_Mo_03_12) dans nos conditions expérimentales. Lors de ce deuxième criblage, les extraits totaux de quatre espèces de *Cynanchum* sp. (non botaniquement identifiées) et de ***C. menarandrense*** (lot Cyme_05_12) présentent un effet sécrétagogue GLP-1 (**Figure 97**), sans manifestation de cytotoxicité apparente.

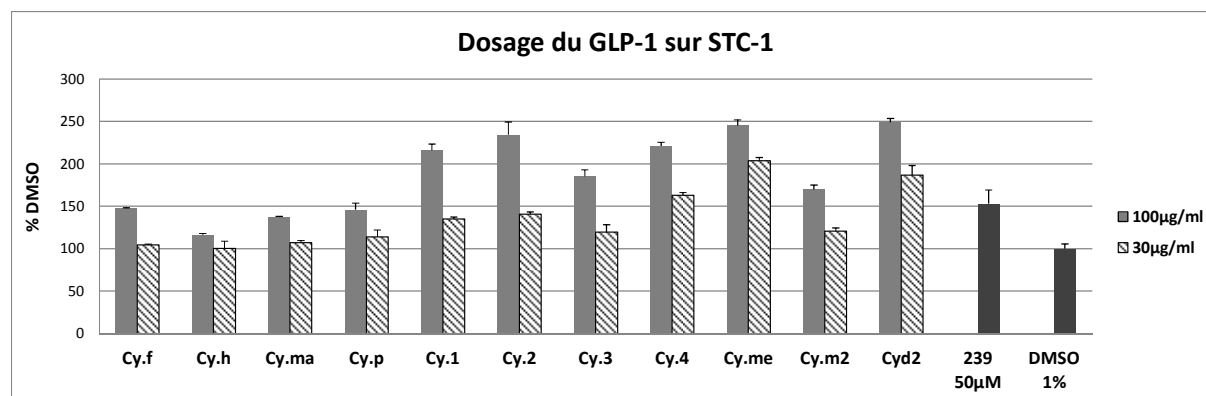


Figure 97 Criblage de différents échantillons de *Cynanchum*. Cy.f : *C. floriferum*, Cy.h : *C. humbert-capuronii*, Cy.ma : *C. marnierianum* (lot C) Cy.p : *C. petignati*, Cy.1-Cy.4 : *Cynanchum* spp, non encore botaniquement décrites, Cy.me : *C. menarandrense*, Cy.m2 et Cyd2 : deuxième lot de *C. marnierianum* et *C. descoingsii* de Monaco ; témoin positif : 239 ; n=2

En raison de leur potentiel antidiabétique par effet sécrétagogue GLP-1 et de la possibilité d'accès de ces ressources végétales, ce sont *Cynanchum marnierianum* et *Cynanchum menarandrense* qui ont été sélectionnées pour une investigation complète, à la fois phytochimique et biologique.

6.1.2. Optimisations du protocole de l'essai in vitro avec la lignée STC-1

Afin d'internaliser cet essai au laboratoire, d'optimiser la réponse cellulaire et de limiter les variations de résultats lors de différentes expériences, plusieurs paramètres ont été étudiés pour mettre en évidence un effet sécrétagogue GLP-1 en utilisant la lignée cellulaire STC-1.

La **confluence** des cellules ensemencées dans les puits a fait l'objet d'une étude préliminaire. Afin d'établir le nombre optimal de cellules ensemencées par puits, 4 concentrations de la suspension cellulaire à ensemercer ont été évaluées. Après 24 heures d'incubation, les cellules ont été observées au microscope (**Figure 98**)

Pour travailler dans des conditions de confluence cellulaire, la concentration de 2×10^4 cellules par puits a été retenue comme concentration cellulaire optimale à ensemercer dans chaque puits.

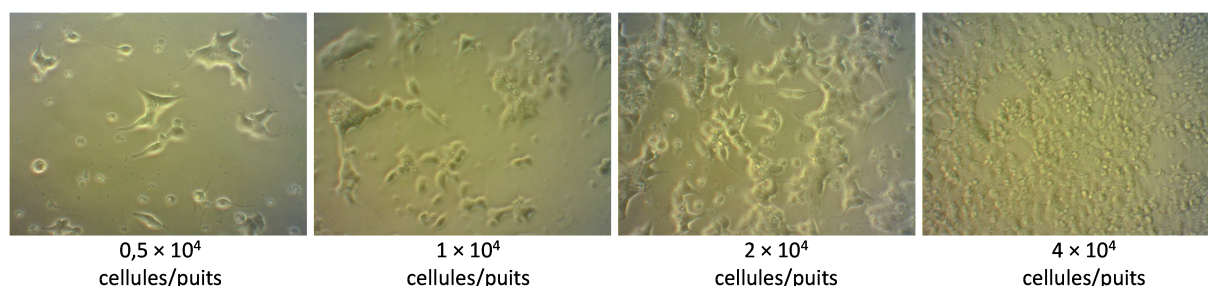


Figure 98 Influence du nombre des cellules par puits sur la croissance cellulaire après 24 h d'incubation.

► La **cinétique** de sécrétion du GLP-1 suite au traitement avec l'extrait de *C. marnierianum* a été étudiée par la suite. Dans un premier temps, des traitements plus longs de 3 heures ont été considérés comme inadaptés car plus l'incubation avec les échantillons à tester est longue, plus la sécrétion du GLP-1 paraît atténuée.

La modification du temps d'incubation des cellules en présence des échantillons **entre 30 minutes et 3 heures** ne présente pas d'altérations dans la réponse cellulaire. Pour des raisons d'homogénéité des protocoles expérimentaux utilisant d'autres lignées cellulaires, nous avons décidé d'incuber les cellules STC-1 pendant **2 heures** avec les échantillons avant de procéder au dosage du GLP-1 dans le surnageant.

► En parallèle, l'influence du **sérum foetal bovin (FBS)** a été étudiée. Comme la composition du sérum n'est pas bien définie mais que la présence de nutriments et de facteurs de croissance est susceptible d'atténuer la stimulation de la sécrétion du GLP-1, l'effet de la privation des cellules en FBS en amont du traitement, a été évalué. Ainsi, 3 heures avant le traitement par les échantillons, le milieu des puits a été remplacé par du milieu sans sérum. (**Figure 99**)

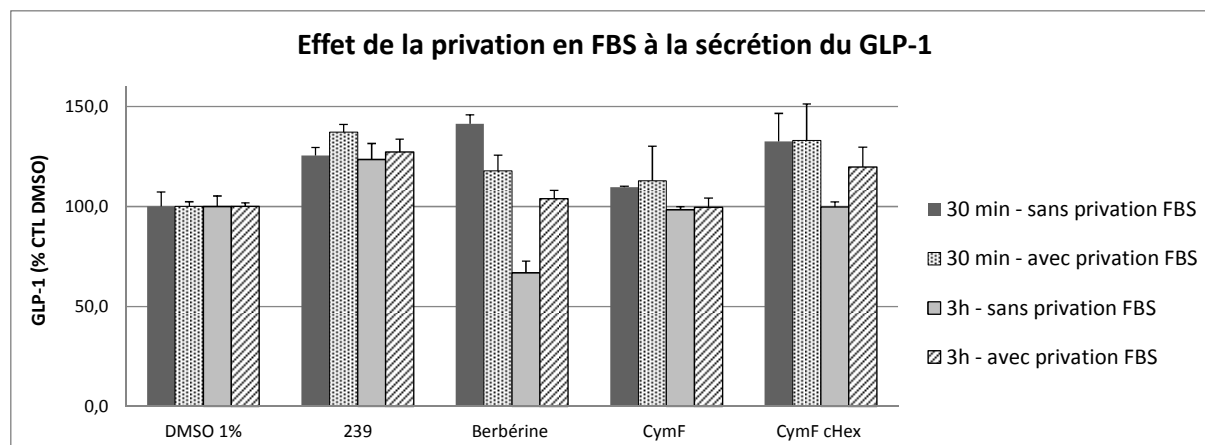


Figure 99 Evaluation de l'effet de la privation des cellules STC-1 en sérum de bœuf fœtal (FBS) suite au traitement de 30 minutes et de 3 heures. CymF : Extrait EtOH de *C. marnierianum* (lot E) à 50 µg/ml, CymF cHex : Fraction L/L cyclohexanique du CymF à 50 µg/ml. Témoin positif : 239 ; n=2

La privation en sérum ne semble avoir aucune influence dans la réponse des cellules STC-1 au traitement avec l'extrait éthanolique de *C. marnierianum* (lot E) ou de sa fraction cyclohexanique. Ainsi, la présence du FBS dans le milieu d'ensemencement n'a pas été modifiée et a été maintenue à 10 %, comme dans le milieu de culture.

► En se basant sur les données bibliographiques, la berbérine à 50 µM (Yu et al. 2010) et l'acide chlorogénique à 40 mM (Rafferty et al. 2011) ont été utilisés comme témoins positifs. La **berbérine** stimule la sécrétion du GLP-1 à des taux proches de 150 %, comme publié dans la littérature. Néanmoins, à la concentration de 100 µM comme il a été publié, la berbérine exerce un effet toxique significatif. Ceci nous a obligés de baisser la concentration appliquée à 50 µM.

L'**acide chlorogénique** ne montre aucun effet sur la sécrétion du GLP-1 aux concentrations de 0,4, 4,0 et 40 mM. A la plus forte concentration (40 mM), l'acide chlorogénique acidifie le pH du milieu et modifie sa couleur (indicateur de pH : rouge de phénol). La cytotoxicité observée suite au traitement à l'acide chlorogénique nous a conduits à l'abandon de ce témoin positif.

► Nous avons observé que le surnageant de la culture cellulaire contient des concentrations du GLP-1 supérieures à celles de la gamme des standards (soit 0-100 pM) utilisée pour corrélérer l'intensité de la fluorescence et la quantité du GLP-1 sécrété. Pour s'affranchir de ce problème, le surnageant est dilué avant d'être soumis au dosage par ELISA. La concentration calculée est par la suite rapportée au surnageant non dilué. Cette **dilution du surnageant** est susceptible d'influencer le dosage du GLP-1. Une dilution excessive risque en effet que la concentration du GLP-1 soit en dessous du seuil de détection lors du dosage par ELISA.

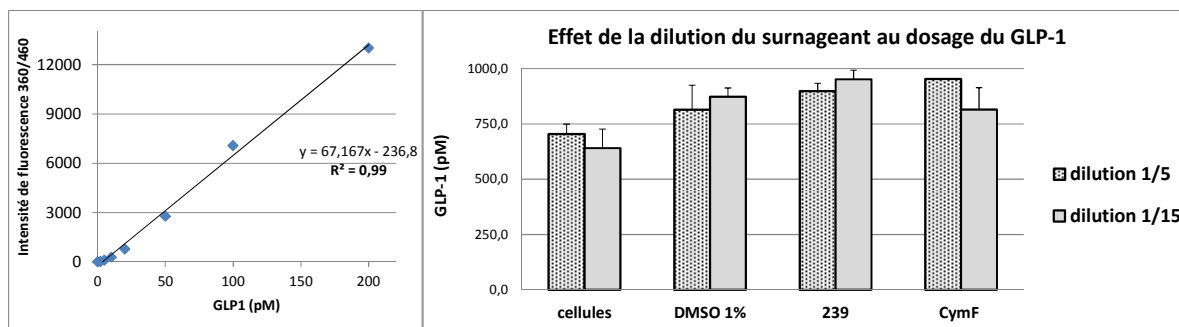


Figure 100 Courbe de corrélation GLP-1/ Fluorescence. Etude de l'influence de la dilution du surnageant sur la sensibilité de détection du GLP-1 sécrété. Témoin positif : 239 ; n=2

D'après les essais réalisés, la dilution du surnageant (**Figure 100**), les conditions de centrifugation de la plaque après le traitement ainsi que la sensibilité de détection du spectrofluorimètre, sont des paramètres qui n'influencent pas les résultats du dosage du GLP-1.

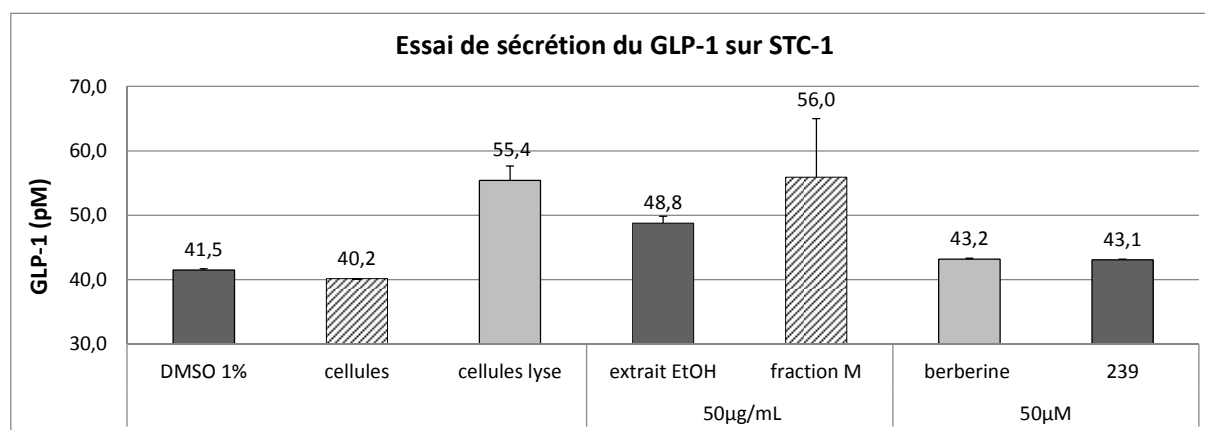


Figure 101 Evaluation de la lyse cellulaire sur la sécrétion du GLP-1. CymF : Extrait EtOH de *C. marnierianum* (lot E) à 50 µg/ml CymF M : Fraction bioactive de CymF à 50 µg/ml. Témoins positifs : Berbéline, 239 à 50 µM ; n=2

Des cellules STC-1 ont été mises en contact avec du détergent Triton-X afin qu'elles soient lysées. Le dosage du GLP-1 dans le surnageant montre une augmentation du GLP-1 due à la diffusion du GLP-1 dans le milieu extracellulaire, suite à la perturbation de l'intégrité cellulaire (**Figure 101**).

6.1.3. Résultats

Suite aux optimisations du modèle *in vitro* utilisant la lignée cellulaire STC-1, les composés isolés lors de cette étude ont été évalués pour leur capacité de stimuler la sécrétion du GLP-1. Pour comparer avec les expériences *in vitro* du criblage initial, l'extrait éthanolique de *C. menarandrense* (Cyme_09_12) a également été testé. Il exerce bien un effet sécrétagogue GLP-1 mais pas à la même intensité comme observé initialement (**Figure 97**, page 103).

Les métabolites ubiquitaires isolés (triterpènes et flavonoïdes) se sont avérés inactifs comme sécrétagogues GLP-1 dans nos conditions expérimentales.

Dans nos conditions expérimentales, la fraction enrichie en prégnanes de *C. menarandrense* (Cyme M) ainsi que tous les prégnanes isolés de cette fraction n'ont pas montré d'effet stimulateur de la sécrétion du GLP-1 (**Figure 102**). Afin de comparer l'activité des prégnanes isolés avec des témoins portant un châssis moléculaire proche ou identique, la prégnénolone et son dérivé sulfate ont été évalués. Le groupement sulfate ayant un caractère polaire fixé sur le noyau apolaire de la prégnénolone pourrait simuler le caractère amphiphile des glucosides prégnaniques **A-H**. De plus, le sulfate de prégnénolone a été décrit comme agoniste des récepteurs TRP (Harteneck 2013) dont la stimulation est capable de conduire à la sécrétion du GLP-1 (Emery et al. 2014). Comme les glucosides prégnaniques **A-H**, ces témoins n'ont pas exercé d'effet sécrétagogue GLP-1 dans nos conditions expérimentales (**Figure 102**).

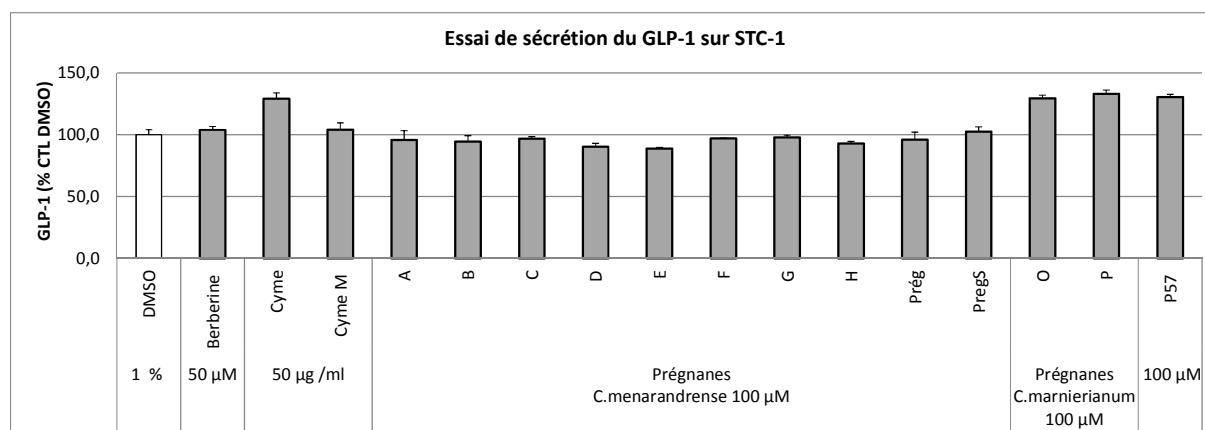


Figure 102 Evaluation de l'effet sécrétagogue des prégnanes isolés. Prég : Prégnénolone, PrégS : Sulfate de prégnénolone, Cyme : Extrait EtOH de *C. menarandrense*, Cyme M : Fraction enrichie en prégnanes de Cyme ; n=3.

Contrairement aux prégnanes de *C. menarandrense*, **les prégnanes O et P** isolés de *C. marnierianum* ainsi que le prégnane de *Hoodia gordonii*, le P57, **ont stimulé la sécrétion du GLP-1 de 130 %** à 100 μM. A noter que d'après la littérature, dans un modèle *ex vivo*, le P57 s'est avéré capable de stimuler la sécrétion du GLP-1 de 160 % (Le Nevé et al. 2010).

6.2. Autres modèles *in vitro*

Grâce à un séjour au Centre des Sciences métaboliques à Cambridge (UK), les composés isolés ont pu être également testés sur des cellules intestinales primaires murines isolées de l'iléon de souris « wild-type » ainsi que sur la lignée cellulaire GLUTag. Le contrôle positif de ces expériences a été le mélange forskoline / 3-isobutyl-1-méthylxanthine (F/I) qui peut stimuler la sécrétion du GLP-1 par augmentation de l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) intracellulaire.

6.2.1. Evaluation de l'effet sécrétagogue GLP-1 sur des cellules intestinales primaires murines

► Suite au traitement **des cellules intestinales primaires murines (cellules primaires)** pendant 2 heures avec les différents échantillons, le GLP-1 a été dosé dans le surnageant (**GLP-1 extracellulaire**). Après lyse cellulaire, le **GLP-1 intracellulaire** a également été dosé.

D'après les résultats obtenus (**Figure 103**), la fraction Cyme M, les prégnanes **A, B, C, D, H** et de manière plus importante les prégnanes **O** et **P** sont bien capables d'augmenter le GLP-1 intracellulaire. Cette observation peut être mieux observée dans la **Figure 104**. Ces résultats encourageants n'ont cependant pas pu être confirmés en répétant l'expérience.

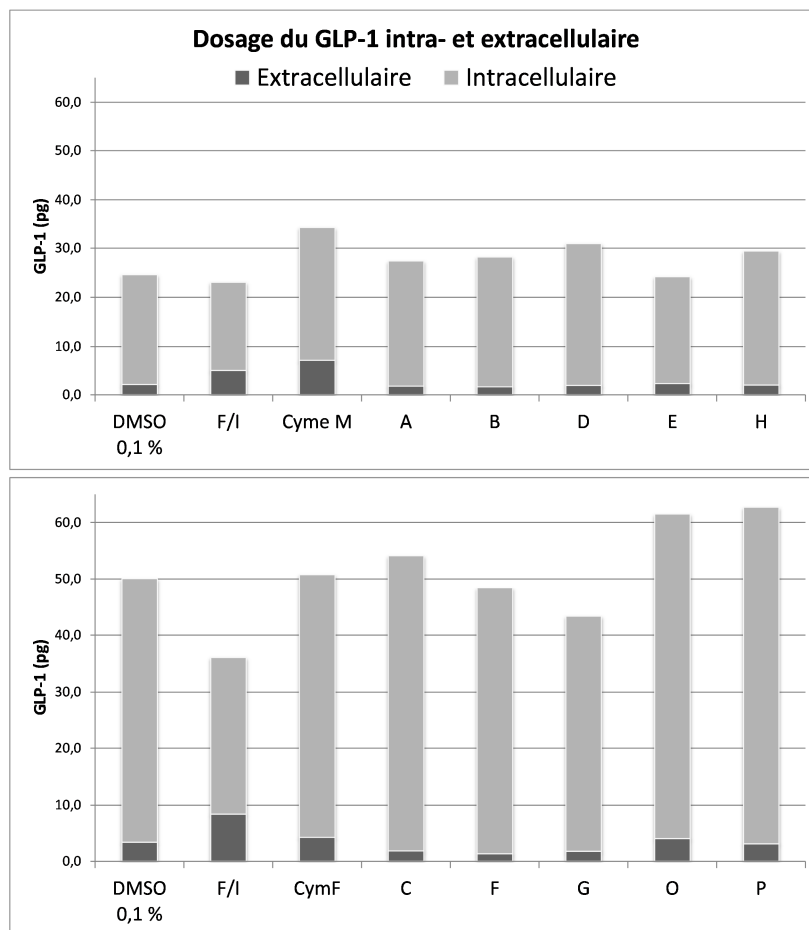


Figure 103 Dosage du GLP-1 intracellulaire et extracellulaire suite au traitement des cellules intestinales primaires murines par l'extrait EtOH de *C. marnierianum* (CymF), de la fraction enrichie en prégnanes de *C. menarandrense* (Cyme M), et des prégnanes isolés, témoin positif : forskoline/IBMX ; les deux histogrammes correspondent à deux plaques différentes ; n=3.

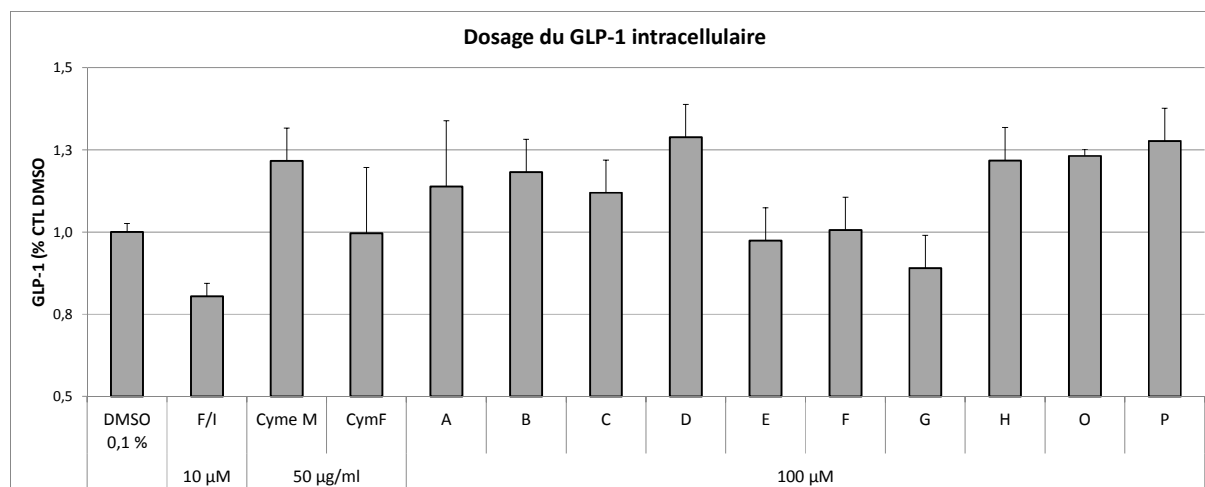


Figure 104 Evaluation de la stimulation du GLP-1 intracellulaire par rapport au contrôle négatif ; n=3

Suite aux dosages du GLP-1 intracellulaire et extracellulaire, la sécrétion du GLP-1 relative au témoin négatif (DMSO 1 %) a été calculée. Selon nos résultats (**Figure 105**), l'extrait CymF et la fraction enrichie Cyme M ont exercé un effet sécrétagogue GLP-1 mais ces résultats ont dû être validés par une seconde expérience en raison d'écart-types élevés.

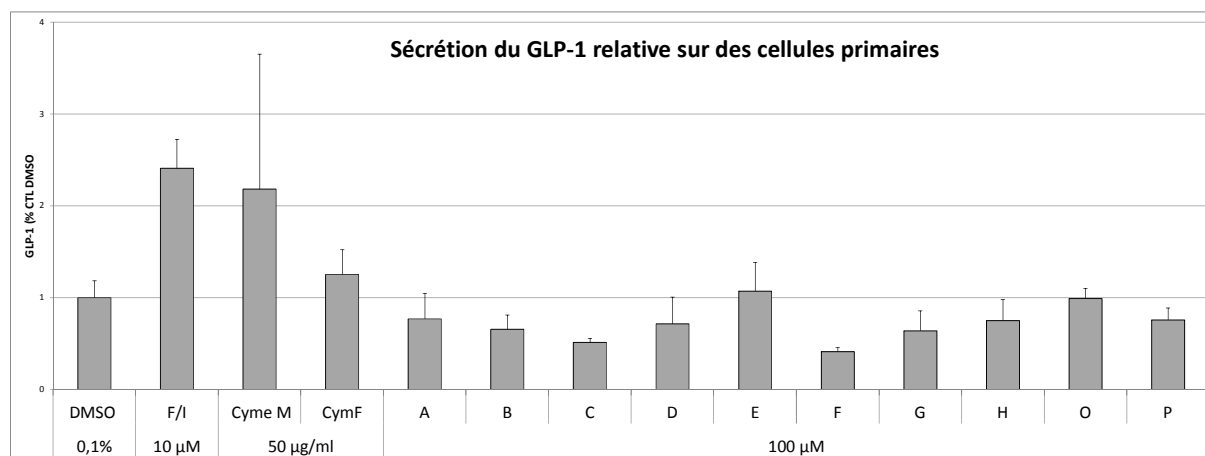


Figure 105 Evaluation de l'effet GLP-1 sécrétagogue de l'extrait EtOH de *C. marnierianum* (CymF), de la fraction enrichie en prégnanes de *C. menarandrense* (Cyme M), et des prégnanes isolés, témoin positif : forskoline/IBMX ; n=3.

Lors de cette répétition de l'expérience l'influence de la présence du glucose a été étudiée (**Figure 106**) compte tenu de l'effet sécrétagogue GLP-1 du glucose décrit dans la littérature (voir 1.3.2.ii page 18).

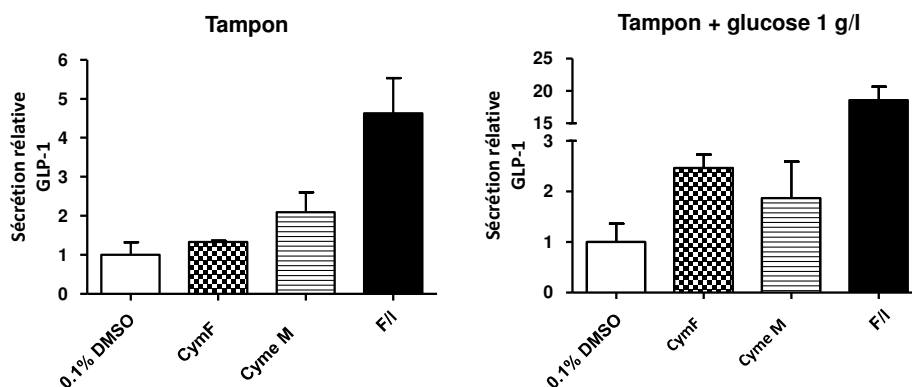


Figure 106 Evaluation de l'influence du glucose dans la sécrétion du GLP-1 par les cellules primaires traitées avec l'extrait EtOH de CymF et de la fraction Cyme M ; témoin positif F/I (forskoline/IBMX) ; à gauche dans du tampon sans glucose, à droite dans du tampon avec glucose ; n=3.

Nos résultats montrent que la présence du glucose peut accentuer l'effet GLP-1 sécrétagogue de l'extrait CymF mais n'impacte pas l'activité de la fraction enrichie en prégnanes Cyme M.

Pour tenter de comprendre pour quelles raisons la fraction enrichie en prégnanes Cyme M est active contrairement aux prégnanes **A-G** isolés de cette fraction, un mélange de ces composés dans les proportions indiquées par le chromatogramme HPLC-HRMS a été préparé.

Ce mélange reconstitué ne stimule pas la sécrétion du GLP-1 (**Figure 107**), suggérant que la fraction Cyme M contient d'autres composés minoritaires impliqués dans son activité.

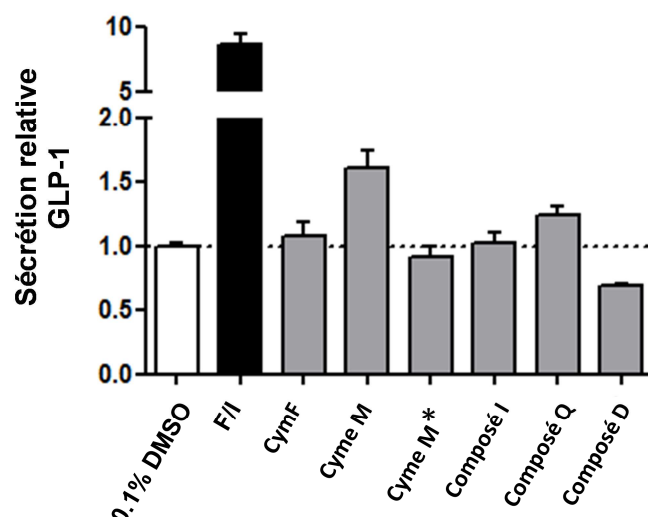


Figure 107 Comparaison de l'activité de la fraction Cyme M avec le mélange reconstitué (Cyme M*) des composés **A-G**. Evaluation de l'activité des composés **D, I** et **Q** ; n=3

6.2.2. Evaluation de l'effet sécrétagogue GLP-1 sur la lignée cellulaire GLUTag

Le dosage du GLP-1 (n=3) suite au traitement de **cellules murines GLUTag** pendant 2 heures a montré l'absence d'activité de l'extrait éthanolique de *C. marnierianum*, la fraction enrichie en prégnanes de *C. menarandrense* ainsi que de tous les prégnanes isolés de *C. menarandrense*.

Cette constatation pourrait s'expliquer par la provenance anatomique de cette lignée cellulaire. Contrairement aux STC-1 et aux cellules primaires provenant de l'intestin grêle, la lignée GLUTag est établie à partir de cellules intestinales du côlon (Lee, Asa, et Drucker 1992). Tandis que la densité des cellules sécrétrices GLP-1 (cellules L) est plus élevée dans cette partie de l'intestin, la physiologie des cellules L n'est pas la même tout au long de l'intestin. Comme cette observation est récente (Brubaker 2012), l'absence d'effet sur les cellules GLUTag suggère que l'extrait de *C. marnierianum* et la fraction enrichie en prégnanes de *C. menarandrense* sont capables de stimuler la sécrétion du GLP-1, mais spécifiquement au niveau des cellules L de l'intestin grêle.

6.3. Evaluation de la cytotoxicité par les réactifs MTT et MTS

En parallèle aux essais de sécrétion du GLP-1 pour le criblage des espèces de la sous-famille des Asclépiadoïdées et des espèces du genre *Cynanchum*, des essais d'évaluation de la viabilité cellulaire ont été réalisés. Ces essais mesurent l'activité mitochondriale des cellules, suite à la transformation sous l'action de la succinate déshydrogénase, du réactif 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (**MTT**) par les cellules en un produit coloré, le formazan. L'activité mitochondriale peut être corrélée à la viabilité cellulaire. Ainsi, le test au réactif MTT permet de vérifier si le traitement engendre, ou pas, un effet cytotoxique.

En se basant sur la mesure de la viabilité cellulaire de l'essai MTT, aucune perturbation de la viabilité cellulaire n'a été observée, même pour les cellules traitées avec 100 µg/ml d'extrait (**Figure 96**, page 102).

Lors des expériences de sécrétion du GLP-1 réalisées en interne, c'est le réactif 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium (**MTS**) qui a été utilisé afin de mesurer la viabilité des cellules traitées par nos différents échantillons. Nous avons constaté que suite à deux heures de traitement des cellules STC-1, la viabilité cellulaire est significativement réduite après contact des cellules par l'extrait EtOH de *C. menarandrense*, le P57 et les composés **O** et **P**. (**Figure 108**)

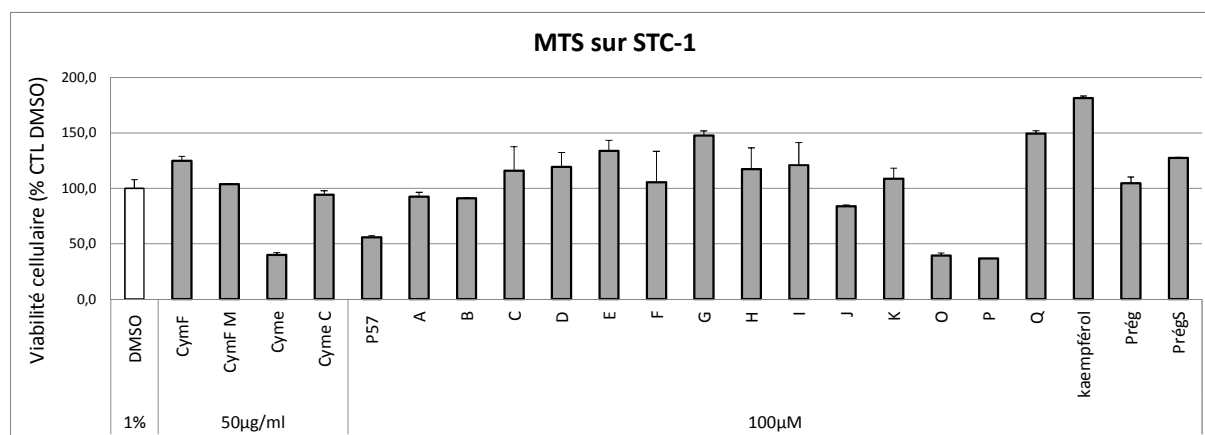


Figure 108 Evaluation de la viabilité cellulaire exprimée en pourcentage sur le témoin négatif (DMSO 1 %) avec le réactif MTS suite au traitement de 2 heures avec les composés isolés **A-Q**, CymF : Extrait EtOH de *C. marnierianum* (lot Cym_Fr_10_12) CymF M : Fraction bioactive de CymF, Prég : Prégnénolone, PrégS : Sulfate de prégnénolone ; n=2.

L'essai de viabilité cellulaire impliquant le réactif MTS est considéré comme étant meilleur car le formazan formé après réduction du MTS est soluble dans le surnageant cellulaire, ce qui évite une manipulation supplémentaire pour sa solubilisation (Wang et al., 1996). Néanmoins, le principe de l'expérience et les limitations restent les mêmes dans le cas de l'utilisation des deux réactifs. L'observation de faux positifs est à signaler, notamment pour le kaempférol qui entraîne une viabilité de 180 % par rapport aux cellules non traitées. Ceci est probablement dû à une stimulation du

métabolisme mitochondrial engendré par ce flavonoïde (da-Silva et al. 2007), qui entraîne des taux de viabilité cellulaire aberrants. Comme lors de l'essai au MTS, des faux positifs ont aussi été observés lors des essais de viabilité avec le réactif MTT avec le kaempférol : certains produits naturels peuvent en effet interférer avec les réactifs MTT ou MTS et ainsi fausser l'évaluation de la viabilité cellulaire avec ces deux réactifs (Bruggisser et al., 2002).

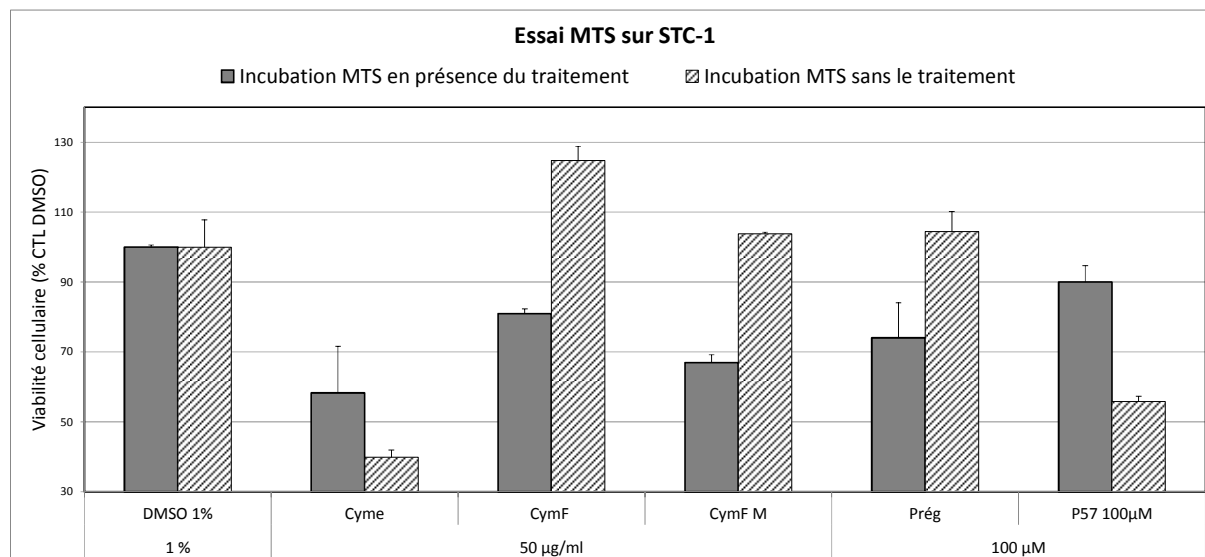


Figure 109 Evaluation de la viabilité cellulaire exprimée en pourcentage sur le témoin négatif (DMSO 1 %) avec le réactif MTS. Le MTS est incubé avec les cellules en présence et en absence du traitement appliqué au préalable ; CymF : Extrait EtOH de *C. marnierianum* (lot Cym_Fr_10_12) CymF M : Fraction bioactive de CymF, Prég : Prégnénolone, PrégS : Sulfate de prégnénolone ; n=2.

Afin de s'affranchir de l'interférence du traitement dans l'évaluation de la viabilité cellulaire avec le réactif MTS, une nouvelle expérimentation a été réalisée : après incubation des cellules STC-1 avec les échantillons pendant 2 heures, le milieu en contact des cellules traitées est aspiré et remplacé par du milieu frais contenant le réactif MTS. La viabilité cellulaire semble encore plus réduite lorsque les cellules sont incubées avec l'extrait Cyme et le P57 tandis que pour les cellules traitées avec l'extrait CymF, la fraction bioactive CymF M et la prégnénolone, la viabilité cellulaire paraît meilleure (**Figure 109**)

6.1. Evaluation de la cytotoxicité par cytométrie

Faute de cohésion dans les résultats des expériences avec le MTT et le MTS, nous avons fait appel à une technique plus récente, celle de la cytométrie par imagerie. Suite au traitement, les images prises de chaque puits permettent l'observation des modifications morphologiques induites par le traitement (**Figure 110**). Pour différencier les cellules mortes des cellules vivantes nous avons ajouté le réactif Hoechst qui se complexe avec le petit sillon de l'**ADN** (fluorescence bleue) et l'iodure de propidium (IP) qui s'intercale avec les **acides nucléiques des cellules mortes** (fluorescence rouge).

L'observation de la forme des cellules traitées (**Figure 110**) révèle **des altérations morphologiques** après traitement avec les composés **O**, **P**, la **berbérine** et le **P57**. Les cellules traitées uniquement avec le véhicule du traitement (DMSO 1 %) ont la forme de cellules adhérentes qui présentent des appendices avec l'aspect de pseudopodes. Alors que les cellules traitées avec les composés **O**, **P** et le **P57**, sont rétrécies et ont une forme presque sphéroïde.

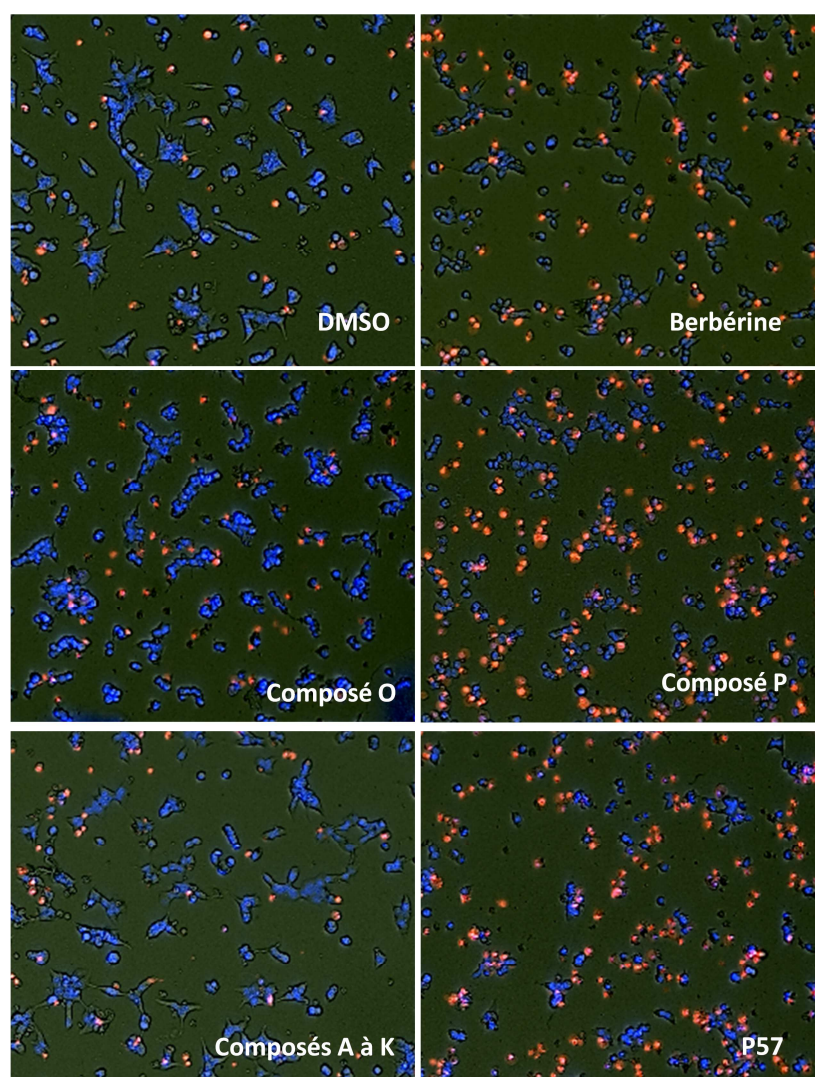


Figure 110 Superposition de photos des cellules STC-1 prises à la lumière visible, en fluorescence bleue et fluorescence rouge suite au traitement de deux heures avec la berbérine à 50 μM , les composés **A-K**, **O** et **P** ainsi que le **P57** à 100 μM .

L'observation par cytométrie des cellules suite au traitement et l'incubation avec les sondes fluorescentes (**Figure 110**) permet de vérifier que les altérations morphologiques observées en contraste de phase sont relatives à une mort cellulaire. La coloration des noyaux (cellules mortes) par l'IP permet de corrélérer leur nombre avec des taux de mortalité cellulaire. Certains noyaux colorés avec l'IP sont observés pour les cellules traitées avec du DMSO à 1 % (contrôle négatif), suggérant une mortalité innée due à l'incubation des cellules dans un puits pendant 24 heures ou une légère toxicité de ce solvant.

- Les cellules traitées avec les composés **A** à **K** présentent la même densité de population de noyaux colorés en rouge que le contrôle négatif. Cette observation indique l'absence de toxicité de ces composés, comme cela a été observé par ailleurs avec l'essai au réactif MTS.
- Le traitement avec le composé **O** présente une densité de noyaux rouges plus élevée que dans le contrôle négatif.
- Cette densité est encore plus élevée dans les puits des cellules traitées avec la berbérine, le P57 et le composé **P**, ce qui dénote d'une certaine cytotoxicité engendrée par ces traitements.

Ces données sous forme d'images digitales sont quantifiées par le logiciel Celigo® et exprimées sous forme de cytogrammes permettant la visualisation de l'augmentation de la population des cellules mortes, après traitement. Cette population est caractérisée par la coloration simultanée par le réactif du Hoechst et l'IP (**Figure 111**). La proportion de cette population cellulaire sur la population cellulaire totale est calculée en pourcentage et présentée à la **Figure 112**.

Cette expérience nous a permis de vérifier la viabilité réduite des cellules STC-1 suite au traitement avec le P57 et le composé **P**.

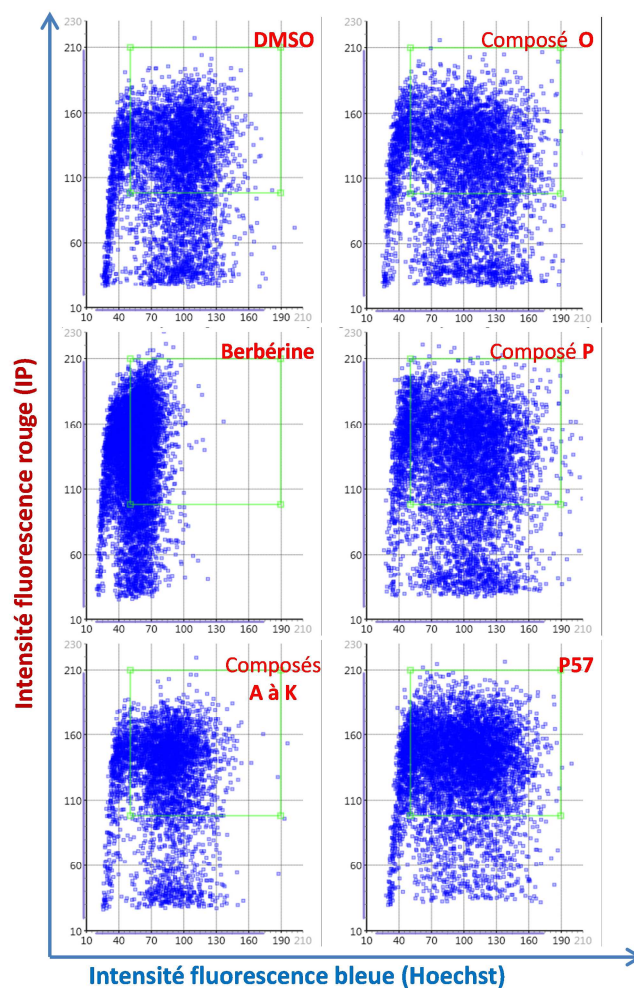


Figure 111 Cytogrammes des populations cellulaires par le logiciel Celigo®. La population des cellules mortes est définie dans le carré vert(en haut à droite de chaque cytogramme)

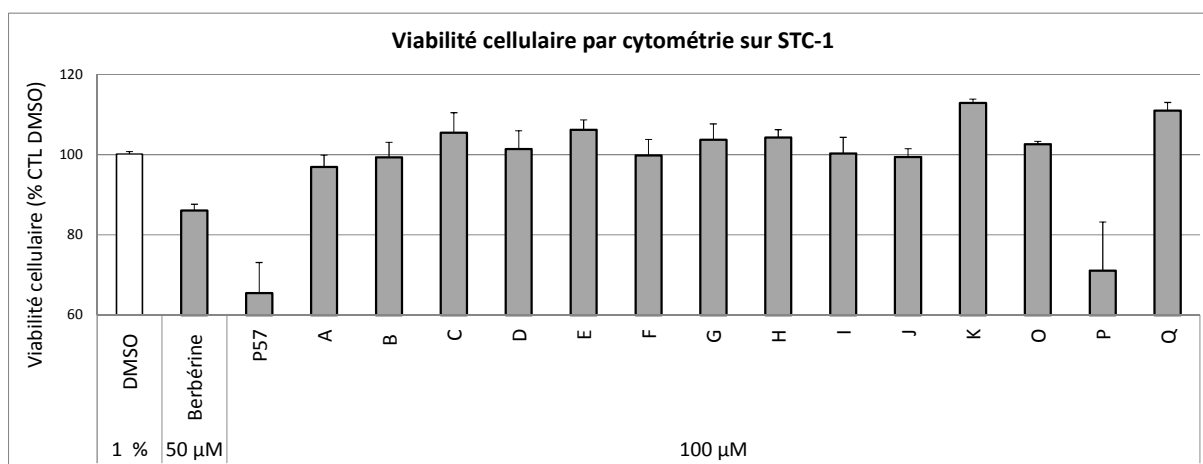


Figure 112 Evaluation par cytométrie de la viabilité cellulaire exprimée en pourcentage sur le témoin négatif (DMSO 1 %), suite au traitement des cellules STC-1 de 2 heures avec les composés isolés à 100 µM, le prégnane P57 à 100 µM et la berbérine à 100 µM ; n=2

Bilan et Perspectives

Hypothèse de départ

Le GLP-1 est un peptide ayant des effets pléiotropes sur la régulation de la glycémie et dont la sécrétion est diminuée chez les patients diabétiques. L'un des thèmes de recherche de l'équipe *Pharmacognosie et molécules naturelles bioactives* (UMR 7200) de Strasbourg est l'identification de produits naturels pouvant augmenter la sécrétion du GLP-1. Le point de référence de ce projet est l'usage traditionnel de *Hoodia gordonii* comme coupe-faim et ses effets hypoglycémiant démontrés *in vivo*. Notre hypothèse de départ a été qu'une augmentation de la sécrétion du GLP-1 est impliquée dans les effets pharmacologiques de *H. gordonii*. D'où la possibilité de retrouver en théorie cet effet stimulateur de la sécrétion du GLP-1 chez des espèces taxonomiquement proches.

C'est au cours de ce travail que des chercheurs ont démontré que **l'extrait de *H. gordonii* possède bien des propriétés sécrétagogues GLP-1** (Zhang et al., 2014), apportant ainsi une réponse à la question posée au démarrage de ce projet de recherche. L'effet sécrétagogue GLP-1 de l'extrait de *H. gordonii* peut justifier ses propriétés pharmacologiques car le GLP-1 est à l'origine d'effets anorexigènes et hypoglycémiant. Deux molécules présentes dans cet extrait, le P57 et le gordonoside F, sont considérées comme responsables de l'activité GLP-1 sécrétagogue de *H. gordonii*. Malgré l'absence de consensus scientifique sur l'attribution de cet effet biologique à ces deux constituants, il est à remarquer que tous deux portent le même **aglycone d'un prégnane poly-hydroxylé** estérifié avec un acide tiglique en position 12.

Bien que l'implication du GLP-1 dans les effets pharmacologiques de *H. gordonii* ait été publiée, nous avons également souhaité valider notre hypothèse de départ par un criblage *in vitro* de différentes espèces de la sous-famille des Asclépiadacées. En effet, **des extraits préparés à partir d'espèces phylogénétiquement proches de *H. gordonii* se sont avérés actifs** dans nos conditions expérimentales car capables de stimuler la sécrétion du GLP-1 d'environ 250 % par rapport au témoin négatif. Plus précisément, ce sont des représentants du genre ***Cynanchum*, endémiques du Madagascar**, qui présentent cet effet sécrétagogue GLP-1. Ce constat a été validé par l'observation d'une réponse dose-dépendante suite au traitement de cellules neuroendocrines (lignée STC-1) avec les extraits de ces espèces malgaches. En tenant compte des résultats de l'activité biologique et de la disponibilité du matériel végétal, *Cynanchum marnierianum* Rauh et *Cynanchum menarandrense* Jum. & Perrier ont été les deux espèces retenues pour leur analyse phytochimique approfondie. L'investigation phyto-pharmacologique de ces deux espèces de *Cynanchum* **a été réalisée ici pour la première fois**. Par ailleurs, l'extrait de *C. descoingsii* Rauh étant parmi les plus bioactifs lors du criblage, il a également été retenu pour des analyses par HPLC-UV et HPLC-HRMS afin de comparer les profils phytochimiques de ces 3 espèces.

Etude de *Cynanchum marnierianum*

L'isolement bio-guidé de l'extrait éthanolique de *C. marnierianum* issu de culture en serre en France, nous a conduit à l'isolement d'un glycoside de nature prégnanique, identifié comme un **nouveau produit naturel, le marnieranoside A**. Ce nouveau métabolite a été isolé par CPC, une technique appliquée pour la première fois dans l'isolement de ce type de composés. La mise au point d'un système biphasique dans lequel les glycosides prégnaniques se partagent afin qu'ils soient séparés dans la colonne CPC a permis l'isolement du marnieranoside A en trois étapes (partage liquide-liquide, SPE, CPC) sans recours à de techniques plus classiques comme la HPLC-semi-préparative susceptible d'entraîner des pertes importantes.

Un autre extrait éthanolique de *C. marnierianum* issu d'un arboretum malgache a été partagé entre une phase aqueuse et une phase AcOEt, laquelle a permis un enrichissement en prégnanes. Un autre glycoside de prégnane a été isolé, le **marnieranoside B**, identifié également pour la première fois.

Il est important de souligner que ces deux nouveaux composés présentent des analogies structurales avec les prégnanes considérés comme responsables de l'activité anorexigènes et hypoglycémiantes de *H. gordonii*. Les points communs entre les prégnanes de *H. gordonii* et ceux de *C. marnierianum* consistent en un châssis moléculaire de prégnane poly-hydroxylé dont la position 12 est acylée. Le noyau prégnane porte une insaturation du noyau B et une chaîne composée de 2,6-didésoxy-hexoses fixée en position 3. Contrairement aux prégnanes de *H. gordonii* qui portent la double liaison entre les positions 5 et 6, les marnieranosides portent la double liaison entre les positions 6 et 7.

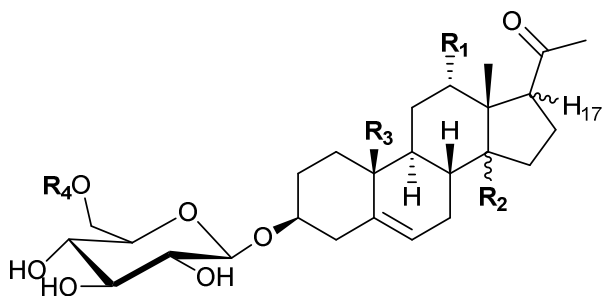
C'est la **première fois que des $\Delta^{6,7}$ prégnènes sont isolés d'un *Cynanchum***. La description d'un $\Delta^{6,7}$ prégnène présent chez une autre espèce de la sous-famille des Asclépiadacées, *Caralluma quadrangula* (Forssk.) N.E.Br., a été publiée (Abdallah et al., 2013). Notons là encore une convergence intéressante car, comme plusieurs représentants du genre *Caralluma*, cette espèce est utilisée en Arabie et en Inde pour ses effets anorexigènes et hypoglycémiantes (Dutt et al., 2012), au même titre que *H. gordonii* en Afrique subsaharienne.

Etude de *Cynanchum menarandrense*

En raison de la présence de prégnanes dans les fractions bioactives de *C. marnierianum*, le fractionnement de l'extrait de la deuxième espèce retenue, *C. menarandrense*, a été orienté vers cette même classe de constituants. Une fraction enrichie en prégnanes par extraction liquide/liquide à l'AcOEt a été analysée par HPLC-HRMS pour repérer les constituants d'intérêt. Leur purification au moyen de diverses techniques chromatographiques, principalement par HPLC semi-préparative, nous a permis d'isoler 8 prégnanes (**Tableau 16**) dont 5 se sont avérés être des **nouveaux produits naturels, les ménarandrosides (I à V)**. Deux autres prégnanes, les carumbellosides I et II, ont également été identifiés dans *C. menarandrense*. Notons que la présence de ces derniers a déjà été signalée dans *Caralluma umbellata* Haw, une Asclépiadacée également connue pour ses propriétés antidiabétiques. (Bellamakondi et al., 2014)

Tous les prégnanes isolés de *C. menarandrense* sont des glucosides possédant comme châssis moléculaire celui de la prégnénolone. Contrairement aux prégnanes isolés de *C. marnierianum*, ceux de *C. menarandrense* sont moins hydroxylés, l'insaturation est située entre les positions 5 et 6, ils ne portent pas de chaîne latérale estérifiée à la position 12, et la position 20 porte un groupement cétone au lieu d'un alcool. En ce qui concerne leur partie osidique, elle est plus simple car composée d'un ou deux β -D-glucoses.

Tableau 16 Tableau récapitulatif des prégnanes isolés de *Cynanchum menarandrense*.



Composé	R ₁	R ₂	R ₃	H-17	R ₄
Menarandroside I	OH	α H	CH ₃	α	H
Menarandroside II	OH	α H	CH ₃	α	β -D-glc
Menarandroside III	OH	β OH	CH ₃	α	H
Menarandroside IV	OH	β OH	CH ₃	α	β -D-glc
Menarandroside V	H	β OH	CH ₂ OH	β	β -D-glc
Carumbelloside I	H	β OH	CH ₃	α	β -D-glc
Carumbelloside II	H	β OH	CH ₃	α	H
Prégnénolone-3-O-gentiobioside	H	α H	CH ₃	α	β -D-glc

L'analyse par HPLC-DAD d'un extrait de *C. descoingsii* révèle des composés au même temps de rétention et de même spectre UV que certains prégnanes isolés de *C. menarandrense*. Cette observation est confirmée par l'analyse HPLC-HRMS qui révèle des formules brutes identiques entre les deux espèces. La **présence commune des mêmes prégnanes au sein des extraits de *Cynanchum* les plus bioactifs** valide notre stratégie de fractionnement de l'extrait éthanolique de *C. menarandrense* orientée par la phytochimie. Cette observation, malgré l'absence de confirmation des l'activité *in vitro* des ces composés, peut être considérée comme une confirmation que les prégnanes seraient responsables pour la stimulation de la sécrétion du GLP-1.

La mise en évidence de **glucosides de $\Delta^{5,6}$ prénènes** à la fois dans *C. descoingsii* et *C. menarandrense*, permet de poser l'hypothèse de leur rôle en qualité de **traceurs taxonomiques** potentiels dans certains *Cynanchum* aphylls malgaches.

Cette hypothèse pourrait être vérifiée en complétant l'exploration phytochimique d'autres espèces de *Cynanchum*, comme

- *C. crassipedicellatum*, une espèce taxonomiquement proche de *C. descoingsii*
- *C. macrolobum* et *C. rauhianum*, deux espèces morphologiquement proches de *C. menarandrense* (Albers et Meve, 2004).

Les métabolites ubiquitaires isolés également au cours de cette étude appartiennent à d'autres classes de molécules (flavonoïdes et triterpènes). Certains d'entre eux possèdent des **propriétés hypoglycémiantes décrites dans la littérature**, sans implication démontrée avec une sécrétion GLP-1. Citons par l'exemple du kaempférol-3-*O*-néohéspéridoside ayant un caractère insulino-mimétique. (Yamasaki et al., 2011) Des propriétés anti-inflammatoires sont également attribuées à la plupart de ces métabolites. Ainsi, la combinaison d'effets pharmacologiques dans une même espèce, une fois confirmés sur des modèles *in vivo*, validerait l'usage de produits de phytothérapie dans la prise en charge de maladies métaboliques caractérisées à la fois par une hyperglycémie et un état inflammatoire chronique.

Optimisations du protocole de criblage impliquant les cellules STC-1

Afin de minimiser l'influence des conditions expérimentales, des paramètres pouvant influencer la réponse cellulaire ont été étudiés sur la lignée cellulaire STC-1. Dans la mesure où la sécrétion du GLP-1 a lieu suite au contact des cellules intestinales L avec les nutriments, nous avons évalué l'effet de la présence du sérum bovin fœtal (FBS) dans le milieu des cellules STC-1 avant qu'elles ne soient soumises à des essais de sécrétion du GLP-1. **La privation des cellules du FBS n'ayant pas d'impact dans la sécrétion du GLP-1**, sa présence dans le milieu a été maintenue. Une étude de cinétique de sécrétion nous a permis de déterminer qu'une **sécrétion maximale de GLP-1 est observable entre 0,5 à 3 heures après traitement**. Enfin, pour garantir un stade de différenciation cellulaire durant lequel les cellules sécrètent du GLP-1 en réponse aux stimuli dans le milieu, les cellules ont été utilisées entre le 6^{ième} et le 17^{ième} passage, et **à confluence**.

Evaluation de l'effet sécrétagogue sur les cellules STC-1

A l'aide du protocole optimisé utilisant la lignée STC-1, les composés isolés ont été évalués pour leur capacité de stimuler la sécrétion du GLP-1. Dans nos conditions expérimentales, les prénanes de *C. menarandrense* ne présentent pas d'effet sécrétagogue GLP-1, contrairement aux prénanes de *C. marnierianum* qui stimulent la sécrétion du GLP-1 de 130 % par rapport au témoin négatif. Il est à noter que **dans les mêmes conditions expérimentales, le prénane considéré comme le principe actif de *H. gordonii*, le P57, est aussi actif que les marnieranosides A et B.**

Des analogies structurales entre les prégnanes bioactifs (composés **O** et **P** isolés de *C. marnierianum* et P57 décrit comme le principe actif de *Hoodia gordonii*) ainsi que leurs différences d'avec les prégnanes inactifs, nous permettent de poser des hypothèses sur les caractéristiques structurales potentiellement responsables de l'effet sécrétagogue GLP-1 (

Figure 113). Celles-ci devront être confirmées par des analyses de relations de structure-activité plus complètes.

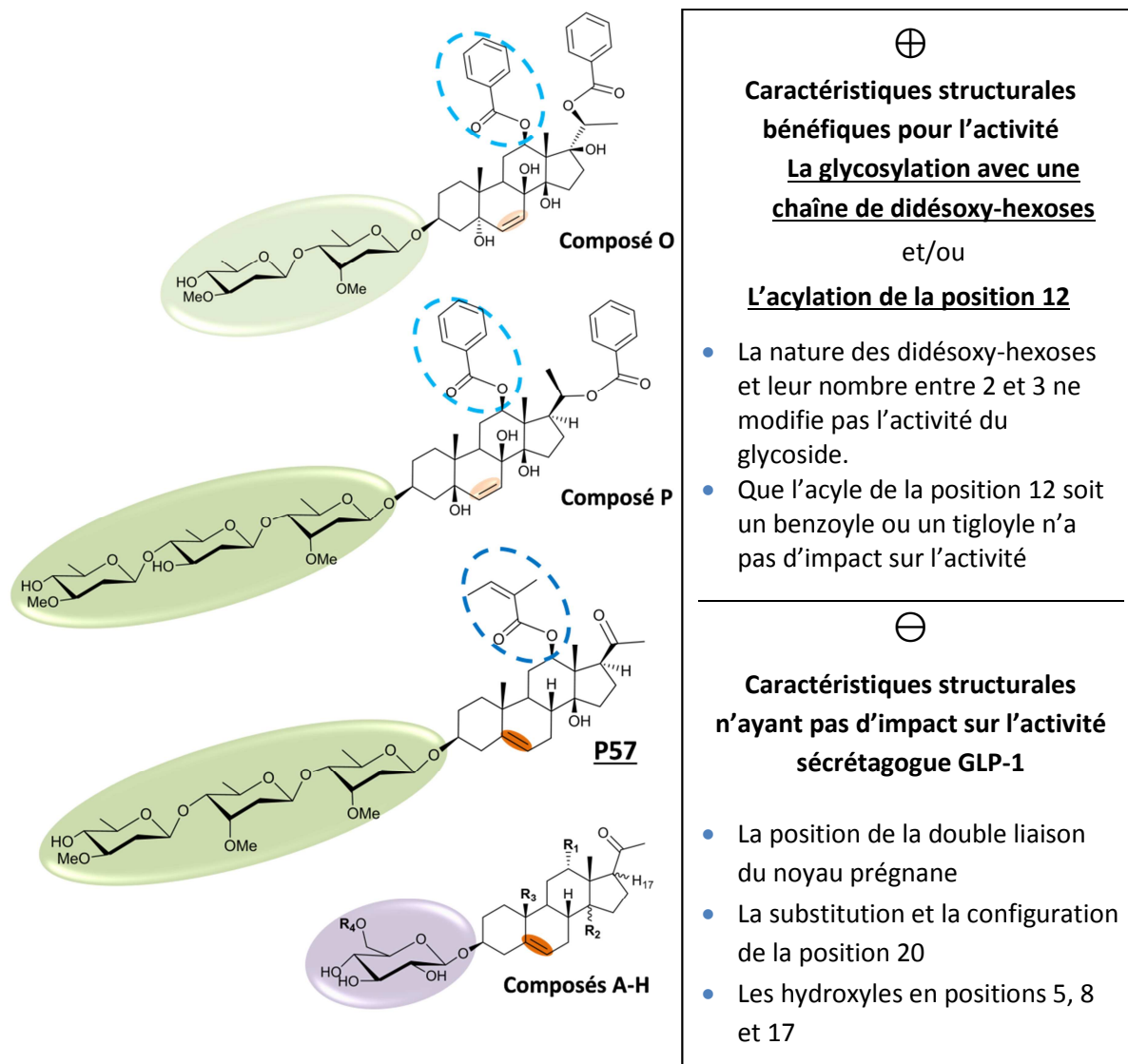


Figure 113 Comparaison structurale des prégnanes actifs (composés O, P et P57) avec les prégnanes inactifs (composés A-H) dans nos conditions expérimentales

Effet sécrétagogue GLP-1 sur des cellules intestinales primaires murines

La fraction enrichie en prégnanes de *C. menarandrense* exerce bien une activité sécrétagogue GLP-1 dans le modèle utilisant des cellules intestinales primaires murines. Cependant, les prégnanes purifiés ne s'avèrent pas actifs sur ce modèle cellulaire. La reconstitution de la fraction enrichie en prégnanes par ses principaux composants ne permet pas de retrouver l'activité. Il est fort probable que la purification des prégnanes ayant entraîné une perte d'activité soit liée à un phénomène de synergie : synergie entre les prégnanes et d'autres composés aussi présents dans la fraction enrichie, comme les flavonoïdes. Dans ce modèle cellulaire et aux doses testées, les marnieranosides ne présentent pas d'effet sécrétagogues GLP-1.

Néanmoins, suite à la lyse des cellules induite par certains prégnanes on observe une légère **augmentation du GLP-1 intracellulaire**. Des expériences supplémentaires (comme des essais post-traductionnels du proglucagon) sont nécessaires afin de confirmer si les prégnanes isolés de *C. menarandrense* peuvent stimuler la biosynthèse du GLP-1 et par conséquent l'augmentation de sa concentration intracellulaire. Un mécanisme qui a été décrit notamment pour les ginsénosides (saponosides triterpéniques du Ginseng), la berbérine (alcaloïde tétracyclique quaternaire présent dans de nombreuses Berberidacées) et le resvératrol (stilbénoloïde, une phytoalexine du raisin) (voir 1.5, page 25)

Les expériences dans le même modèle *in vitro*, ont montré une augmentation de l'effet sécrétagogue de l'extrait de *C. marnierianum* quand le tampon utilisé contient du glucose, ce qui indique soit un effet additif soit une synergie entre l'extrait et le glucose. Ce doute pourra être clarifié suite à l'élucidation du mécanisme pharmacologique avec lequel l'extrait stimule la sécrétion du GLP-1.

Effet sécrétagogue GLP-1 sur les cellules GLUTag

Dans les essais de sécrétion du GLP-1 avec la lignée cellulaire GLUTag, aucun traitement n'a eu d'effet stimulateur de sécrétion du GLP-1 sur ce modèle, dans les conditions expérimentales appliquées, ni l'extrait de *C. marnierianum* ni la fraction enrichie en prégnanes de *C. menarandrense*. Ces résultats suggèrent une certaine spécificité d'activité des échantillons testés pour les cellules L de l'intestin grêle

L'évaluation de l'effet sécrétagogue *in vivo* pourrait nous affranchir des variations de réponse en fonction de la provenance des cellules L. De plus, un modèle *in vivo* permettrait d'évaluer l'effet de l'extrait sur le système intestinal dans sa globalité (cellules L de l'intestin grêle et le gros intestin) en ce qui concerne la sécrétion du GLP-1. Une expérimentation chez l'animal permettrait également d'apprécier l'impact réel de nos extraits sur la glycémie.

Evaluation de la cytotoxicité des composés isolés sur les cellules STC-1

Dans la littérature concernant les sécrétagogues GLP-1 naturels, plusieurs protocoles d'évaluation de cet effet biologique sont décrits. **Seule une équipe de chercheurs a montré l'absence d'effet toxique des échantillons testés** (extraits d'algues), lesquels ont par la suite été évalués pour leur effet sécrétagogue GLP-1 (Chin et al., 2014). Dans le cadre de notre propre étude, il a été constaté que des sécrétagogues naturels GLP-1 cités dans la littérature s'avèrent toxiques aux concentrations publiées (acide chlorogénique 40mM, berbérine 100 µM). Cette observation nous a incités à réaliser des essais de cytotoxicité sur nos composés purifiés.

L'évaluation de la viabilité cellulaire en mesurant l'activité mitochondriale avec les réactifs MTT et MTS confirme les risques de faux positifs (viabilité cellulaire surestimée) décrits dans la littérature. L'essai au réactif MTT n'a pas montré de signes d'une éventuelle cytotoxicité pour les extraits bruts de *Cynanchum*. Au contraire, avec l'essai au réactif MTS, une cytotoxicité a été observée suite au traitement des cellules avec l'extrait de *C. menarandrense* à 50 mg/ml. L'usage du réactif MTS indique également une **viabilité cellulaire réduite suite au traitement des cellules avec les marnieranosides et le prégnane de *H. gordonii* P57**. Pour confirmer ou infirmer cette observation, nous avons fait appel à une technique de cytométrie suite au traitement des cellules en présence de sondes fluorescentes marquant les acides nucléiques (réactif Hoerchst) et l'ADN des cellules mortes (Iodure de propidium). Des changements morphologiques des cellules traitées avec les marnieranosides et le P57 ont été constatés. Les calculs basés sur l'intensité de la fluorescence confirment une **viabilité cellulaire réduite** dans les puits traités au marnieranoside B et le P57 mais pas pour le marnieranoside A, testés aux mêmes concentrations. Par la suite, en utilisant d'autres sondes fluorescentes comme l'annexine V, nous pourrions déterminer si la réduction de la viabilité cellulaire est due à des phénomènes de nécrose ou d'apoptose. L'étude du mécanisme de toxicité est en effet indispensable afin d'exclure le scénario où les marnieranosides et le P57 augmenteraient la concentration du GLP-1 dans le surnageant des puits par diffusion passive du peptide dans le milieu suite à la perturbation de l'intégrité cellulaire, comme il a été observé suite à l'incubation des cellules STC-1 avec un détergent (Triton-X).

Bien que les marnieranosides et le P57 soient des hétérosides de type saponosides, donc susceptibles de provoquer une hémolyse en raison de propriétés tensioactives (Hostettmann et Marston, 1995), leur caractère amphiphile est ici atténué :

- d'une part, la partie aglycone (noyaux prégnéniques polyhydroxylés) s'avère plus polaire que les aglycones classiques des saponosides (stéroïdes ou triterpènes)
- d'autre part, leur partie osidique (2,6-didésoxy-hexoses) semble légèrement plus lipophile que celles de la plupart des saponosides dont la chaîne osidique comporte des sucres ubiquitaires.

Des essais d'hémolyse devraient permettre d'étudier une possible perturbation de l'intégrité cellulaire induite par nos composés purifiés.

Il faut cependant noter qu'il est très classique que, sur des modèles cellulaires, les constituants isolés à partir d'une fraction bioactive (non cytotoxique) présentent une certaine toxicité une fois purifiés.

L'annulation d'effet toxique dans un extrait végétal de composition complexe est souvent observée, et justifie l'emploi en phytothérapie d'extraits plutôt que de leurs principes actifs purifiés.

Sourcing alternatif

Afin d'approfondir l'étude pharmacologique *in vitro* voire *in vivo*, l'approvisionnement en matériel végétal en quantité adaptée devra être résolue. En raison du caractère endémique des *Cynanchum* étudiés, provenant du Sud-Ouest du Madagascar, d'autres sources alternatives pour accéder à une biomasse suffisante devront être identifiées.

Deux pistes de **sources alternatives** peuvent être déjà évoquées : **l'hémi-synthèse et les biotechnologies**.

- D'après l'analyse des données bibliographiques, l'aglycone de base des prégnanes isolés des *Cynanchum* malgaches est également biosynthétisé dans la grande digitale (*Digitalis purpurea* L., Plantaginaceae), qui pousse en Europe continentale et est très répandue notamment dans les Vosges. Il serait donc envisageable d'obtenir les génines d'intérêt (Digipurpurogénine I et II) puis, par hémi-synthèse, de produire des analogues des pregnanes bioactifs.
- Le recours à la biotechnologie végétale avec l'application de la culture *in vitro* de cellules végétales, peut être également envisagé. En effet, des cellules de plusieurs espèces de la sous-famille des Asclépiadacées ont déjà été mises en culture *in vitro* avec succès (Rathore et al., 2013). Par ailleurs, l'obtention de cellules indifférenciées provenant d'espèces du genre *Caralluma* caractérisé pour ses propriétés anorexigènes et hypoglycémiantes, ont déjà fait l'objet de résultats publiés (Patel et al., 2014). L'exemple de mise en culture *in vitro* de l'espèce *Gymnema sylvestre* est également positif : les cellules végétales dédifférenciées (cals) ont exercé les mêmes effets antidiabétiques que l'extrait méthanolique des feuilles de la plante (Ahmed et al., 2010). En nous basant sur l'exemple de *Gymnema sylvestre*, il s'agira de vérifier si les métabolites d'intérêt sont bien sécrétés dans des cultures *in vitro* de *Cynanchum* sp.. Des essais préliminaires encourageants nous ont déjà permis d'obtenir des cals de *C. marnierianum* et *C. descoingsii*. Des optimisations des conditions de culture ou l'application de techniques d'élicitation pourront également être envisagées afin d'augmenter le rendement de production des métabolites d'intérêt.

Matériels et méthodes

7. Matériel végétal et extraction

Pour la **préparation des extraits éthanoliques**, le matériel végétal est extrait quatre fois à température ambiante avec de l'éthanol absolu (20 ml d'EtOH par gr de poudre végétale). Les trois premiers cycles durent 10 min chacun et se font par sonication. Le dernier cycle d'extraction est réalisé par macération du matériel végétal dans l'éthanol pendant 24 h.

7.1. *Cynanchum marnierianum* Rauh

Le lot **Cym_Fr_10_12** de *C. marnierianum* a été récolté à la ferme aux Cactus à Tieste-Uragnoux dans le Gers, France. Quatre plantes en floraison ont été reçues en octobre 2012. Les parties souterraines et les fleurs sont séparées des tiges. 206,41 g de parties aériennes coupées en tronçons ont été lyophilisées pour donner 88,62 g de matière végétale sèche qui a été par la suite extraite en donnant 13,65 g d'extrait éthanolique sec (15,4 %).

Le lot **Cym_Ma_09_12** de *C. marnierianum* a été récolté à l'arboretum d'Antsokay à Tuléar dans le sud de Madagascar en septembre 2012. Des parties aériennes (sans floraison) ont été expédiées dans un récipient contenant de l'éthanol qui a été gardé pour être réuni avec l'extrait éthanolique final. Les tiges découpées en tronçons ont été broyées et extraites, donnant 10,18 g d'extrait éthanolique sec.

7.2. *Cynanchum menarandrense* Jum. & Perrier

Le lot **Cyme_05_12** de *C. menarandrense* a été récolté à l'arboretum d'Antsokay à Madagascar en mai 2012, et a servi pour le criblage initial.

Le lot **Cyme_09_12**, qui a servi pour les analyses phytochimiques, a été récolté dans le même biotope en septembre 2012. Les parties aériennes (non en floraison) ont été expédiées dans un récipient contenant de l'éthanol qui a été transvasé et gardé pour être réuni avec l'extrait éthanolique final. Les parties aériennes découpées en tronçons ont été broyées et extraites pour donner 4,94 g d'extrait éthanolique sec. Par la suite, cet extrait a été suspendu dans 250 ml d'eau et extrait quatre fois avec 250 ml d'AcOEt pour donner 3,15 g de fraction AcOEt (63,7 %) et 1,79 g de fraction aqueuse résiduelle (36,3 %).

7.3. *Cynanchum descoingsii* Rauh

Les parties aériennes de *C. descoingsii* Rauh ont été récoltées au jardin exotique de Monaco en août 2011 et ont servi pour le premier criblage.

13,77 g d'un deuxième lot de tiges récoltées dans le même biotope en mars 2012, ont été découpées, séchées et extraites à l'EtOH afin de donner 583,5 mg d'extrait sec.

8. Isolement des Composés A à Q

8.1. Fractionnement de l'extrait de *Cynanchum marnierianum*

8.1.1. Isolement du marnieranoside A

Partage liquide-liquide de l'extrait éthanolique

13,10 g de l'extrait éthanolique de *C. marnierianum* (lot Cym_Fr_10_12) sont suspendus dans 300 ml d'eau puis extraits avec 300 ml de cyclohexane. La phase organique est lavée trois fois avec 250 ml d'eau pour donner 4,65 g de fraction cyclohexanique sèche (35,5 %). Une fraction insoluble entre les deux phases est collectée à part (0,35 g, 2,7 %) et la phase aqueuse est évaporée à sec pour donner 8,1 g de fraction aqueuse (61,8 %).

Fractionnement de la phase cyclohexanique sur SPE

La phase organique obtenue suite au partage liquide-liquide (eau : cyclohexane) de l'extrait éthanolique de *C. marnierianum* (lot Cym_Fr_10_12) est fractionnée sur une cartouche SPE de 50 g de silice (Chromabond). 4432,6 mg d'échantillon, solubilisés dans du cyclohexane, sont chargés sur la cartouche et élués avec des mélanges de cyclohexane, éther diéthylique, acétate d'éthyle et méthanol afin d'obtenir 15 fractions de 200 ml, les fractions A à O (**Tableau 17**).

Tableau 17 Eluants utilisés pour le fractionnement par SPE des phases cHex de *C. marnierianum* (lot Cym_Fr_10_12)

Fract.	Eluant	masse	Fract.	Eluant	masse
A	cHex 100 %	112,5 mg	I	cHex: Et ₂ O (70: 30)	122,5 mg
B	cHex: Et ₂ O (99: 1)	95,1 mg	J	cHex: Et ₂ O (50: 50)	151,4 mg
C	cHex: Et ₂ O (98: 2)	1138,6 mg	K	Et ₂ O 100 %	210,6 mg
D	cHex: Et ₂ O (97: 3)	87,4 mg	L	Et ₂ O: AcOEt (50 : 50)	97,6 mg
E	cHex: Et ₂ O (95: 5)	163,8 mg	M	AcOEt 100%	162,2 mg
F	cHex: Et ₂ O (92: 8)	342,9 mg	N	AcOEt: MeOH (5: 5)	357,5 mg
G	cHex: Et ₂ O (85: 15)	309,5 mg	O	MeOH 100%	11,8 mg
H	cHex: Et ₂ O (80: 20)	173,5 mg			

Isolement du marnieranoside A par CPC

Les fractionnements par CPC sont effectués avec un système spot Prep II 250 sur une colonne SCPC-250 (Armen) avec une capacité de 250 ml équipée avec un système de pompe-détecteur-collecteur automatique Spot Prep II (Armen). Le débit de la phase mobile lors des analyses est de 4 ml/min. L'analyse CPC de la fraction M est réalisée à 2000 rpm. Le système quaternaire cHex : AcOEt : MeOH : H₂O (6 : 5 : 6 : 5 ; v/v) est utilisé pour ce fractionnement par CPC. Ainsi, la phase supérieure est chargée dans le rotor CPC comme phase stationnaire et la phase inférieure sert de phase mobile. L'échantillon solubilisé dans un mélange de la phase stationnaire et mobile est injecté via une boucle d'injection de 10 ml.

Les fractions sont collectées par le collecteur automatique et rassemblées suite à des analyses CCM et HPLC-UV. Lors d'une analyse de 150 minutes, 48 fractions sont collectées. 16 fractions

supplémentaires sont également collectées pendant l'extrusion de la phase stationnaire. La 32^{ème} fraction éluée à 70 minutes contient le marnieranoside A.

8.1.2. Isolement des composés triterpéniques L, M et N

594,5 mg de la fraction majoritaire C (issue de la SPE de la fraction cyclohexanique, **Tableau 17**) sont fractionnés de plus sur une cartouche SPE de 500 mg de silice C18 (Chromabond) éluée avec des mélanges de EtOH-H₂O de polarité croissante afin d'obtenir 4 fractions finales, les fractions CA, CB, CC et CD.

La séparation de la fraction CB (166,6 mg) est effectuée sur une colonne ouverte (h = 20 cm, d = 2,4 cm) remplie avec du gel de silice 60 (0.0630-0.0200 mm, Merck). L'élution est réalisée en mode isocratique avec un mélange de cHex -EtOAc (98:2 v/v). L'échantillon est introduit sous forme liquide, solubilisé dans 2 ml de cyclohexane. Le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions sont effectués sur la base d'analyses par CCM. La 24^{ème} fraction (2,4 mg) est identifiée comme étant le composé **N**, l'acétate d' α -amyrine.

La fraction CC fait l'objet d'un fractionnement par CPC sur le système système spot Prep II 250 avec une colonne SCPC-250 (Armen) avec une capacité de 250 ml équipée avec un système de pompe-détecteur-collecteur automatique Spot Prep II (Armen). Le système biphasique utilisé est Heptane : ACN : MeOH (5 : 5 : 3 ; v/v). La phase supérieure est utilisée comme phase stationnaire et la phase inférieure est poussée avec un débit de 5 ml/min. Les rotations du rotor sont réglées à 1100 rpm. Dans ces conditions au bout de 45 min d'élution, le composé majoritaire de cette fraction est purifié (composé **M**, acétate de lupéol, 7,4 mg).

En utilisant le même système CPC, la fraction CymF F (voir **Tableau 17**) est fractionnée. Le système biphasique Heptane : ACN : MeOH (5 : 5 : 3 ; v/v) est utilisé aussi. La phase supérieure est utilisée comme phase stationnaire à 1200 rpm et la phase inférieure est poussée avec un débit de 6 ml/min en conduisant à l'isolement du composé **L** (26,6 mg), le lupéol.

8.1.3. Isolement du composé Q

La séparation des composés de l'émulsion d'interphase de l'extraction liquide/liquide du lot lot Cym_Fr_10_12 est réalisée sur une colonne ouverte (h = 64 cm, d = 1,2 cm) remplie avec du gel de Sephadex® LH-20 (G.E. Healthcare). L'échantillon est introduit après dissolution totale dans un minimum de MeOH, puis élué avec du MeOH en collectant des fractions de 2 ml. Le suivi de la séparation et le rassemblement des fractions sont effectués sur la base d'analyses par CCM et HPLC-UV. Suite au regroupement des fractions dont le profil chromatographique est similaire, 5 fractions sont obtenues. La purification de la dernière fraction sur une cartouche SPE C18 (100 mg, Chromabond) avec des mélanges H₂O: MeOH de polarité décroissante a fourni le composé **Q** (2,4 mg) élué avec 60 % MeOH.

8.1.1. Isolement du composé P

L'extrait éthanolique de Cym_Ma_09_12 est suspendu dans 300 ml d'eau et extrait quatre fois avec 300 ml d'AcOEt pour donner 5,49 g de fraction AcOEt (53,9 %) et 4,69 g de fraction aqueuse résiduelle (46,1 %). La fraction AcOEt obtenue suite au partage liquide-liquide de l'extrait éthanolique est fractionnée sur une cartouche SPE (50 g de silice, Chromabond) avec les systèmes d'élution présentés dans le **Tableau 18**.

Tableau 18 Eluants utilisés pour le fractionnement par SPE en phase normale des phases AcOEt de *C. marnierianum* (lot Cym_Ma_09_12)

Fraction	éluants	Fraction	éluants
A	cHex 100 %	I	AcOEt 100%
B	cHex: Et ₂ O (8: 2)	J	AcOEt: MeOH (8: 2)
C	cHex: Et ₂ O (7: 3)	K	AcOEt: MeOH (7: 3)-A
D	cHex: Et ₂ O (5: 5)	L	AcOEt: MeOH (7: 3)-B
E	Et ₂ O 100 %	M	AcOEt: MeOH (7: 3)-C
F	Et ₂ O: AcOEt (7: 3)	N	AcOEt: MeOH (5: 5)
G	Et ₂ O: AcOEt (5: 5)	O	AcOEt: MeOH (3: 7)
H	Et ₂ O: AcOEt (2: 8)	P	AcOEt: MeOH (1: 9)
		Q	MeOH 100%

La fraction I (114,7 mg) est fractionnée de plus par chromatographie liquide sur colonne ouverte pompe à vide ($h = d = 6$ cm) remplie avec du gel de silice 60 (0.015-0.0400 mm, Merck). Les fractions ont été éluées avec des mélanges de CHCl₃- MeOH de polarité croissante et collectées dans une fiole à vide. Le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions sont effectués sur la base d'analyses par CCM et HPLC-UV. La fraction éluée avec CHCl₃- MeOH (15 : 1, V/V ; 10,3 mg) est fractionnée par HPLC pour fournir le marnieranoside B.

L'isolement du marnieranoside B est réalisé sur le module HPLC analytique Varian LC-920 équipé d'une colonne Sunfire C18 (3,5 μ m, 150 x 4,6 mm i.d., Waters). 20 μ l (86 mg/ml) de l'échantillon à fractionner sont injectés par le module d'injection automatique du système LC-920. La colonne est thermostatée à 40°C. La phase mobile consiste en eau et ACN contenant 0,05% d'acide formique. L'élution se réalise en suivant le gradient 60 à 70 % ACN en 10 minutes, 70 à 100 % en 3 minutes puis 2 minutes à 100 % ACN à un débit de la phase mobile de 1 ml/min. La séparation est suivie par le détecteur UV/Vis du système LC-920 à 201 nm et les pics d'intérêt sont collectés manuellement.

8.2. Fractionnement de l'extrait de *Cynanchum menarandrense* (lot Cyme_09_12)

L'extrait éthanolique de *C. menarandrense* est suspendu dans 250 ml d'eau et extrait quatre fois avec 250 ml d'AcOEt pour donner 3,15 g de fraction AcOEt (63,7 %) et 1,79 g de fraction aqueuse résiduelle (36,3 %).

8.2.1. Isolement des prégnanes mono-glucosylés et des flavonoïdes

La fraction AcOEt obtenue suite au partage liquide-liquide de l'extrait éthanolique est fractionnée sur une cartouche SPE (50 g de silice, Chromabond) avec les systèmes d'élution présentés dans le **Tableau 19**.

Tableau 19 Eluants de la fractionnement par SPE en phase normale des phases AcOEt de *C. menarandrense*.

Fraction	éluants	Fraction	éluants
A	cHex 100 %	I	AcOEt 100%
B	cHex: Et ₂ O (8: 2)	J	AcOEt: MeOH (8: 2)
C	cHex: Et ₂ O (7: 3)	K	AcOEt: MeOH (7: 3)-A
D	cHex: Et ₂ O (5: 5)	L	AcOEt: MeOH (7: 3)-B
E	Et ₂ O 100 %	M	AcOEt: MeOH (7: 3)-C
F	Et ₂ O: AcOEt (7: 3)	N	AcOEt: MeOH (5: 5)
G	Et ₂ O: AcOEt (5: 5)	O	AcOEt: MeOH (3: 7)
H	Et ₂ O: AcOEt (2: 8)	P	AcOEt: MeOH (1: 9)
		Q	MeOH 100%

L'analyse HPLC-HRMS et son hydrolyse enzymatique de la troisième fraction élue avec AcOEt: MeOH (7: 3) (Cyme M) indiquent la présence des glucosides de prégnanes. L'isolement de ces composés de *C. menarandrense* est réalisé à l'aide d'un module d'HPLC semi-préparatif composé d'une pompe de compression 322-Gilson qui distribue les solvants (eau-ACN contenant 0.05% d'AF) à 30 ml/min équipé d'une colonne Axia C18 (5 µm, 100 × 21,2 mm i.d., Phenomenex). L'injection de 250 µL d'échantillon se réalise via une boucle d'injection Rheodyne de 500 µl, injectant environ 30 mg d'échantillon chaque fois. Le gradient de l'élution est le suivant : 20 à 30 % ACN acidifié en 10 minutes, 30-100 % ACN en 3 minutes et 100 % ACN pendant 2 minutes. La séparation est suivie par un détecteur UV/Vis-151 (Gilson) à 201 nm et les pics d'intérêt sont collectés manuellement. A l'issue de cette étape d'analyse les prégnanes mono-glucosylés **A** (4,9 mg), **B** (2,3 mg), **C** (1,0 mg), **D** (3,8 mg), **E** (1,4 mg) ainsi que les flavonoïdes **I** (3,3 mg), **J** (4,0 mg), **K** (0,7 mg) sont isolés.

8.2.2. Isolement des prégnanes di-glucosylés

La phase aqueuse obtenue suite au partage liquide-liquide (eau : acétate d'éthyle) de l'extrait éthanolique de *C. menarandrense* (lot Cyme_09_12) est fractionnée sur une cartouche SPE de 10 g de silice greffée C18 (Chromabond). 1797,4 mg de cette fraction ont été solubilisés dans l'eau, chargés sur la cartouche SPE et élués avec des mélange d'eau et ACN de polarité décroissante (**Tableau 20**).

Tableau 20 Eluants utilisés pour le fractionnement par SPE en phase inverse de la phase aqueuse de l'extrait de *C. menarandrense*

Fraction	éluants	Fraction	éluants
A	H ₂ O 100 %	E	ACN: H ₂ O 5: 5
B	ACN: H ₂ O 2: 8	F	ACN: H ₂ O 6: 4
C	ACN: H ₂ O 3: 7	G	ACN: H ₂ O 8: 2
D	ACN: H ₂ O 4: 6	H	ACN 100 %

La fraction éluée avec 30 % d'ACN est fractionnée sur une cartouche SPE de 1 g de silice suite à son élution avec des mélanges de chloroforme-méthanol de polarité croissante. La fraction éluée avec CHCl₃-MeOH (85 : 15, V/V ; 3,4mg) est identifiée comme le composé **H**.

La fraction éluée avec 20 % d'ACN est fractionnée par HPLC semi-préparative sur le module Gilson (voir 8.2.1 page 131) en utilisant le suivant gradient de la phase mobile: 13 à 20 % ACN en 10 minutes, 20-70 % ACN en 4 minutes et 70 % ACN pendant 2 minutes. Les composés **F** (2,4 mg) et **G** (1,8 mg) sont ainsi isolés. Lors de cette analyse les composés **C** (12,2 mg), **E** (10,0) et **I** (2,2 mg) sont à nouveau isolés.

9. Méthodes chromatographiques analytiques

9.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les analyses par chromatographie sur couche mince ont été effectuées sur des plaques de Silicagel 60 F 254 sur feuille d'aluminium (Merck). Après développement dans des cuves en verre (Camag), les plaques ont été observées à la lumière du jour, et sous lampe UV à 254 et 366 nm. Par la suite, les plaques ont été révélées à la vanilline sulfurique (10% dans l'EtOH).

9.2. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrophotométrie ultraviolet/visible (HPLC/UV/Vis-DAD)

Les analyses sont réalisées avec un système Varian LC-920 équipé d'un détecteur à barrettes de diodes pour l'enregistrement des spectres UV/Vis. Les extraits sont injectés sur une colonne Kinetex (2,6 μ m, 100 $\times$ 3.0 mm i.d.) (Phenomenex). La phase mobile utilisée est un mélange d' A : eau + 0,5 % acide formique (AF) et B : ACN + 0,5 % AF. Pour les analyses la colonne est chauffée à 40°C et le débit de la phase mobile est de 0,8 ml/min. Quatre gradients sont appliqués lors de ce travail (**Tableau 21**). Le gradient (i) est utilisé pour l'analyse des extraits bruts, le (ii) pour les fractions contenant les prégnanes de *C. marnierianum*, le gradient (iii) pour les triterpènes et le gradient (iv) pour les prégnanes de *C. menarandrense*.

Tableau 21 Gradients de phase mobile utilisés pour les analyses HPLC/UV/Vis-DAD

i		ii		iii		iv	
Temps (min)	% B	Temps (min)	% B	Temps (min)	% B	Temps (min)	% B
0	30	0	30	0	85	0	12
15	70	10→13	50	13	100	10	80
16→35	100	17→30	100	15	100	13→20	100

9.3. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (HPLC/HRMS)

Les analyses des extraits et des composés purs sont effectuées à l'aide d'un système HPLC Agilent 1200 et d'une colonne Colonne Zorbax RRHT SB-C18 (5 μ m, 50 $\times$ 2.1 mm i.d.) (Agilent) thermostatée à 35°C. La phase mobile consiste en un mélange d'eau et d'ACN contenant 0,05% d'acide formique (AF), à un débit de 0,5 ml/min. Le pourcentage d'ACN augmente de 2 à 100 % en 8 minutes, puis est maintenu à 100 % pendant 4,5 minutes. Le système HPLC a été couplé à un spectromètre de masse 6520 (Agilent) équipé d'une source de type électrospray (ESI) et d'un analyseur quadripôle à temps de vol (qTOF). Les analyses ont été effectuées en mode positif aux conditions précisées au paragraphe 10.2 page. 134.

10. Méthodes physico-chimiques

10.1. Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire des composés présentant un centre d'asymétrie et des nouveaux composés a été mesuré avec un polarimètre Jasco P200. La raie D (589 nm) d'une lampe à sodium a été utilisée comme source de lumière incidente. La rotation α de la lumière polarisée par les produits dissous dans du méthanol a été mesurée dans une cuve de 10 cm de long thermostatée à 25°C. Le pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_D^{25}$ est défini comme suit (en degrés) :

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{\alpha_D \times 1000}{c \times l}$$

Avec α_D : valeur mesurée (moyenne de 20 lectures) à 25°C

c = concentration de la solution mg/ml

l = longueur de la cuve (dm)

10.2. Spectrométrie de masse de haute résolution (HRMS)

Les spectres de masse ont été enregistrés en mode positif par un spectromètre Accurate Mass QToF 6520 (Agilent) équipé d'une source d'ionisation electrospray (ESI) et d'un analyseur quadripôle à temps de vol. Les analyses ont été effectuées dans les conditions suivantes : gaz de désolvatation : N₂ ; voltage du capillaire : 4000 V ; voltage du fragmenteur : 120 V ; voltage du tube de vol : 9000 V ; température de la source : 340 °C ; débit du gaz de désolvatation : 8 l/h. Les spectres de masse (50-2000 amu) ont été enregistrés avec une fréquence de 3 spectres/seconde.

10.3. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres ¹H-RMN et ¹³C-RMN ont été mesurés à 500 MHz et 125 MHz respectivement, avec un spectromètre RMN Bruker Avance III - 500 MHz muni d'un passeur automatique d'échantillons et une Sonde BBFO (5 mm i.d., multi-noyaux) Les spectres DEPT, ROESY sélectif 1D et TOCSY 1D sélectif, ainsi que les expériences bidimensionnelles COSY, gHSQC, gHMBC, ROESY et NOESY, ont été enregistrés à l'aide de séquences impulsionsnelles spécifiques fournies par Bruker. Les échantillons ont été solubilisés dans des solvants deutérés (méthanol-*d*₄ pour tous les prégnanes et les flavonoïdes, DMSO-*d*₆ pour le composé C et chloroforme-*d* pour les triterpènes). Les déplacements chimiques δ ont été exprimés en ppm par rapport au signal résiduel du solvant deutéré utilisé comme référence interne (méthanol-*d*₄: δ H 3,31, δ C 49,15 ; DMSO-*d*₆ δ H 2,50, δ C 39,52 ; chloroforme-*d* δ H 7,26, δ C 77,16).

11. Méthodes biologiques

11.1. Hydrolyse enzymatique

La fraction Cyme M de *C. menarandrense* (1 mg) a été dissoute dans 1 ml de tampon acétate pH 5.0 avec 1 mg de β -D-glucosidase d'amande (Roth, 7512.1) et incubées à 37 °C pendant 24 heures. Le mélange réactionnel est ensuite analysé par CCM sur silice avec le système d'élution DCM : MeOH : H₂O (85 : 15 : 1, v/v).

11.2. Culture des cellules

11.2.1. STC-1

Les cellules STC-1 (ATCC® CRL-3254™) sont fournies par le Pr. Johan Auwerx (EPFL, Lausanne, Suisse). Elles sont entretenues en milieu DMEM riche en glucose (4,5 g/l) avec 4 mM de L-glutamine supplémenté avec 10 % de sérum bovin fœtal (FBS), 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/L de streptomycine. Les flacons de culture cellulaire sont incubés à 37°C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ humidifiée. Les cellules sont repiquées dans un milieu neuf tous les deux jours (à 70 % de confluence). Les essais sont réalisés entre le 6^{ième} et le 17^{ième} passage.

11.2.2. GLUTag

Les cellules sont entretenues en milieu DMEM à 1 g/l de glucose et 2 mM de L-glutamine supplémenté avec 10 % de sérum équin (FCS), 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/l de streptomycine. Les cultures cellulaires sont incubées à 37°C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ humidifiée. Les cellules sont repiquées dans un milieu neuf approximativement tous les trois jours (à 70 % de confluence). Les essais sont réalisés jusqu'au 30^{ième} passage.

11.2.3. Cellules intestinales murines primaires

Les cellules sont isolées du duodénum récupéré de souris « wild-type » C57BL/6. Après avoir enlevé le tissu musculaire intestinal qui l'entoure, l'endothélium est lavé plusieurs fois au tampon PBS, découpé en morceaux de 1 mm² et soumis à 5 étapes de digestion avec un tampon de digestion de collagénase (collagénase de *Clostridium histoliticum* 0,4 mg/ml en milieu DMEM avec 4,5 g/l glucose). Les cellules sont récupérées dans du milieu DMEM riche en glucose (4,5 g/l) avec 2 mM de L-glutamine supplémenté avec 10 % de sérum bovin fœtal (FBS), 100 U/ml pénicilline et 100 µg/L de streptomycine. Le fond des puits d'une plaque de 24 puits est enrobé avec du matrixgel® et par la suite les cellules sontensemencées dans les puits en présence de 5 nM de l'inhibiteur de kinase ROCK Y-27632. Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂ humidifiée pour leur utilisation dans un essai de sécrétion le jour suivant.

11.3. Traitement des cellules et dosage du GLP-1

Le protocole de mise en plaque en utilisant la lignée cellulaire STC-1 a fait l'objet d'optimisations de ce travail (voir 6.1.2, page 104). En général, les cellules sont mises en culture et diluées (comptage cellulaire avec une plaque de Neubauer) à une concentration de 5×10^5 cellules par ml dans du milieu DMEM avec du glucose 1g/l, 10 % de FBS, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/l de streptomycine. 100 µl de cette suspension cellulaire sontensemencés en plaque de 96 puits.

Le traitement est réalisé avec l'extrait solubilisé dans du DMSO et dilué dans du milieu DMEM (1 g/l de glucose, 0,1% de BSA, 2% de DMSO) en concentration deux fois supérieure à celle prévue pour le traitement. 100 µL de cette solution sont diluées dans les puits correspondants contenant déjà 100 µl de milieu. Par la suite, la plaque est conservée dans l'incubateur pendant deux heures. Le surnageant est ensuite transféré dans une autre plaque pour l'évaluation de la teneur en GLP-1 en utilisant un kit commercial ELISA GLP-1 (Active GLP-1, EGLP-35K Millipore®). Des témoins de produits naturels rapportés pour leur activité sécrétagogue GLP-1 ont été utilisés : Berbérine (Sigma®), Acide chlorogénique (Roth®) et le prégnane P57 (LGC standards®) Les résultats sont exprimés sous la forme

du pourcentage de la sécrétion de GLP-1 induite par chaque composé par rapport au niveau de GLP-1 témoin (traitement avec du DMSO 1%)

Stimulation de la sécrétion GLP-1 en pourcentage : $\frac{\text{GLP-1 (pg)}}{\text{GLP-1 blanc (pg)}} \times 100$

Le traitement des cellules GLUTag et des cellules primaires intestinales est réalisé de la même façon. Les cellules sontensemencées dans une plaque de 24 puits dont le fond est enrobé avec une couche de matrigel®. Suite à une incubation à 37°C avec 5 % de CO₂ pendant 24 heures, le vieux surnageant est jeté et les cellules sont lavées dans le tampon 138 (KCl 4,5 mM, NaCl 138 mM, NaHCO₃ 4,2 mM, NaH₂PO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2,6 mM, MgCl₂ 1,2 mM, HEPES 10 mM). L'extrait est solubilisé dans du DMSO et dilué dans le tampon 138 contenant 0,1% de BSA (concentration finale en DMSO 0,1%). Suite à une incubation de deux heures, le surnageant est prélevé, centrifugé à 2000 rpm à 4°C et soumis au dosage du GLP-1 (GLP-1 sécrété) en utilisant un kit ELISA (Meso Scale Discovery). Pour le dosage du GLP-1 intracellulaire, 0,5 ml de tampon de lyse¹ sont ajoutés dans les puits et les cellules sont décollées du fond et lysées. Les suspensions formées sont centrifugées et leur surnageant est soumis au dosage du GLP-1 (GLP-1 intracellulaire) en utilisant le même kit ELISA. Les résultats de l'essai avec les cellules GLUTag sont exprimés comme dans le cas des cellules STC-1.

Les résultats de la sécrétion de GLP-1 par les cellules primaires sont normalisés en prenant en compte le GLP-1 total de chaque puit (GLP-1 sécrété + GLP-1 intracellulaire). Le pourcentage de sécrétion est calculé pour chaque puit $\frac{\text{GLP-1 sécrété}}{\text{GLP-1 total}} \times 100$ et par la suite le pourcentage de sécrétion relative est calculé en exprimant le pourcentage de sécrétion GLP-1 suite au traitement sur le pourcentage de sécrétion par les cellules traitées par rapport aux cellules traitées avec le véhicule (tampon 138 avec 0,1 % DMSO).

Sécrétion du GLP-1 relative : $\frac{\% \text{ GLP-1 traitement}}{\% \text{ GLP-1 blanc}} \times 100$

¹ Tampon de lyse : acide désoxycholique 5mg/ml, Igepal CA-630 1 % V/V, Tris-HCl 1M 5 % V/V, NaCl 5 M 3 % V/V et une tablette de mélange des inhibiteurs de protéases sans EDTA par 50ml de tampon

11.4. Essais d'évaluation de la viabilité cellulaire

Suite au traitement des cellules, le surnageant est récupéré pour le dosage du GLP-1 tandis que les cellules restant au fond du puit sont utilisées pour la l'évaluation de la viabilité cellulaire.

11.4.1. MTT

Une solution de 5 mg/ml de bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT, Sigma) dans du milieu DMEM (sans rouge de phénol, glucose 1 g/L) est préparée et filtrée avec un filtre de 0,2 µm stérile. 100 µl de cette solution sont ajoutés dans les puits de la plaque qui est par la suite incubée dans une atmosphère à 5 % de CO₂ humidifiée pendant une heure. Suite à la vérification au microscope de la présence des cristaux de formazan violet, le milieu est aspiré et remplacé par 100 µl de DMSO. La lecture de la plaque s'effectue à 570 nm avec un lecteur de plaques ELISA Versamax plus® (Molecular Devices) et le pourcentage de la viabilité cellulaire est calculé par la formule : $\frac{\text{Absorbance traitement}}{\text{Absorbance DMSO}} \times 100$

11.4.2. MTS

Après avoir transvasé 100 µl de milieu de chaque puit, 20 µl de solution CellTiter 96® (Promega) sont ajoutés afin d'obtenir une solution finale de 317 µg/ml du réactif 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulphophényl)-2H-tétrazolium (MTS). La plaque est ensuite incubée dans une atmosphère à 5 % de CO₂ humidifiée pendant une heure et lue à 480 nm avec un lecteur de plaques ELISA Versamax plus® (Molecular Devices) et le pourcentage de la viabilité cellulaire est calculé comme dans le cas de l'essai avec le réactif MTT.

11.4.3. Cytométrie par imagerie

Après avoir retiré 100 µl de milieu de chaque puit, des solutions d'iodure de propidium (IP) et du réactif de Hoechst sont ajoutés afin d'obtenir des concentrations finales de 1,5 et 5,0 µM respectivement. Suite à l'incubation de la plaque dans une atmosphère à 5% de CO₂ humidifiée pendant une heure, des photos de chaque puits sont prises avec l'appareil Celigo® S (Nexcelom). Les images digitales sont prises en lumière visible et en fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 377 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 470 \text{ nm}$) et ($\lambda_{\text{excitation}} = 531 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 629 \text{ nm}$). Les photos sont analysées à l'aide du logiciel Celigo® qui reconnaît le contour des cellules et crée des cytogrammes en fonction de l'intensité des deux fluorescences observées dans chaque puits.

Annexe : tableaux RMN des prégnanes isolés

Ménarandroside I : Composé A

(500 MHz, méthanol-*d*₄)

Nouveau produit naturel

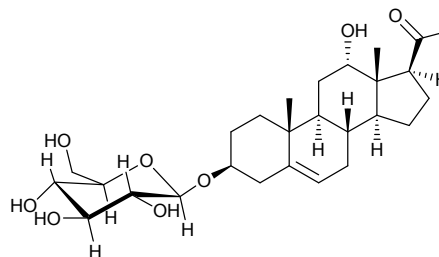
Masse isolée : 12,2 mg

Aiguilles blanches

$[\alpha]_D^{25} +14.69$ (c=0.4, MeOH)

UV maxima (nm): 199, 280 *sh*

ESI-TOF-MS m/z: 517,2764 [M+Na]⁺



Position		δC	δH	mult.	<i>J</i>	HMBC	NOESY
Prégnane	1 α	38,5	1,13	<i>td</i>	13,7 ; 3,4	H19	H2 α H9 H11 α
	1 β		1,85	<i>dt</i>			H1 α H2 β H19
	2 α	30,8	1,94	<i>br. dt</i>	12,6 ; 2,2	H1b H4 H1	H1 α H3
	2 β		1,62	<i>m</i>			H1 β H19
	3 α	79,9	3,60	<i>m</i>		H1 H1' H4 H1 H4 H2	H2 α H1'
	4 α	39,9	2,44	<i>ddd</i>	13,5 ; 4,5 ; 2,0	H6	H3 H4 β H6 H1'
	4 β		2,26	<i>ddd</i>			H2 β H4 α H19
	5	142,1	-			H1 H19 H7 H4 H7	
	6	122,8	5,39	<i>dt</i>	4,9 ; 2,3	H4 H7	H4 α H7 β
	7 α	32,9	1,61	<i>m</i>	17,3 ; 5,4 ; 2,9	H8	H9
	7 β		2,00	<i>dtd</i>			H6 H8
	8 β	33,3	1,52	<i>dd</i>	10,5 ; 4,9	H6 H11 H9 H15	H7 β H15 β H18H19
	9 α	45,4	1,40	<i>ddd</i>	11,5 ; 10,9 ; 6,9	H12 H19 H1 H14	H1 α H2 α H14
	10	37,7	-			H8 H6 H1 H4 H1b H9	
	11 α	29,8	1,75	<i>td</i>	13,2 ; 3,1	H9	
	11 β		1,72	<i>m</i>			H12
	12 α	72,4	-		2,7	H17 H11 H18	
	12 β		4,01	<i>br. t</i>			H11 β H17 H18 H21
	13	49,2	-			H15 H16 H8 H18	
	14 α	49,4	1,70	<i>m</i>		H15 H8 H17 H15 H12 H18	H15 α H17
	15 α	25,1	1,72	<i>td</i>	9,3 ; 2,7	H14 H8 H16	H15 β
	15 β		1,25	<i>m</i>			H8 H18H21
	16 α	23,2	2,10	<i>m</i>		H21 H15 H17 H14	H15 α H17
	16 β		1,64	<i>m</i>			H15 β
	17 α	56,8	3,23	<i>t</i>	9	H18 H14 H21 H21	H12H15 α H21
	18 β	14,5	0,65	<i>s</i>		H17 H12 H11	H8 H15 β
	19 β	19,8	1,02	<i>s</i>		H1 H9	H2 β H4 β H8
	20	212,9	-			H17 H21	
3-O-glucose	21	31,1	2,14	<i>s</i>			H12 H15b H17 H18
	1' α	102,6	4,39	<i>d</i>	7,8	H2' H3	H3' H5' H3 H4 α
	2' β	75,3	3,14	<i>dd</i>	8,9 ; 7,7	H3'	
	3' α	78,2	3,35	<i>m</i>		H1' H2'	H1'
	4' β	71,8	3,26	<i>m</i>		H6'a H6'b	
	5' α	78,0	3,27	<i>m</i>		H4'	H1'
	6' α	62,9	3,85	<i>dd</i>	12,0 ; 1,6	H5'	H6'b
	6' β		3,65	<i>dd</i>			H4' H6'a

Ménarandroside II : Composé F

(500 MHz, méthanol-*d*₄)

Nouveau produit naturel

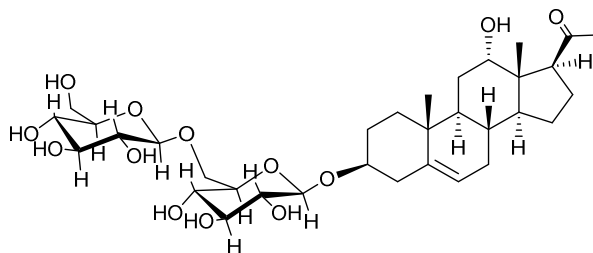
Masse isolée : 2,4 mg

Poudre blanche amorphe

$[\alpha]_D^{25}$ -4.4 (c= 0.4, MeOH)

UV maxima (nm): 199, 280 *sh*

ESI-TOF-MS *m/z*: 679,3296 [M+Na]⁺



Position		δ C	δ H	mult.	<i>J</i>	HMBC	NOESY
Prégnane	1 α	38,6	1,14	<i>td</i>	13,7 ; 3,6		H1 α H2 α H3 H9
	1 β		1,85	<i>dt</i>			H1 β H2 β H19
	2 α	31,1	1,98	<i>m</i>		H3 H4	H1 α H2 β H3 H1'
	2 β		1,61	<i>m</i>			H1 β H2 α H4 β H19
	3 α	80,1	3,58	<i>tt</i>	11,3 ; 4,6	H1H4 H1'	H1 α H2 α H4 α H1'
	4 α	40,0	2,43	<i>ddd</i>	13,5 ; 4,7 ; 2,2	H6	H3 H4 β H6 H1'
	4 β		2,27	<i>m</i>			H2 β H4 α H19
	5	142,1				H1 H4 H7 H19	
	6	122,8	5,39	<i>br. d</i>	5,9	H4 H7	H4 α H7 α H7 β
	7 α	32,7	1,67	<i>m</i>	10,5 ; 5,0	H6 H9 H14	H6 H9
	7 β		2,03	<i>m</i>	13,3 ; 3,3		H6
	8 β	32,8	1,54	<i>dd</i>	10,5 ; 4,9		H15 β H19 H18
	9 α	45,1	1,41	<i>m</i>		H1 H11 H12 H19	H1 α H7 α H11 α
	10	37,7				H6 H4 H1 H11 H9 H19	
	11 α	29,6	1,77	<i>m</i>		H9 H8	H9
	11 β		1,66	<i>m</i>			H12H18 H19
	12 α	72,2			2,8	H11	
	12 β		4,01	<i>br. t</i>			H11 β H17H18 H21
	13	49,2				H11 H17 H15 H8 H14 H16	
	14 α	49,7	1,72	<i>m</i>		H9 H17 H12	
	15 α	24,9	1,73	<i>m</i>			H15 β
	15 β		1,25	<i>m</i>			H8 H15 α H18
	16 α	23,3	2,11	<i>m</i>		H15 H17	H16 β
	16 β		1,70	<i>m</i>			H16 α
	17 α	56,1	3,24	<i>dd</i>	9,0 ; 7,8	H21 H15 H16	H12 H15 α H21
	18 β	14,0	0,65	<i>s</i>		H17 H12 H16 H14	H8 H11 β H12H21
	19 β	19,4	1,02	<i>s</i>		H9 H1	H1 β H2 β H4 β H8H11 β
	20	212,9				H21 H17	
	21	31,1	2,14				H12 H17 H18
3-O-glucose	1' α	102,7	4,39	<i>d</i>	7,7	H3 H2'	H5' H2 α H3 H4 α
	2' β	74,9	3,16	<i>dd</i>	9,3 ; 7,7	H3'	
	3' α	77,7	3,35	<i>m</i>		H2'	
	4' β	71,2	3,37	<i>m</i>		H5' H6' H3'	
	5' α	76,8	3,45	<i>m</i>		H6' H4'	H1'H6'a
	6' <i>a</i>	69,8	3,79	<i>dd</i>	11,6 ; 5,5	H1''	H6'b H5' H1''
	6' <i>b</i>		4,12	<i>dd</i>	11,6 ; 2,0		H6'a H1''
6'-O-glucose	1'' α	104,6	4,38	<i>d</i>	7,8	H6' H2'' H6'	H5'' H6'a H6'b
	2'' β	74,7	3,23	<i>dd</i>	9,1 ; 7,8	H1''	
	3'' α	77,8	3,27	<i>m</i>		H4''	
	4'' β	71,6	3,30	<i>m</i>		H6'' H2''	
	5'' α	77,8	3,27	<i>m</i>		H6'' H1'' H6''	H1'' H6''a H6''b
	6'' <i>a</i>	62,2	3,87	<i>dd</i>	11,6 ; 5,5	H4''	H5'' H6''a
	6'' <i>b</i>		3,67	<i>dd</i>	11,8 ; 5,4		H5'' H6''b

Carumbelloside II : Composé B

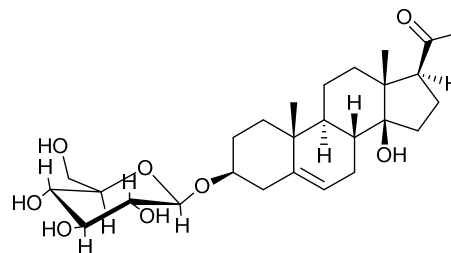
(500MHz, méthanol- d_4)

Masse isolée : 10,0 mg

Cristaux en forme d'aiguilles blanches

UV maxima (nm): 199 , 280 *sh*

ESI-TOF-MS m/z : 517,2764 $[M+Na]^+$



Position		δC	δH	mult	J	HMBC	NOESY
Prégnane	1 α	38,8	1,15	<i>td</i>	13,6 ; 3,2	H19	H1 α H2 β
	β		1,90	<i>m</i>			
	2 α	30,9	1,95	<i>m</i>		H4	
	β		1,60	<i>m</i>			
	3 α	79,9	3,60	<i>ddd</i>	11,4 ; 6,6 ; 4,7	H1' H2H4 H7	H1 α H4 α
	4 α	39,8	2,44	<i>ddd</i>	13,3 ; 4,9 ; 2,2		H4 β
	β		2,27	<i>td</i>	12,4 ; 2,0		
	5	141,5				H7 H19 H4	
	6	123,0	5,41	<i>t</i>		H4	H4 α H7 α
	7 α	27,2	1,83	<i>m</i>		H8	H6
	β		2,13	<i>m</i>			
	8 β	36,2	1,87	<i>m</i>		H11	H18
	9 α	44,6	1,52	<i>m</i>		H7 H11 H12	
	10	38,2		<i>d</i>		H4 H6 H19	
	11 α	21,3	1,52	<i>s</i>		H9 H12	H18 H19
	β		1,60	<i>m</i>			
	12 α	32,1	2,08	<i>m</i>		H17	H12 β H17
	β		1,70	<i>m</i>			
	13	49,4				H12 H15 H16 H17 H18	
	14	85,8				H15 H16 H18	
	15 α	33,4	1,59	<i>m</i>		H16	
	β		1,59	<i>m</i>			
	16 α	22,6	1,73	<i>m</i>		H15 H17	H15 H16 α H18 H19
	β		2,21	<i>m</i>			
	17 α	61,3	3,26	<i>dd</i>	9,0 ; 8,2	H12 H15 H16 H18 H21	H15 H16 α H21
	18 β	17,6	0,75	<i>s</i>		H12 H17	
	19 β	19,8	1,04	<i>s</i>			
	20	213,7				H16 H17 H21	
	21	31,8	2,12	<i>s</i>		H17	H16 α H21
3-O-glucose	1' α	102,6	4,38	<i>d</i>	7,8	H2' H3	H1 α H3 H4 α H3'
	2' β	75,3	3,14	<i>dd</i>	9,2 ; 7,8	H5'	
	3' α	78,0	3,35	<i>m</i>		H2' H4' H6'	
	4' β	71,8	3,28	<i>m</i>		H5'H6'	
	5' α	78,2	3,26	<i>m</i>		H2' H6' H4'	H1'
	6' a b	62,9	3,86 3,60	<i>dd</i> <i>dd</i>	12,0 ; 1,5 11,5 ; 6,0	H4'	H5' H6'b H4'

Carumbelloside I : Composé C

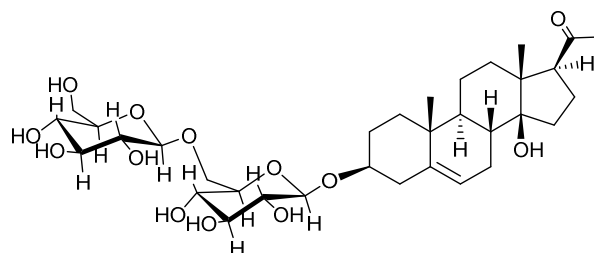
(500MHz, méthanol-*d*₄)

Masse isolée : 14,2 mg

$[\alpha]_D^{25}$ -4.40 (c : 0.4, MeOH)

UV maxima (nm): 199, 280 *sh*

ESI-TOF-MS *m/z* : 679,3299 [M+Na]⁺



Position	δC	δH	mult	J	HMBC	NOESY
Prénane	1 α	38,8	1,16 <i>td</i>	13,4 ; 3,8	H19	H3 H9
	1 β		1,89 <i>dt</i>	13,4 ; 3,9		
	2 α	31,0	1,96 <i>m</i>		H1 H4	H3
	2 β		1,62 <i>m</i>			H19
	3 α	80,3	3,57 <i>m</i>		H1 H1' H2 H4	H1'
	4 α	39,9	2,44 <i>ddd</i>	13,7 ; 4,9 ; 2,0	H6	H3 H6 H1'
	4 β		2,27 <i>m</i>			H2β H6 H19
	5	141,5			H4 H7 H19	
	6	123,1	5,42 <i>m</i>			
	7 α	27,2	1,82 <i>m</i>		H6 H8	H6
	7 β		2,13 <i>m</i>			
	8 β	36,2	1,87 <i>m</i>		H6	H1β H11β H15 H18 H19
	9 α	44,5	1,52 <i>m</i>		H8 H19 H11 H1 H12	
	10	38,2			H1 H11 H8 H4	
	11 α	21,3	1,51 <i>m</i>		H9 H12	H1α
	11 β		1,64 <i>m</i>			H19
	12 α	32,1	2,10 <i>m</i>		H17 H18	H17
	12 β		1,64 <i>m</i>			H18
	13	49,4			H18 H15 H16 H12 H17	
	14	85,8			H12 H15 H16 H18	
	15 α	33,4	1,60 <i>m</i>		H16	
	15 β		1,60 <i>m</i>			
3-O-glucose	16 α	22,6	1,75 <i>m</i>		H15 H17	H17
	16 β		2,21 <i>m</i>			H18
	17 α	61,3	3,27 <i>dd</i>	9,0 ; 8,2	H18 H16 H16 H15 H21	H16β H21
	18 β	17,6	0,75 <i>s</i>		H12 H17	
	19 β	19,8	1,04 <i>s</i>		H1	
	20	213,7			H16 H17 H21	
6'-O-glucose	21	31,8	2,11 <i>s</i>			
	1' α	102,8	4,39 <i>d</i>	7,9	H3 H2'	H5'
	2' β	75,2	3,16 <i>dd</i>	8,9 ; 7,3		
	3' α	78,1	3,34 <i>m</i>		H2'	
	4' β	71,6	3,34 <i>m</i>		H5' H6'a H6'b	
	5' α	77,1	3,45 <i>m</i>		H1'' H6'b	
6''-O-glucose	6' a	69,8	4,12 <i>dd</i>	11,8 ; 1,9		H5' H6'a H5'
	6' b		3,79 <i>dd</i>	11,5 ; 5,5	H6' H2''	H3'' H5'' H6'a H6'b
	1'' α	104,9	4,38 <i>d</i>	7,8	H1'' H3''	
	2'' β	75,2	3,21 <i>dd</i>	8,7 ; 7,6	H1'' H2''	
	3'' α	78,2	3,35 <i>m</i>		H2'' H3'' H6''a	
	4'' β	71,7	3,27 <i>m</i>		H3'' H6'b	
6''-O-glucose	5'' α	78,2	3,27 <i>m</i>		H4''	
	6'' a	62,9	3,87 <i>dd</i>	11,8 ; 1,9		H5''
	6'' b		3,67 <i>dd</i>	11,8 ; 5,0		H6''a H5''

Carumbelloside I : Composé C
(500MHz, DMSO-d₆)

	Position	δC	δH	mult	J	HMBC	NOESY
Prégnane	1 α	36,4	1,02	<i>td</i>	13,6 ; 2,8	H19	H3
	1 β		1,78	<i>dt</i>	13,5 ; 2,8		H19
	2 α	29,1	1,86	<i>br. d</i>	11,2	H1 H4	H3
	2 β		1,43	<i>m</i>			
	3 α	77,4	3,42	<i>m</i>		H1' H1 H2 H4	H1'
	4 α	37,8	2,35	<i>dd</i>	13,25 ; 2,25		H3'
	4 β		2,13	<i>m</i>			
	5	139,7				H1 H4 H7 H19	
	6	121,3	5,34	<i>br. s</i>		H4 H7 H8	H4α H4β
	7 α	25,3	1,69	<i>m</i>		H8 H9	H6
	7 β		2,10	<i>m</i>			H6
	8 β	33,9	1,69	<i>m</i>		H7 H11	H19
	9 α	42,2	1,42	<i>m</i>		H8 H11 H12 H19	
	10	36,0				H1 H4 H8 H9 H10	
	11 α	19,7	1,42	<i>m</i>		H9	
	11 β		1,48	<i>m</i>			
	12 α	30,4	1,56	<i>m</i>		H17 H18	
	12 β		1,46	<i>m</i>			
	13	47,6				H12 H15 H16 H18	
	14	82,6				H12 H15 H16 H18	
	14-OH ²		4,52	<i>br. s</i>			H18 H21
	15 α	31,6	1,46	<i>m</i>		H16	
	15 β		1,46	<i>m</i>			
	16 α	20,8	1,62	<i>m</i>		H15 H17	
	16 β		2,07	<i>m</i>			H18 14-OH
	17 α	59,2	3,12	<i>dd</i>	9,0 ; 9,8	H15 H16 H18 H21	H21
	18 β	16,4	0,61	<i>s</i>		H17	
	19 β	18,8	0,94	<i>s</i>		H1	
	20	209,8				H16 H17 H21	
3-O-glucose	21	31,1	2,04	<i>s</i>			
	1' α	100,9	4,21	<i>d</i>	7,8	H3 H2' H3' H5'	H3' H5' H3 H4α
	2' β	72,9	2,89	<i>t</i>	8,4	H1'	
	3' α	75,7	3,12	<i>br. t</i>	8,6	H2' H4' H5'	
	4' β	69,7	3,04	<i>m</i>		H2' H3' H5' H6'	
	5' α	75,4	3,29	<i>ddd</i>	9,3 ; 7,0 ; 1,8	H4' H6'	H3'
6'-O-glucose	6' a	68,0	3,94	<i>d</i>	10,6	H1'' H4' H5'	H2' H4' H5' H6'b
	6' b		3,55	<i>dd</i>	12,1 ; 5,3		H4' H5'
	1'' α	102,9	4,25	<i>d</i>	7,8	H6' H2''	H3'' H5'' H6'a H6'b
	2'' β	73,1	2,94	<i>t</i>	8,4	H1''	
	3'' α	76,4	3,10	<i>t</i>	9	H2'' H5''	
	4'' β	69,9	3,04	<i>m</i>		H3'' H5'' H6''	
	5'' α	76,6	3,03	<i>m</i>		H4'' H6''	
	6'' a	60,9	3,66	<i>br. d</i>	12,3	H5''	H5''
	6'' b		3,42	<i>br. d</i>	12,3		

² Signaux du spectre 1D-ROESY

Ménarandroside III : Composé D

(500 MHz, méthanol-*d*₄)

Nouveau produit naturel

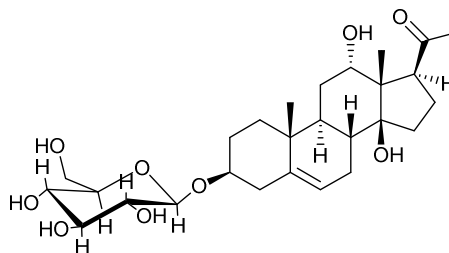
Masse isolée : 12,2 mg

Aiguilles jaunes pâles

$[\alpha]_D^{25} +20.12$ (c : 0.4, MeOH)

UV maxima (nm): 199, 280 *sh*

ESI-TOF-MS m/z: 533,2704 [M+Na]⁺



Position	δC	δH	mult	J	HMBC	NOESY
Prégnane	1 α	38,4	1,17 <i>td</i>	14,2 ; 3,9		
	1 β		1,89 <i>m</i>		H19	H1α H19
	2 α	30,5	1,96 <i>m</i>		H1 H4	H2β
	2 β		1,62 <i>m</i>			H4β H19
	3 α	79,7	3,62 <i>m</i>		H1' H4 H1	H1α H2α H4α
	4 α	39,6	2,46 <i>ddd</i>	13,2 ; 4,8 ; 1,6		H4β
	4 β		2,29 <i>m</i>			H19 H2β
	5	140,7	-		H1 H4 H19	
	6	123,0	5,42 <i>br. dd</i>	3,0 ; 2,8	H4	H4α H4β H7β
	7 α	26,4	2,19 <i>m</i>		H8 H6	
	7 β		1,81 <i>m</i>			
	8 β	35,8	1,9 <i>m</i>		H11 H6	
	9 α	40,0	1,7 <i>m</i>		H1 H12 H19	H1α
	10	37,5	-		H1 H6 H9 H4 H19	H18
	11 α	29,8	1,86 <i>m</i>		H8 H9	
	11 β		1,8 <i>m</i>			
	12 α	74,2	-			
	12 β		4,16 <i>br. t</i>	2,6	H11 H18 H17	H11β H17 H18 H21
	13	50,9	-		H12 H18 H11 H15 H17	
	14	87,3	-		H15 H16 H18 H12	
	15 α	33,3	1,55 <i>m</i>		H16 H8	H16α
	15 β		1,54 <i>m</i>			H16β H18
	16 α	21,9	2,21 <i>m</i>			H15α H16β H18
	16 β		1,83 <i>m</i>			
3-O-glucose	17 α	54,6	3,79 <i>t</i>	8,8	H16 H15 H18	H6 H21
	18 β	18,0	0,72 <i>s</i>		H12 H17	
	19 β	19,9	1,05 <i>s</i>		H1 H1b H9	
	20	213,2	-		H17	
	21	31,1	2,18 <i>s</i>			
	1' α	102,3	4,39 <i>d</i>	7,8	H2' H3	H3' H5' H3 H4α
	2' β	74,8	3,17 <i>dd</i>	9,0 ; 7,8	H3'	
	3' α	77,8	3,37 <i>m</i>		H5' H1' H2'	
	4' β	71,4	3,31 <i>m</i>		H6' H3'	
	5' α	77,5	3,28 <i>m</i>		H6'	
	6' a	62,7	3,86 <i>dd</i>	11,8 ; 1,5	H4'	H4' H6'b
	6' b		3,68 <i>dd</i>	11,8 ; 5,4		H4'

ménarandroside IV : Composé G

(500 MHz, méthanol-*d*₄)

Nouveau produit naturel

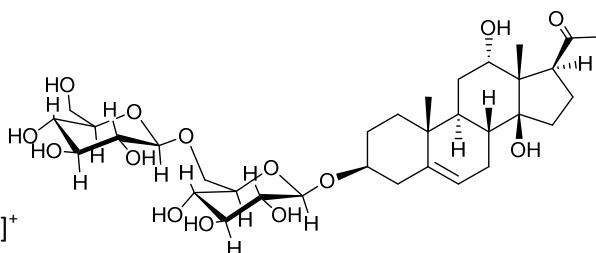
Masse isolée : 1,8 mg

Poudre blanche

$[\alpha]_D^{25} +20.07$ (c : 0.1, MeOH)

UV maxima (nm): 199, 280 *sh*

ESI-TOF-MS *m/z*: 695,3250 [M+Na]⁺



Position		δC	δH	mult	<i>J</i>	HMBC	ROESY
Prégnane	1 α	38,4	1,18	<i>td</i>	13,4 ; 4,5		H3
	β		1,89	<i>dd</i>			
	2 α	31,5	1,96	<i>m</i>		H4	H3
	β		1,62	<i>m</i>			
	3 α	80,1	3,59	<i>tt</i>	11,00 ; 4,60		H1α H2α H4α
	4 α	39,6	2,46	<i>ddd</i>	12,9 ; 4,5 ; 2,4		H3 H4β
	β		2,28	<i>m</i>			
	5	140,9				H4	H19
	6	122,3	5,43	<i>br. dd</i>	3,0 ; 2,8	H4	H4α H7β
	7 α	26,4	2,19	<i>m</i>		H8 H9	H6
	β		1,80	<i>m</i>			
	8 β	35,8	1,90	<i>m</i>			H18
	9 α	40,0	1,70	<i>m</i>		H12	
	10	37,7				H4 H6 H19	
	11 α	29,8	1,84	<i>m</i>		H8 H9	H12β H18
	β		1,75	<i>m</i>			
	12 α	74,2			2,4	H19	H11β H18
	β		4,16	<i>br. t</i>			
	13	51,0				H16 H17 H18	
	14	87,5				H12 H16 H18	
	15 α	33,3	1,55	<i>m</i>		H16	
	β		1,54	<i>m</i>			
	16 α	21,9	2,21	<i>m</i>		H17	H15α H17
	β		1,84	<i>m</i>			
	17 α	54,6	3,79	<i>m</i>		H18 H21	
	18 β	18,1	0,71	<i>s</i>		H17	H12β
	19 β	19,9	1,05	<i>s</i>			
	20	213,3				H17 H21	
	21	31,1	2,19	<i>s</i>			H12β
3-O-glucose	1' α	102,7	4,40	<i>d</i>	8	H3 H2'	H5' H3 H4a H2a
	2' β	74,9	3,15	<i>dd</i>	8,9 ; 7,7	H3'	
	3' α	77,7	3,34	<i>m</i>		H2'	
	4' β	71,2	3,35	<i>m</i>		H5' H6' H3'	
	5' α	76,8	3,46	<i>m</i>		H6' H4'	H6'a H1'
	6' a	69,8	4,12	<i>m</i>	11,6 ; 1,9	H1''	H6'b H5' H1''
	b		3,79	<i>dd</i>			
6'-O-glucose	1'' α	105,0	4,39	<i>d</i>	7,7	H6' H2'' H6'	H5'' H6'a H6'b
	2'' β	74,7	3,21	<i>dd</i>	9,0 ; 7,9	H1''	
	3'' α	77,8	3,35	<i>m</i>		H4''	
	4'' β	71,6	3,27	<i>m</i>		H6'' H2''	
	5'' α	77,8	3,29	<i>m</i>		H6'' H1'' H6''	H6''a H6''b H1''
	6'' a	62,2	3,87	<i>dd</i>	11,8 ; 5,3	H4''	H5'' H6''b
	b		3,67	<i>dd</i>			

Ménarandroside V : Composé E

(500 MHz, méthanol-*d*₄)

Nouveau produit naturel

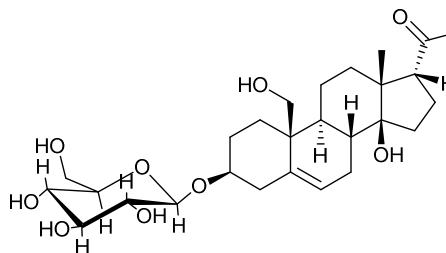
Masse isolée : 11,4 mg

Aiguilles jaunes pâles

$[\alpha]_D^{25}$ -7.65 (c : 0.4, MeOH)

UV maxima (nm): 199, 280 *sh*

ESI-TOF-MS *m/z* : 533,2715 [M+Na]⁺



Position		δC	δH	mult	<i>J</i>	HMBC	NOESY
Prégnane	1 α	34.6	1,13	<i>td</i>	12,5 ; 3,3	H19	H2 α , H3
	1 β		2,08	<i>m</i>			H11 β
	2 α	31.2	1,91	<i>m</i>	11,2 ; 3,6	H1b H4	H1b H3 H4b
	2 β		1,52	<i>dd</i>			H19
	3 α	79.7	3,64	<i>m</i>	13,1 ; 4,5 ; 1,9	H1' H4a	H1b
	4 α	39.9	2,52	<i>ddd</i>		H6	H3 H6 H1'
	4 β		2,27	<i>m</i>			
	5	136.7				H19b H19a	
	6	127.1	4,4	<i>br d</i>		H4	H4 α H4 β H7 β H8 H19b
	7 α	28.2	1,81	<i>m</i>		H8	H6
	7 β		2,3	<i>m</i>			H7 β H8 H19a
	8 β	38.9	2,16	<i>ddd</i>	13,1 ; 4,5 ; 1,9		H7 β H19a
	9 α	47.8	1,15			H19b H19a H8 H7	
	10	43.1		<i>td</i>	12,5 ; 3,3	H6 H4 H19b	
	11 α	22.9	1,59	<i>m</i>		H18	H19b
	11 β		1,69	<i>m</i>			
	12 α	40.3	1,59	<i>m</i>			
	12 β		1,4	<i>m</i>			
	13	50.6		<i>dd</i>	11,5 ; 1,1	H11 H17 H12 H18	
	14	87.5		<i>d</i>	7,7	H17 H12 H18 H8	
	15 α	34.6	2,09	<i>m</i>		H8 H16	H15 β
	15 β		1,7	<i>m</i>			
	16 α	25.5	2,03	<i>td</i>	9,6 ; 1,9	H15	H16 β H17
	16 β		1,9	<i>m</i>			H17
	17 α	64.0	2,97	<i>dd</i>	9,6 ; 4,6	H21 H18	H18 H21
	18 β	15.8	1,03	<i>m</i>			H8 H11 β H12 β H15 α
	19 α	63.5	3,84	<i>d</i>	11,8		H6
	19 β		3,54	<i>d</i>	11,8		
	20	220.1				H21 H17	
3-O-glucose	21	32.8	2,25	<i>m</i>			
	1'' α	102.6	4,39	<i>d</i>	7,7	H2'	H5'
	2'' β	75.3	3,14	<i>dd</i>	9,1 ; 7,9		
	3'' α	71.8	3,26	<i>dd</i>	9,1 ; 7,9	H4'	H1'
	4'' β	78.2	3,35	<i>m</i>		H5' H2'	
	5'' α	78.0	3,27	<i>m</i>		H6'b	H1' H6'a H6'b
	6' α	63.0	3,85	<i>dd</i>	11,5 ; 1,1		
	6' β		3,64	<i>dd</i>	12,1 ; 5,0		

Prégnénolone-3-*O*-gentiobioside : Composé H

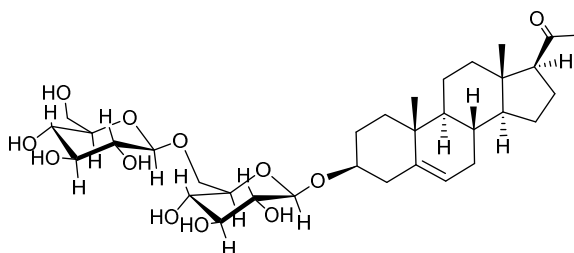
(500 MHz, méthanol-*d*₄)

Masse isolée : 3,4 mg

Poudre blanche

UV maxima (nm): 199, 280 *sh*

ESI-TOF-MS *m/z*: 658,3816 [M+NH₄]⁺



	Position	δC	δH	mult	J	HMBC	NOESY
Prégnane	1 α	38,4	1,18	<i>td</i>	13,4 ; 4,5		H3
	β		1,89	<i>dd</i>			
	2 α	31,5	1,96	<i>m</i>		H4	H3
	β		1,62	<i>m</i>			
	3 α	80,1	3,59	<i>tt</i>	11,00 ; 4,60		H1α H2α H4α
	4 α	39,6	2,46	<i>ddd</i>	12,9 ; 4,5 ; 2,4		H3 H4β
	β		2,28	<i>m</i>			
	5	140,9				H4	
	6	122,3	5,43	<i>br. dd</i>	3,0 ; 2,8	H4	H4α H7β
	7 α	26,4	2,19	<i>m</i>		H8 H9	H6
	β		1,80	<i>m</i>			
	8 β	35,8	1,90	<i>m</i>			H18
	9 α	40,0	1,70	<i>m</i>		H12	
	10	37,7				H4 H6 H19	
	11 α	29,8	1,84	<i>m</i>		H8 H9	H12β H18
	β		1,75	<i>m</i>			
	12 α	74,2			2,4	H19	H11β H18
	β		4,16	<i>br. t</i>			
	13	51,0				H16 H17 H18	
	14 α	87,5				H12 H16 H18	
	15 α	33,3	1,55	<i>m</i>		H16	
	β		1,54	<i>m</i>			
	16 α	21,9	2,21	<i>m</i>		H17	H15α H17
	β		1,84	<i>m</i>			
	17 α	54,6	3,79	<i>m</i>		H18 H21	
	18 β	18,1	0,71	<i>s</i>		H17	H12β
	19 β	19,9	1,05	<i>s</i>			
	20	213,3				H17 H21	
	21	31,1	2,19	<i>s</i>			H12β
3- <i>O</i> -glucose	1' α	102,7	4,40	<i>d</i>	8	H3 H2'	H5' H3 H4a H2a
	2' β	74,9	3,15	<i>dd</i>	8,9 ; 7,7	H3'	
	3' α	77,7	3,34	<i>m</i>		H2'	
	4' β	71,2	3,35	<i>m</i>		H5' H6' H3'	
	5' α	76,8	3,46	<i>m</i>		H6' H4'	H6'a H1'
	6' a	69,8	4,12	<i>m</i>	11,6 ; 1,9	H1''	H6'b H5' H1''
	b		3,79	<i>dd</i>			
6'- <i>O</i> -glucose	1'' α	105,0	4,39	<i>d</i>	7,7	H6' H2'' H6'	H5'' H6'a H6'b
	2'' β	74,7	3,21	<i>dd</i>	9,0 ; 7,9	H1''	
	3'' α	77,8	3,35	<i>m</i>		H4''	
	4'' β	71,6	3,27	<i>m</i>		H6'' H2''	
	5'' α	77,8	3,29	<i>m</i>		H6'' H1'' H6''	H6''a H6''b H1''
	6'' a	62,2	3,87	<i>dd</i>	11,8 ; 5,3	H4''	H5'' H6''b
	b		3,67	<i>dd</i>			

Marnieranoside A (aglycone): Composé O

(500 MHz, méthanol-*d*₄)

Nouveau produit naturel

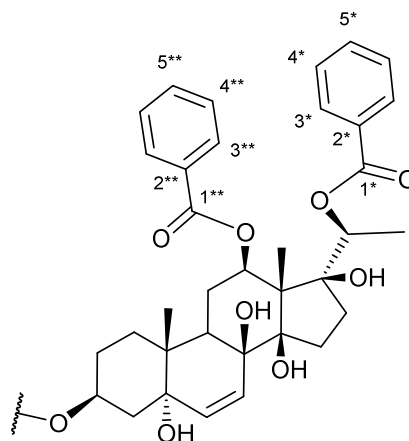
Masse isolée : 3,2 mg

Poudre blanche amorphe

$[\alpha]_D^{25} +29.62$ (c : 0.1, MeOH)

UV maxima (nm): 195, 229, 274 *sh*

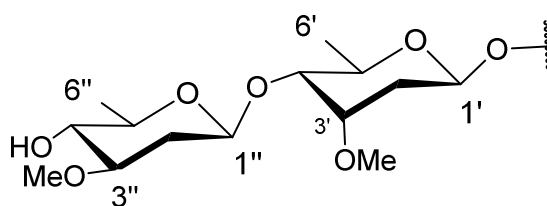
ESI-TOF-MS m/z: 917,4283: [M+Na]⁺



Position		δC	δH	<i>mult</i>	J	HMBC	NOESY
Prégnane	1 α	28,0	1,78	<i>m</i>		H19	H1 β H3
	β		1,42	<i>m</i>			
	2 α	27,0	1,85	<i>m</i>			
	β		1,67	<i>m</i>		H1'	
	3 α	75,9	4,11	<i>m</i>		H1'	H1'
	4 α	39,4	1,99	<i>td</i>	8,1 ; 2,6	H19	H3
	β		1,76				
	5	76,1				H4 H7 H19	
	6	136,5	5,55	<i>d</i>	10,3		H4 α
	7	127,6	5,83	<i>d</i>	10,4		H4 α H6 H15 α
	8	74,8				H6	
	9 α	37,1	1,98	<i>m</i>		H7 H11 H12 H19	H11 α
	10	40,1		-		H6 H19	
	11 α	24,1	2,00	<i>m</i>		H9	H9 H12
	β		1,71	<i>m</i>			
	12 α	76,8	5,01	<i>dd</i>	10,2 ; 4,3	H11 H18	H9 H20
	13	59,1		-		H7 H15 H16	
	14	88,9		-			
	15 α	33,5	1,93	<i>m</i>			H12 H21
	β		1,85	<i>m</i>		H15	H16 β
	16 α	35,0	2,10	<i>m</i>			
	β		1,98	<i>m</i>		H18 H21	H12 H21
12-O-benzoyl : 20-O-benzoyl	17	88,8		-			
	18 β	12,4	1,68	<i>s</i>		H9 H11	H3*, H3**
	19 β	21,3	0,99	<i>s</i>		H21	H4 β H6 H7 H11 β
	20 α	75,7	4,84	<i>q</i>	6,3	H20	H21 H3*
	21	15,6	1,29	<i>d</i>	6,0	H20 H3*/7*	
	1 *	166,7		-		H20	
	2 *	131,7		-		H3*/7* H4*/6*	
	3 */ 7*	130,9	7,6	<i>dd</i>	7,8 ; 1,5		H4*/H6* H18 H21
	4 */ 6 *	129,3	7,32	<i>t</i>	8,0		H3*/H7* H5*
	5 *	134,1	7,53	<i>t</i>	7,4	H3*/7*	H4*/H6*
12-O-benzoyl : 20-O-benzoyl	1 **	167,9				H3**/7**	
	2 **	132,3				H4**/6**	
	3 **/ 7 **	130,6	7,65	<i>dd</i>	7,8 ; 1,5	H5**	H4**/H6** H11 β H18
	4 **/ 6 **	129,3	7,1	<i>t</i>	7,8		H3**/H7**
	5 **	133,9	7,42	<i>t</i>	7,4	H3**/7**	H4**/H6**

Marnieranoside A (partie osidique): Composé O

(500 MHz, méthanol- d_4)



Position		δC	δH	<i>mult</i>	<i>J</i>	HMBC	NOESY
3-O- β -D-cymarose	1'	100,0	4,65	<i>dd</i>	9,6 ; 1,9	H3 H2'	H-3
	2' α	37,8	2,29	<i>br dd</i>	12,5 ; 5,5		OMe'
	β		1,41	<i>td</i>	11,5 ; 9,0		
	3'	80,3	3,34	<i>dt</i>	12,7 ; 6,3	H2' H4' OMe'	H6'
	4'	84,2	3,19	<i>td</i>	12,9 ; 6,0	H2' H3' H5' H6' H1''	OMe'
	5'	72,5	3,35	<i>dq</i>	11,0 ; 5,4	H4' H6'	H1' H6'
	6'	18,8	1,27	<i>d</i>	6,2		H3' H4'
4'-O- β -D-oléandrose	OMe'	57,6	3,43	<i>s</i>		H3'	
	1''	101,5	4,7	<i>dd</i>	9,6 ; 1,7	H4' H2''	H4'
	2'' α	37,9	2,3	<i>br dd</i>	12,3 ; 5,1		H1'' H3'' H6''
	β		1,44	<i>td</i>	12,3 ; 9,6		
	3''	81,9	3,2	<i>ddd</i>	11,6 ; 8,7 ; 4,9	H2'' H4'' OMe''	H1''
	4''	77,2	2,98	<i>br t</i>	9,1	H2'' H3'' H6''	
	5''	73,5	3,24	<i>dq</i>	9,5 ; 6,2	H4'' H6''	H6''
	6''	18,5	1,31	<i>d</i>	6,0	H4''	H4'' OMe''
	OMe''	57,8	3,41	<i>s</i>		H3''	

Marnieranoside B (aglycone): Composé P

(500 MHz, méthanol-*d*₄)

Nouveau produit naturel

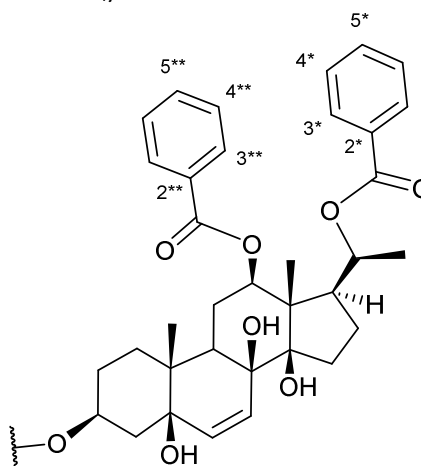
Masse isolée : 0,9 mg

Poudre blanche amorphe

$[\alpha]_D^{25} +11.25$ (c : 0.1, MeOH)

UV maxima (nm): 195, 229, 274 *sh*

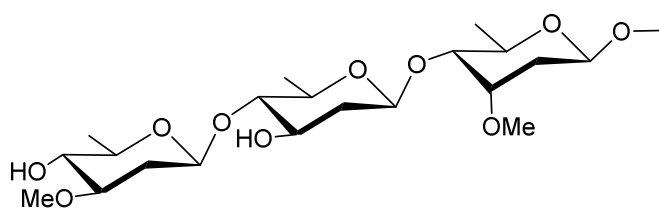
ESI-TOF-MS *m/z* : 1031,4960 [M+Na]⁺



Position		δC	δH	<i>mult</i>	<i>J</i>	HMBC	ROESY
Prégnane	1 α	30,2	1,31	<i>m</i>			
	1 β		1,59	<i>m</i>		H18	H19
	2 α	29,1	1,96	<i>m</i>		H4	H1 α
	2 β		1,60	<i>m</i>			H19
	3 α	76,0	4,13	<i>m</i>		H4, H2'	H4 α H2 α H1 α
	4 α	34,1	2,44	<i>dd</i>	12,8 ; 4,3	H6	H3 H6
	4 β		1,43	<i>dd</i>	11,8 ; 9,6		H19
	5	83,8				H7, H6, H4, H19	
	6	133,3	5,75	<i>d</i>	10,1		
	7	132,6	6,03	<i>d</i>	10,1		H6
	8	75,5				H11, H6, H9	
	9 α	38,4	2,30	<i>dd</i>	12,7 ; 1,5	H11,H7,H19	H11 α H12 α H15 α
	10	38,6				H9, H6, H19, H4b	
	11 α	23,5	1,57	<i>m</i>		H9,H12	H9
	11 β		1,92	<i>m</i>			
	12 α	75,5	5,06	<i>dd</i>	11,2 ; 4,8	H9	H11 α H9
	13	55,7				H18, H17, H11	
	14	87,9				H18, H7	
	15 α	33,3	2,06	<i>m</i>			H9 H17
	15 β		1,66	<i>m</i>			H16 β
	16 α	26,3	1,57	<i>m</i>		H17	H17
	16 β		1,96	<i>m</i>		H18 H21	H18
20-O-benzoyl	17	54,0	2,53	<i>td</i>	11 ; 8,5	H21,H18,H20,H12,H16	H21 H16 α H16 β
	18 β	17,4	1,68	<i>s</i>		H9 H11	H3* H3**
	19 β	18,7	0,99	<i>s</i>		H21	H2 β H4 β H11 β
	20	74,3	4,84	<i>q</i>	6,3	H20	H21
	21	20,9	1,29	<i>d</i>	6,0	H20 H3*/7*	
12-O-benzoyl	1 *	166,8		-		H20	
	2 *	131,8		-		H3*/7* H4*/6*	
	3 */ 7*	130,6	7,6	<i>dd</i>	7,8 ; 1,5		H4*/H6* H-18
	4 */ 6 *	129,4	7,32	<i>t</i>	8,0		H3*/H7* H5*
	5 *	134,1	7,53	<i>t</i>	7,4	H3*/7*	H4*/H6*
12-O-benzoyl	1 **	167,8				H3**/7**	
	2 **	132,2				H4**/6**	
	3 **/ 7 **	130,6	7,65	<i>dd</i>	7,8 ; 1,5	H5**	H4**/H6** H18
	4 **/ 6 **	129,3	7,1	<i>t</i>	7,8		H3**/H7** H5**
	5 **	133,9	7,42	<i>t</i>	7,4	H3**/7**	H4**/H6**

Marnieranoside B (partie osidique): Composé P

(500 MHz, méthanol-*d*₄)



Position		δC	δH	<i>mult</i>	<i>J</i>	HMBC	ROESY
3-O-beta-D-cymarose	1'	100,0	4,66	<i>dd</i>	9,8 ; 1,8	H3; H2'a ; H2'b	H2'α H3 H4α H5'
	2' α	38,3	2,25	<i>m</i>		H1'	H1' OMe'
	β		1,38	<i>m</i>			H4'
	3'	80,3	3,37	<i>m</i>		OMe' ; H2' ; H4'	
	4'	84,4	3,16	<i>t</i>	8,9	H3'; H2' ; H1'' ; H6'	H2'β H1''
	5'	72,0	3,35	<i>m</i>			
	6'	18,7	1,26	<i>d</i>		H4'	
3-O-beta-D-canarose	OMe'	57,8	3,42	<i>s</i>			H2'α
	1''	101,5	4,71	<i>dd</i>	9,6 ; 1,8	H2'', H4'	H2''α H3'' H5'' H4'
	2' α	37,9	2,19	<i>m</i>		H1''	H3''
	β		1,45	<i>m</i>			
	3''	81,9	3,59	<i>ddd</i>	11,9 ; 8,5 ; 5,3	H2''	
	4''	77,2	3	<i>t</i>	8,9	H3'', H1''', H2'', H6''	
	5''	73,5	3,35	<i>m</i>		H6'', H4''	
3-O-beta-D-oléandrose	6''	18,5	1,3	<i>d</i>			
	1'''	101,5	4,62	<i>dd</i>	9,8 ; 1,8	H2'''; H4''	H2'''α, H4''', H5'''
	2' α	37,9	2,39	<i>ddd</i>	12,6 ; 4,9 ; 2,0	H1'''	
	β		1,39	<i>m</i>			
	3'''	81,9	3,24	<i>m</i>		H2''' OMe'''; H4'''	H2'''α
	4'''	77,2	3,01	<i>t</i>	9,0	H3''', H6''' H2'''	H6'''
	5'''	73,5	3,36	<i>m</i>		H6''', H4'''	
3-O-beta-D-oléandrose	6'''	18,5	1,28	<i>d</i>		H4'''	
	OMe''	57,8	3,44	<i>s</i>		H3'''	

Références bibliographiques

- Abdallah, H.M., Osman, A.-M.M., Almehdar, H., Abdel-Sattar, E., 2013. Acylated pregnane glycosides from *Caralluma quadrangula*. *Phytochemistry* 88, 54–60.
- Abdel-Sattar, E., Harraz, F.M., Al-ansari Soliman Mohammed Abdullah, El-Mekkawy, S., Ichino, C., Kiyohara, H., Ishiyama, A., Otaguro, K., Omura, S., Yamada, H., 2008. Acylated pregnane glycosides from *Caralluma tuberculata* and their antiparasitic activity. *Phytochemistry* 69, 2180–2186.
- Abdennacer, B., Karim, M., Yassine, M., Nesrine, R., Mouna, D., Mohamed, B., 2015. Determination of phytochemicals and antioxidant activity of methanol extracts obtained from the fruit and leaves of Tunisian *Lycium intricatum* Boiss. *Food Chem.* 174, 577–584.
- Ahmed, A.B.A., Rao, A.S., Rao, M.V., 2010. *In vitro* callus and in vivo leaf extract of *Gymnema sylvestre* stimulate beta-cells regeneration and anti-diabetic activity in Wistar rats. *Phytomedicine* 17.
- Albers, F., Meve, U., 2004. *Illustrated Handbook of Succulent Plants: Asclepiadaceae*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Alberti, S.G., Zimmet, P.Z., Shaw, J., 2006. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome.
- Albrechtsen, N.J.W., Kuhre, R.E., Deacon, C.F., Holst, J.J., 2013. Targeting the intestinal L-cell for obesity and type 2 diabetes treatment. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* 9, 61–72.
- Ali Asgar, M., 2013. Anti-Diabetic Potential of Phenolic Compounds: A Review. *Int. J. Food Prop.* 16, 91–103.
- Al-Massarani, S.M., Bertrand, S., Nievergelt, A., El-Shafae, A.M., Al-Howiriny, T.A., Al-Musayeib, N.M., Cuendet, M., Wolfender, J.-L., 2012. Acylated pregnane glycosides from *Caralluma sinaica*. *Phytochemistry* 79, 129–140.
- Alonso-Castro, A.J., Ortiz-Sanchez, E., Garcia-Regalado, A., Ruiz, G., Nunez-Martinez, J.M., Gonzalez-Sanchez, I., Quintanar-Jurado, V., Morales-Sanchez, E., Dominguez, F., Lopez-Toledo, G., Cerbon, M.A., Garcia-Carranca, A., 2013. Kaempferitrin induces apoptosis via intrinsic pathway in HeLa cells and exerts antitumor effects. *J. Ethnopharmacol.* 145, 476–489.
- ANSM, 2011. Suspension de l'utilisation des médicaments contenant de la pioglitazone (Actos®, Competact®) - Lettre aux professionnels de santé.
- Aquino, R., Peluso, G., De Tommasi, N., De Simone, F., Pizza, C., 1996. New Polyoxypregnane Ester Derivatives from *Leptadenia hastata*. *J. Nat. Prod.* 59, 555–564.
- Arkan, M.C., Hevener, A.L., Greten, F.R., Maeda, S., Li, Z.-W., Long, J.M., Wynshaw-Boris, A., Poli, G., Olefsky, J., Karin, M., 2005. IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat. Med.* 11, 191–198.
- Bai, H., Li, W., Asada, Y., Satou, T., Wang, Y., Koike, K., 2009. Twelve pregnane glycosides from *Cynanchum atratum*. *Steroids* 74, 198–207.
- Bai, H., Li, W., Koike, K., 2008. Pregnane glycosides from *Cynanchum atratum*. *Steroids* 73, 96–103.
- Bailey, C.J. (Ed.), 2007. *Metformin: the gold standard*. John Wiley & Sons, Chichester, UK ; Hoboken, NJ.
- Bala, V., Rajagopal, S., Kumar, D.P., Nalli, A.D., Mahavadi, S., Sanyal, A.J., Grider, J.R., Murthy, K.S., 2014. 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.* 5.
- Barla, A., Birman, H., Kultur, S., Oksuz, S., 2006. Secondary metabolites from *Euphorbia helioscopia* and their vasodepressor activity. *Turk. J. Chem.* 30, 325.
- Battu, V., 2013. Les insulines. *Actual. Pharm.* 52, 55–59.
- Baum, J.C., McClure, D.S., 1979. The ultraviolet transitions of benzoic acid. 1. Interpretation of the singlet absorption spectrum. *J. Am. Chem. Soc.* 101, 2335–2339.
- Bellamakondi, P.K., Godavarthi, A., Ibrahim, M., 2014. Anti-hyperglycemic activity of *Caralluma umbellata* Haw. *BiolImpacts BI* 4, 113–116.
- Bindra, J.S., Cawthorne, M.A.T.C.L., Rubin, I.D., 2002. Extracts, compounds & pharmaceutical compositions having anti-diabetic activity and their use. EP1166792 A2.

- Bonnet, F., Lavile, M., 2005. Le syndrome métabolique: définition, épidémiologie, complications. *Spectra Biol.* 145, 27.
- Bouharmont, J., Évrard, C.-M., 2002. Botanique systématique: une perspective phylogénétique. De Boeck université, Paris; Bruxelles.
- Boukef, K., 1986. Les Plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne. ACCT, Agence de Coopér. Culturelle et Technique, Paris.
- Brent Friesen, J., Pauli, G.F., 2005. G.U.E.S.S.-A Generally Useful Estimate of Solvent Systems for CCC. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 28, 2777–2806.
- Brown, G.D., 1998. The biosynthesis of steroids and triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* 15, 653–696.
- Brubaker, P.L., 2012. A Beautiful Cell (or Two or Three?). *Endocrinology* 15(7), 2945–2948.
- Bruggisser, R., von Daeniken, K., Jundt, G., Schaffner, W., Tullberg-Reinert, H., 2002. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med.* 68, 445–448.
- Bruneton, J., 2009. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Éd. Tec & doc ; Éd. médicales internationales, Paris; Cachan.
- Cao, J., Qin, Y., Yin, C., Cheng, Z., 2013. Chemical constituents of *Viola yedoensis* and their antioxidant activity. *Zhongguo Shiyang Fangjixue Zazhi* 19, 77–81.
- Cefalu, W.T., Riddle, M.C., 2015. SGLT2 Inhibitors: The Latest “New Kids on the Block” *Diabetes Care* 38, 352–354.
- Chen, C.-Y., 2004. Substituent chemical shift of rhamnosides from the stems of *Cinnamomum osmophleum*. *Chin. Pharm. J.* 141–146.
- Chen, G., Chen, H., Li, W., Pei, Y.-H., 2011. Steroidal glycosides from *Cynanchum amplexicaule*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 13, 756–760.
- Chen, G., Xu, N., Pei, Y.-H., 2009. C21 steroidal glycosides from *Cynanchum wallichii* Wight. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 11, 177–182.
- Chin, Y.X., Lim, P.E., Maggs, C.A., Phang, S.M., Sharifuddin, Y., Green, B.D., 2014. Anti-diabetic potential of selected Malaysian seaweeds. *J. Appl. Phycol.*
- Choi, E.K., Kim, K.S., Yang, H.J., Shin, M.H., Suh, H.W., Lee, K.B., Ahn, K.S., Um, J.Y., Lee, S.G., Lee, B.C., Jang, H.J., 2012. Hexane fraction of *Citrus aurantium* L. stimulates glucagon-like peptide-1 (GLP-1) secretion via membrane depolarization in NCI-H716 cells. *Biochip J.* 6, 41–47.
- Choi, S.J., Kim, J.K., Jang, J.M., Shin, K.H., Lim, S.S., 2012. Rapid identification of the α -glucosidase inhibitory compounds from Thunberg’s Geranium (*Geranium thunbergii* Sieb. and Zucc.). *Food Sci. Biotechnol.* 21, 987–996.
- Cornall, L.M., Mathai, M.L., Hryciw, D.H., McAinch, A.J., 2013. Is GPR119 agonism an appropriate treatment modality for the safe amelioration of metabolic diseases? *Expert Opin. Investig. Drugs* 22, 487–498.
- Coste, H., 1937. Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse et des contrées limitrophes. Albert Blanchard, Paris.
- Dao, T.-M.A., Waget, A., Klopp, P., Serino, M., Vachoux, C., Pechere, L., Drucker, D.J., Champion, S., Barthélemy, S., Barra, Y., Burcelin, R., Séré, E., 2011. Resveratrol Increases Glucose Induced GLP-1 Secretion in Mice: A Mechanism which Contributes to the Glycemic Control. *PLoS ONE* 6, e20700.
- Da-Silva, W.S., Harney, J.W., Kim, B.W., Li, J., Bianco, S.D.C., Crescenzi, A., Christoffolete, M.A., Huang, S.A., Bianco, A.C., 2007. The Small Polyphenolic Molecule Kaempferol Increases Cellular Energy Expenditure and Thyroid Hormone Activation. *Diabetes* 56, 767–776.
- Deacon, C.F., Nauck, M.A., Meier, J., Hücking, K., Holst, J.J., 2000. Degradation of endogenous and exogenous gastric inhibitory polypeptide in healthy and in type 2 diabetic subjects as revealed using a new assay for the intact peptide. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 3575–3581.
- Decourt, P., 1985. La curieuse histoire de la découverte des sulfamides hypoglycémisants. *Hist. Sci. Médicales* 55–61.

- Descoings, B., 1971. Deux *Cynanchum* aphylls (Asclépiadacées) nouveaux de Madagascar. Bull. Société Bot. Fr. 118, 105–111.
- Diakogiannaki, E., Gribble, F.M., Reimann, F., 2012. Nutrient detection by incretin hormone secreting cells. Physiol. Behav. 106.
- Ding, H.-Y., Chang, T.-S., Shen, H.-C., Tai, S.S.-K., 2011. Murine tyrosinase Inhibitors from *Cynanchum bungei* and evaluation of in vitro and in vivo depigmenting activity. Exp. Dermatol. 20, 720–724.
- Drucker, D.J., 2007. The role of gut hormones in glucose homeostasis. J. Clin. Invest. 117, 24–32.
- Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., 2005. The metabolic syndrome. The Lancet 365, 1415–1428.
- El-Demerdash, A., Dawidar, A., M., Keshk, E., M., Abdel-Mogib, M., 2009. Coumarins from *Cynanchum acutum* Rev. Latinoamer. Quím. 37, 65–69.
- Elrick, H., Stimmler, L., Hlad, C.J., Arai, Y., 1964. Plasma Insulin Response to Oral and Intravenous Glucose Administration. J. Clin. Endocrinol. Metab. 24, 1076–1082.
- EMA, 2013. Résumé EPAR à l'intention du public pour la canagliflozine EMA/744627/2013.
- EMA, 2012. Résumé EPAR à l'intention du public pour la dapagliflozine EMA/280091/2012.
- Emery, E.C., Diakogiannaki, E., Gentry, C., Psichas, A., Habib, A.M., Bevan, S., Fischer, M.J., Reimann, F., Gribble, F.M., 2014. Stimulation of glucagon-like peptide-1 secretion downstream of the ligand-gated ion channel TRPA1. Diabetes 64(4), 1202–10.
- Endress, M.E., Bruyns, P.V., 2000. A revised classification of the Apocynaceae s.l. Bot. Rev. 66, 1–56.
- Everard, A., Cani, P.D., 2014. Gut microbiota and GLP-1. Rev. Endocr. Metab. Disord. 15, 189–196.
- Ezcurra, M., Reimann, F., Gribble, F.M., Emery, E., 2013. Molecular mechanisms of incretin hormone secretion. Curr. Opin. Pharmacol. 13, 922–927.
- Ezuruike, U.F., Prieto, J.M., 2014. The use of plants in the traditional management of diabetes in Nigeria: Pharmacological and toxicological considerations. J. Ethnopharmacol. 155, 857–924.
- Fang, S.-H., Rao, Y.K., Tzeng, Y.-M., 2008. Anti-oxidant and inflammatory mediator's growth inhibitory effects of compounds isolated from *Phyllanthus urinaria*. J. Ethnopharmacol. 116, 333–340.
- Fawzy, G.A., Abdallah, H.M., Marzouk, M.S.A., Soliman, F.M., Sleem, A.A., 2008. Antidiabetic and Antioxidant Activities of Major Flavonoids of *Cynanchum acutum* L. (Asclepiadaceae) Growing in Egypt. Z. Naturforschung Sect. C- J. Biosci. 63.
- Fehmann, H.-C., Göke, B., 1997. The Insulinotropic Gut Hormone Glucagon-like Peptide-1. Karger Medical and Scientific Publishers.
- Flock, G.B., Cao, X., Maziarz, M., Drucker, D.J., 2013. Activation of Enteroendocrine Membrane Progesterone Receptors Promotes Incretin Secretion and Improves Glucose Tolerance in Mice. Diabetes 62, 283–290.
- Fotie, J., Bohle, D.S., Leimanis, M.L., Georges, E., Rukunga, G., Nkengfack, A.E., 2006. Lupeol long-chain fatty acid esters with antimalarial activity from *Holarrhena floribunda*. J. Nat. Prod. 69, 62–67.
- Fraser, D., Abu-Saad, K., Abu-Shareb, H., 2001. The relative importance of traditional and “modern” foods for Israeli Negev Bedouins. A population in transition. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 11, 66–69.
- Friedmann, F., 2011. Flore des Seychelles: dicotylédones, 2nd rev ed. ed, Faune et flore tropicales. IRD Éd, Marseille.
- Fu, M.H., Wang, Z.J., Yang, H.J., Maimai, M., Fang, J., Tang, L.Y., Yang, L., 2007. A new C-21-steroidal glycoside from *Cynanchum stauntonii*. Chin. Chem. Lett. 18, 415–417.
- Gallo, M.B.C., Sarachine, M.J., 2009. Biological Activities of Lupeol. Int. J. Biomed. Pharm. Sci. 3, 44–46.
- Garcia, V.P., 2011. Acid epimerization of 20-keto pregnane glycosides is determined by 2D-NMR spectroscopy. J. Biomol. Nmr 50, 91–97.
- Genet, C., Strehle, A., Schmidt, C., Boudjelal, G., Lobstein, A., Schoonjans, K., Souchet, M., Auwerx, J., Saladin, R., Wagner, A., 2010. Structure-Activity Relationship Study of Betulinic Acid, A Novel and Selective TGR5 Agonist, and Its Synthetic Derivatives: Potential Impact in Diabetes. J. Med. Chem. 53, 178–190.

- Geoffroy, P., Ressault, B., Marchioni, E., Miesch, M., 2011. Norrish–Prins reaction as a key step in the synthesis of 14 β -hydroxy-5 α (or 5 β or Δ 5,6)-pregnane derivatives. *Steroids* 76, 1166–1175.
- Girault, L., 1984. Kallawaya, guérisseurs itinérants des Andes: recherches sur les pratiques médicales and magiques, Collection Mémoires. ORSTOM, Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération : Diffusion L'Harmattan, Paris.
- Gohar, A.A., Elmazar, M.M.A., 1997. Isolation of hypotensive flavonoids from *Chenopodium* species growing in Egypt. *Phytother. Res.* 11, 564–567.
- Grabley, S., Thiericke, R., 1999. Bioactive agents from natural sources: trends in discovery and application. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 64, 101–154.
- Harlev, E., Nevo, E., Mirsky, N., Ofir, R., 2013. Antidiabetic Attributes of Desert and Steppic Plants: A Review. *Planta Med.*
- Harrigan, R.A., Nathan, M.S., Beattie, P., 2001. Oral agents for the treatment of type 2 diabetes mellitus: Pharmacology, toxicity, and treatment. *Ann. Emerg. Med.* 38, 68–78.
- Harteneck, C., 2013. Pregnenolone Sulfate: From Steroid Metabolite to TRP Channel Ligand. *Molecules* 18, 12012–12028.
- Hlebowicz, J., Hlebowicz, A., Lindstedt, S., Bjoergell, O., Hoeglund, P., Holst, J.J., Darwiche, G., Almer, L.-O., 2009. 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.* 89, 815–821.
- Hostettmann, K., Marston, A., 1995. Saponins, Chemistry and pharmacology of natural products. Cambridge University Press, Cambridge ; New York.
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., Spiegelman, B.M., 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87–91.
- Hou, L., Zhou, B., Yang, L., Liu, Z.-L., 2004. Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by flavonols and their glycosides. *Chem. Phys. Lipids* 129, 209–219.
- Howland, M.J.M., Richard A. Harvey, Pamela C. Champe Richard D., 2006. By Richard D. Howland - Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology: 3rd (third) Edition, Third Edition edition. ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Huang, T., Lu, K.-N., Pai, Y.-P., Chin Hsu, Huang, C., 2013. Role of GLP-1 in the Hypoglycemic Effects of Wild Bitter Gourd. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2013.
- Hussein, G.M.E., Matsuda, H., Nakamura, S., Hamao, M., Akiyama, T., Tamura, K., Yoshikawa, M., 2011. Mate Tea (*Ilex paraguariensis*) Promotes Satiety and Body Weight Lowering in Mice: Involvement of Glucagon-Like Peptide-1. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 1849–1855.
- Iaderets, V.V., Andriushina, V.A., Bartoshevich, I.E., Domracheva, A.G., Novak, M.I., Stytsenko, T.S., Voishvillo, N.E., 2007. A study of steroid hydroxylation activity of *Curvularia lunata* mycelium. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 43, 695–700.
- InVS, 2009. Etude ENTRED 2007-2010.
- Jagan Mohan Rao, L., Yada, H., Ono, H., Yoshida, M., 2002. Acylated and Non-Acylated Flavonol Monoglycosides from the Indian Minor Spice Nagkesar (*Mammea longifolia*). *J. Agric. Food Chem.* 50, 3143–3146.
- Jayaprakasha, G.K., Ohnishi-Kameyama, M., Ono, H., Yoshida, M., Jaganmohan Rao, L., 2006. Phenolic Constituents in the Fruits of *Cinnamomum zeylanicum* and Their Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* 54, 1672–1679.
- Jiang, Y., Choi, H.G., Li, Y., Park, Y.M., Lee, J.H., Kim, D.H., Son, J.K., Na, M., Lee, S.H., 2011. Chemical Constituents of *Cynanchum wilfordii* and the Chemotaxonomy of Two Species of the Family Asclepiadaceae, *C. wilfordii* and *C. auriculatum*. *Arch. Pharm. Res.* 34, 2021–2027.
- Kanchanapoom, T., Kasai, R., Ohtani, K., Andriantsiferana, M., Yamasaki, K., 2002. Pregnane and pregnane glycosides from the Malagasy plant, *Cynanchum aphyllum*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 50, 1031–1034.

- Karan, S.K., Mondal, A., Mishra, S.K., Pal, D., Rout, K.K., 2013. Antidiabetic effect of *Streblus asper* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharm. Biol.* 51, 369–375.
- Kawanishi, S., Sakuma, S., Shoji, J., 1972. Constituents of Chinese Crude Drug “Wujiapi.” V. On the Structure of Glycoside H₁ of Bei-Wujiapi. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 20, 469–475.
- Kazuma, K., Noda, N., Suzuki, M., 2003. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry* 62, 229–237.
- Kim, K., Park, M., Lee, Y.M., Rhyu, M.R., Kim, H.Y., 2014. Ginsenoside metabolite compound K stimulates glucagon-like peptide-1 secretion in NCI-H716 cells via bile acid receptor activation. *Arch. Pharm. Res.* 37, 1193–1200.
- Kim, K.-S., Egan, J.M., Jang, H.-J., 2014. Denatonium induces secretion of glucagon-like peptide-1 through activation of bitter taste receptor pathways. *Diabetologia* 57, 2117–2125.
- Kimura, M., Hayashi, K., Narita, H., Mitsuhashi, H., 1982. Studies on the Constituents of Asclepiadaceae Plants. LI. Oxidation at the 18-Methyl Group of C/D-cis-Pregnane Type Steroids and ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance Spectra of 18-Oxygenated Pregnanes and Related Compounds. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 30, 3932–3941.
- Kim, Y.S., Jung, D.H., Lee, I.S., Choi, S.-J., Yu, S.Y., Ku, S.-K., Kim, M.-H., Kim, J.S., 2013. Effects of *Allium victorialis* leaf extracts and its single compounds on aldose reductase, advanced glycation end products and TGF-β1 expression in mesangial cells. *BMC Complement. Altern. Med.* 13, 251.
- Konda, Y., Toda, Y., Takayanagi, H., Ogura, H., Harigaya, Y., Lou, H., Li, X., Onda, M., 1992. A New Modified Steroid, Hancopregnane, and a New Monoterpene from *Cynanchum hancockianum*. *J. Nat. Prod.* 55, 1118–1123.
- Kreis, W., Mller-Uri, F., 2010. Biochemistry of Sterols, Cardiac Glycosides, Brassinosteroids, Phytoecdysteroids and Steroid saponins, in: Wink, M. (Ed.), *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp. 304–363.
- Kweyu, P.L., Wanjala, C.C., Bii, C., Akenga, T.A., 2008. Antimicrobial marine natural products from the sponge, *Axinella infundibuliformis*. *Rec. Nat. Prod.* 2, 116–127.
- Lancaster, R.W., Karamertzanis, P.G., Hulme, A.T., Tocher, D.A., Lewis, T.C., Price, S.L., 2007. The polymorphism of progesterone: Stabilization of a “disappearing” polymorph by co-crystallization. *J. Pharm. Sci.* 96, 3419–3431.
- Lavault, M., Richomme, P., Bruneton, J., 1999. Acetophenones and new pregnane glycosides from the roots of *Vincetoxicum hirundinaria*. *Fitoterapia* 70, 216–220.
- Lee, H.-I., Guo, J.-H., Wu, C.-C., Ti, M.-C., Lan, K.-P., Hu, C.-Y., Lo, C.-Y., Yang, C.-C., Lin, Y.-F., Wang, T.-C., 2011. Anti-inflammatory effects of *Cynanchum taiwanianum* rhizome aqueous extract in IL-1 beta beta-induced NRK-52E cells. *Pharm. Biol.* 49, 437–444.
- Lee-Juan, L., Long-Ze, L., Gil, R.R., Cordelly, G.A., Ramesh, M., Srilatha, B., Reddy, B., Rao, A.V.N.A., 1994. Pregnane glycosides from *Caralluma umbellata*. *Phytochemistry, The international journal of plant biochemistry* 35, 1549–1553.
- Lee, K.Y., Yoon, J.S., Kim, E.S., Kang, S.Y., Kim, Y.C., 2005. Anti-acetylcholinesterase and anti-amnesic activities of a pregnane glycoside, cynatroside B, from *Cynanchum atratum*. *Planta Med.* 71, 7–11.
- Lee, Y.C., Asa, S.L., Drucker, D.J., 1992. Glucagon gene 5′-flanking sequences direct expression of simian virus 40 large T antigen to the intestine, producing carcinoma of the large bowel in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 267, 10705–10708.
- Lefèbvre, P., 2005. Diabetes yesterday, today and tomorrow. The action of the International Diabetes Federation [Le diabète hier, aujourd’hui and demain: L’action de la Fédération Internationale du Diabète]. *Rev. Med. Liege* 60, 273–277.
- Le Nevé, B., Foltz, M., Daniel, H., Gouka, R., 2010. The steroid glycoside H.g.-12 from *Hoodia gordonii* activates the human bitter receptor TAS2R14 and induces CCK release from HuTu-80 cells. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 299, G1368–G1375.

- Li, X., Sun, H., Ye, Y., Chen, F., Tu, J., Pan, Y., 2006. Four new immunomodulating steroidal glycosides from the stems of *Stephanotis mucronata*. *Steroids* 71, 683–690.
- Liede, S., Täuber, A., 2002. Circumscription of the Genus *Cynanchum* (Apocynaceae-Asclepiadoideae). *Syst. Bot.* 27, 789–800.
- Lindemann, P., Luckner, M., 1997. Biosynthesis of pregnane derivatives in somatic embryos of *Digitalis lanata*. *Phytochemistry* 46, 507–513.
- Li, P.-B., Lin, W.-L., Wang, Y.-G., Peng, W., Cai, X.-Y., Su, W.-W., 2012. Antidiabetic activities of oligosaccharides of *Ophiopogon japonicus* in experimental type 2 diabetic rats. *Int. J. Biol. Macromol.* 51, 749–755.
- Liu, C., Hu, M., Zhang, M., Li, F., Li, J., Zhang, J., Li, Y., Guo, H., Xu, P., Liu, L., Liu, X., 2014. Association of GLP-1 secretion with anti-hyperlipidemic effect of ginsenosides in high-fat diet fed rats. *Metabolism* 63, 1342–1351.
- Liu, Y., Qu, J., Yu, S.-S., Hu, Y.-C., Huang, X.-Z., 2007. Seven new steroidal glycosides from the roots of *Cynanchum forrestii*. *Steroids* 72, 313–322.
- Lorenz, G., A., Carraminana, A.C., Primo, Y.E., 1958. New glycosides of *Digitalis thapsi*. *An. Real Soc. Espanola Fis. Quimica* 761–74.
- Lucetti, D.L., Lucetti, E.C., Bandeira, M., Veras, H.N., Silva, A.H., Leal, L., Lopes, A.A., Alves, V.C., Silva, G.S., Brito, G., Viana, G.B., 2010. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. *J. Inflamm.* 7, 60.
- Luft, R., 1989. Oskar Minkowski: Discovery of the pancreatic origin of diabetes, 1889. *Diabetologia* 32, 399–401.
- Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970. The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag.
- MacLean, D.B., Luo, L.-G., 2004. Increased ATP content/production in the hypothalamus may be a signal for energy-sensing of satiety: studies of the anorectic mechanism of a plant steroidal glycoside. *Brain Res.* 1020, 1–11.
- Mahato, S.B., Kundu, A.P., 1994. ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features. *Phytochemistry* 37, 1517–1575.
- Ma, L.-F., Shan, W.-G., Zhan, Z.-J., 2011. Polyhydroxypregnane Glycosides from the Roots of *Cynanchum otophyllum*. *Helv. Chim. Acta* 94, 2272–2282.
- Menezes, F. de S., Minto, A.B.M., Ruela, H.S., Kuster, R.M., Sheridan, H., Frankish, N., 2007. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. *Rev. Bras. Farmacogn.* 17, 8–13.
- Meve, U., Liede, S., 2002. Floristic Exchange between Mainland Africa and Madagascar: Case Studies in Apocynaceae-Asclepiadoideae. *J. Biogeogr.* 29, 865–873.
- Meve, U., Liede, S., 1994. *Cynanchum crassipedicellatum* (Asclepiadaceae), a New and Unusual Succulent from Madagascar. *Novon* 4, 276–279.
- Morikawa, T., Ninomiya, K., Zhang, Y., Yamada, T., Nakamura, S., Matsuda, H., Muraoka, O., Hayakawa, T., Yoshikawa, M., 2012. Flavonol glycosides with lipid accumulation inhibitory activity from *Sedum sarmentosum*. *Phytochem. Lett.* 5, 53–58.
- Mulinacci, N., Vincieri, F.F., Baldi, A., Bambagiotti-Alberti, M., Sendl, A., Wagner, H., 1995. Flavonol glycosides from *sedum telephium* subspecies maximum leaves. *Phytochemistry* 38, 531–533.
- Nathan, D.M., 2006. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Consensus Algorithm for the Initiation and Adjustment of Therapy: A consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 29, 1963–1972.
- Nauck, M.A., Heimesaat, M.M., Orskov, C., Holst, J.J., Ebert, R., Creutzfeldt, W., 1993. 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.* 91, 301–307.
- Negri, G., Santi, D., Tabach, R., 2013. Flavonol glycosides found in hydroethanolic extracts from *Tilia cordata*, a species utilized as anxiolytics. *Rev. Bras. Plantas Med.* 15, 217–224.

- Özçelik, B., Orhan, I., Toker, G., 2006. Antiviral and Antimicrobial Assessment of Some Selected Flavonoids. Z. Für Naturforschung C 61, 632–638.
- Pabreja, K., Mohd, M.A., Koole, C., Wootten, D., Furness, S.G.B., 2014. Molecular mechanisms underlying physiological and receptor pleiotropic effects mediated by GLP-1R activation. Br. J. Pharmacol. 171, 1114–1128.
- Pappachan, J.M., 2014. Incretin-based therapies and pancreatitis risk: myth or reality. Endocrine.
- Park, S., Ahn, I.S., Kim, J.H., Lee, M.R., Kim, J.S., Kim, H.J., 2010. Glyceollins, One of the Phytoalexins Derived from Soybeans under Fungal Stress, Enhance Insulin Sensitivity and Exert Insulinotropic Actions. J. Agric. Food Chem. 58, 1551–1557.
- Patel, A.K., Phulwaria, M., Rai, M.K., Gupta, A.K., Shekhawat, S., Shekhawat, N.S., 2014. *In vitro* propagation and *ex vitro* rooting of *Caralluma edulis* (Edgew.) Benth. & Hook. f.: An endemic and endangered edible plant species of the Thar Desert. Sci. Hortic. 165, 175–180.
- Peng, Y., Ding, Y., Wei, Y., Shu, B., Li, Y., Liu, X., 2011. Caudatin-2,6-dideoxy-3-O-methyl-beta-D-cymaropyranoside 1 induced Apoptosis through Caspase 3-dependent Pathway in Human Hepatoma Cell Line SMMC7721. Phytother. Res. 25, 631–637.
- Peng, Y., Li, Y., Liu, X., Zhang, J., Duan, J., 2008. Antitumor activity of C-21 steroidal glycosides from *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight. Phytomedicine 15, 1016–1020.
- Perley, M.J., Kipnis, D.M., 1967. Plasma Insulin Responses to Oral and Intravenous Glucose: Studies in Normal and Diabetic Subjects*. J. Clin. Invest. 46, 1954–1962.
- Perry, L.M., Metzger, J., 1980. Medicinal plants of East and Southeast Asia: attributed properties and uses. MIT Press, Cambridge.
- Qi, H., Chen, W., Shi, Y., 2010. Chemical composition of *Aralia chinensis* L. and antibacterial activity. Zhongcaoyao 41, 1948–1950.
- Qi, L.-W., Chen, C.-Y., Li, P., 2009. Structural characterization and identification of iridoid glycosides, saponins, phenolic acids and flavonoids in Flos Lonicerae Japonicae by a fast liquid chromatography method with diode-array detection and time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 23, 3227–3242.
- Qiu, S.X., Zhang, Z.X., Yong, L., Zhou, J., 1991. 2 New glycosides from the roots of *Cynanchum versicolor*. Planta Med. 57, 454–456.
- Quesada, I., Tuduri, E., Ripoll, C., Nadal, A., 2008. Physiology of the pancreatic α -cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. J. Endocrinol. 199, 5–19.
- Quoyer, J., Longuet, C., Broca, C., Linck, N., Costes, S., Varin, E., Bockaert, J., Bertrand, G., Dalle, S., 2010. GLP-1 Mediates Antiapoptotic Effect by Phosphorylating Bad through a -Arrestin 1-mediated ERK1/2 Activation in Pancreatic -Cells. J. Biol. Chem. 285, 1989–2002.
- Rafferty, E.P., Wylie, A.R., Elliott, C.T., Chevallier, O.P., Grieve, D.J., Green, B.D., 2011. In Vitro and In Vivo Effects of Natural Putative Secretagogues of Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1). Sci. Pharm. 79, 615–21.
- Ramesh, M., Rao, Y.N., Kumar, M.R., Rao, A.V., Prabhakar, M.C., Reddy, B.M., 1999. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of carumbelloside-I isolated from *Caralluma umbellata*. J. Ethnopharmacol. 68, 349–352.
- Ramm, M., Lobe, M., Hamburger, M., 2003. A simple method for preparation of d-rhamnose. Carbohydrate Research 338, 109–112.
- Rathore, M.S., Rathore, M.S., Shekhawat, N.S., 2013. Ex vivo implications of phytohormones on various in vitro responses in *Leptadenia reticulata* (Retz.) Wight. & An endangered plant. Environ. Exp. Bot. 86, 86–93.
- Rauh, W., 1998. Succulent and xerophytic plants of Madagascar. 2 2. Strawberry Press, Mill Valley [Californie].
- Richter, G., Reymond, G., 1993. Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie. Presses polytechniques et universitaires romandes ; Diff. Tec & Doc Lavoisier, Lausanne; Paris.

- Ripken, D., van der Wielen, N., Wortelboer, H.M., Meijerink, J., Witkamp, R.F., Hendriks, H.F.J., 2014. Steviol Glycoside Rebaudioside A Induces Glucagon-like Peptide-1 and Peptide YY Release in a Porcine ex Vivo Intestinal Model. *J. Agric. Food Chem.* 62, 8365–8370.
- Rouillé, Y., Martin, S., Steiner, D.F., 1995. Differential processing of proglucagon by the subtilisin-like prohormone convertases PC2 and PC3 to generate either glucagon or glucagon-like peptide. *J. Biol. Chem.* 270, 26488–26496.
- Saleem, S., Jafri, L., Haq, I. ul, Chang, L.C., Calderwood, D., Green, B.D., Mirza, B., 2014. Plants *Fagonia cretica* L. and *Hedera nepalensis* K. Koch contain natural compounds with potent dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.* 156, 26–32.
- Santos, F.A., Frota, J.T., Arruda, B.R., Melo, T.S. de, Silva, A.A. de C.A. da, Brito, G.A. de C., Chaves, M.H., Rao, V.S., 2012. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. *Lipids Health Dis.* 11, 98.
- Schaaf, O., Baumgarten, J., Dettner, K., 2000. Identification and Function of Prothoracic Exocrine Gland Steroids of the Dytiscid Beetles *Graphoderus cinereus* and *Laccophilus minutus*. *J. Chem. Ecol.* 26, 2291–2305.
- Scheen, A.J., 2014. A review of gliptins for 2014. *Expert Opin. Pharmacother.* 16, 43–62.
- Scheen, A.J., 2013. [Gliptines: a new fashion?]. *Rev. Prat.* 63, 304–5.
- Schenk, S., Saberi, M., Olefsky, J.M., 2008. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. Clin. Invest.* 118, 2992–3002.
- Schlienger, J.-L., 2013. Complications du diabète de type 2. *Presse Médicale* 42, 839–848.
- Schmelzer, G., 2013. Medicinal plants 2. PROTA Foundation ; CTA [distr.], Wageningen; Wageningen.
- Schwanstecher, M., 2011. Diabetes: Perspectives in Drug Therapy. Springer.
- Shan, L., Liu, R.-H., Shen, Y.-H., Zhang, W.-D., Zhang, C., Wu, D.-Z., Min, L., Su, J., Xu, X.-K., 2006. Gastroprotective effect of a traditional Chinese herbal drug “Baishouwu” on experimental gastric lesions in rats. *J. Ethnopharmacol.* 107, 389–394.
- Shan, W.-G., Liu, X., Ma, L.-F., Zhan, Z.-J., 2012. New polyhydroxypregnane glycosides from *Cynanchum otophyllum*. *J. Chem. Res.*
- Shin, M.-H., Suh, H.-W., Lee, K.-B., Kim, K.-S., Yang, H.J., Choi, E.-K., Cho, Y.J., Song, M.-Y., Ahn, K.S., Jang, H.-J., 2012. *Gentiana scabra* extracts stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via G protein-coupled receptor pathway. *Biochip J.* 6, 114–119.
- Solinas, G., Vilcu, C., Neels, J.G., Bandyopadhyay, G.K., Luo, J.-L., Naugler, W., Grivennikov, S., Wynshaw-Boris, A., Scadeng, M., Olefsky, J.M., Karin, M., 2007. JNK1 in Hematopoietically Derived Cells Contributes to Diet-Induced Inflammation and Insulin Resistance without Affecting Obesity. *Cell Metab.* 6, 386–397.
- Takaya, Y., Kondo, Y., Furukawa, T., Niwa, M., 2003. Antioxidant Constituents of Radish Sprout (Kaiware-daikon), *Raphanus sativus* L. *J. Agric. Food Chem.* 51, 8061–8066.
- Tatsimo, S.J., Tamokou, J.D., Havyarimana, L., Csupor, D., Forgo, P., Hohmann, J., Kuiate, J.-R., Tane, P., 2012. Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. *BMC Res. Notes* 5, 158.
- Tielmans, A., Laloi-Michelin, M., Coupaye, M., Virally, M., Meas, T., Guillausseau, P.-J., 2007a. Traitement médicamenteux du diabète de type 2 (première partie). *Presse Médicale* 36, 269–278.
- Tielmans, A., Virally, M., Coupaye, M., Laloi-Michelin, M., Méas, T., Guillausseau, P.-J., 2007b. Traitement médicamenteux du diabète de type 2 (deuxième partie). *Presse Médicale* 36, 467–474.
- Toker, G., Küpeli, E., Memisoğlu, M., Yesilada, E., 2004a. Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden). *J. Ethnopharmacol.* 95, 393–397.
- Toker, G., MEMİŞOĞLU, M., YEŞİLADA, E., Aslan, M., 2004b. Main flavonoids of *Tilia argentea* DESF. ex DC. leaves. *Turk. J. Chem.* 28, 745–750.

- Tolhurst, G., Zheng, Y., Parker, H.E., Habib, A.M., Reimann, F., Gribble, F.M., 2011. Glutamine Triggers and Potentiates Glucagon-Like Peptide-1 Secretion by Raising Cytosolic Ca²⁺ and cAMP. *Endocrinology* 152, 405–413.
- Tornehave, D., Kristensen, P., Rømer, J., Knudsen, L.B., Heller, R.S., 2008. Expression of the GLP-1 Receptor in Mouse, Rat, and Human Pancreas. *J. Histochem. Cytochem.* 56, 841–851.
- Tschesche, R., Grimmer, G., 1955. Über pflanzliche Herzgifte, XXX. Mitteil.1): Neue Glykoside aus den Blättern von *Digitalis purpurea* und *Digitalis lanata*. *Chem. Ber.* 88, 1569–1576.
- Tselepi, M., Papachristou, E., Emmanouilidi, A., Angelis, A., Aligiannis, N., Skaltsounis, A.-L., Kouretas, D., Liadaki, K., 2011. Catalytic inhibition of eukaryotic topoisomerases I and II by flavonol glycosides extracted from *Vicia faba* and *Lotus edulis*. *J. Nat. Prod.* 74, 2362–2370.
- Tsukamoto, S., Hayashi, K., Mitsunashi, H., 1985. Studies on the constituents of Asclepiadaceae plants. LXII. The structures of two glycosides, cynafoside-A and -B, with a novel sugar chain containing a pair of optically isomeric sugars, D- and L-cymaroses, from *Cynanchum africanum* R. Br. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 33, 4807–4814.
- Tzeng, Y.-M., Chen, K., Rao, Y.K., Lee, M.-J., 2009. Kaempferitrin activates the insulin signaling pathway and stimulates secretion of adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 607, 27–34.
- Unwin, N., International Diabetes Federation, 2011. IDF diabetes atlas. International Diabetes Federation, Brussels.
- Urías-Silvas, J.E., Cani, P.D., Delmée, E., Neyrinck, A., López, M.G., Delzenne, N.M., 2008. Physiological effects of dietary fructans extracted from Agave tequilana Gto. and Dasylirion spp. *British Journal of Nutrition* 99, 254–261.
- Vander, A.J., 2001. Human physiology: the mechanisms of body function, 8th ed. ed. McGraw-Hill, Boston.
- Van Heerden, F.R., 2008. *Hoodia gordonii*: A natural appetite suppressant. *J. Ethnopharmacol.* 119, 434–437.
- Vilsbøll, T., Krarup, T., Deacon, C.F., Madsbad, S., Holst, J.J., 2001. Reduced Postprandial Concentrations of Intact Biologically Active Glucagon-Like Peptide 1 in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes* 50, 609–613.
- Vilsbøll, T., Krarup, T., Madsbad, S., Holst, J.J., 2003. Both GLP-1 and GIP are insulinotropic at basal and postprandial glucose levels and contribute nearly equally to the incretin effect of a meal in healthy subjects. *Regul. Pept.* 114, 115–121.
- Vincentz, F., 2007. *Cynanchum_marnieranum_03_ies.jpg* (Image JPEG, 800 × 700 pixels) [WWW Document]. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/7c/Cynanchum_marnieranum_03_ies.jpg?uselang=fr (accédé le 22.5.15).
- Virally, M., Kevorkian, J.-P., Guillausseau, P.-J., 2008. Incretins, incretinomimetics and DPP-IV inhibitors: glucose homeostasis and type 2 diabetes. *SANG Thromb. Vaiss.* 20, 453–461.
- Vleggaar, R., Heerden, F.R. van, Anderson, L.A.P., Erasmus, G.L., 1993. Toxic constituents of the asclepiadaceae. Structure elucidation of sarcovimiside A-C, pregnane glycosides of *Sarcostemma viminalis*. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* 483–487.
- Wang, L., Sun, J., Horvat, M., Koutalistras, N., Johnston, B., Sheil, A.G.R., 1996. Evaluation of MTS, XTT, MTT and 3HTdR incorporation for assessing hepatocyte density, viability and proliferation. *Methods Cell Sci.* 18, 249–255.
- Warashina, T., Noro, T., 2006. Glycosides of 14,15-seco and 13,14 : 14,15-disecopregnanes from the roots of *Cynanchum subanceolatum*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 54.
- Warashina, T., Noro, T., 2003. Acylated-oxypregnane Glycosides from the Roots of *Araujia sericifera*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 51, 1036–1045.
- Warashina, T., Noro, T., 1997. Steroidal glycosides from roots of *Cynanchum caudatum*. *Phytochemistry* 44, 917–923.
- Watts, M., Sherman, A., 2014. Modeling the pancreatic α -cell: dual mechanisms of glucose suppression of glucagon secretion. *Biophys. J.* 106, 741–751.

- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., Ferrante Jr., A.W., 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112, 1796–1808.
- Wellen, K.E., Hotamisligil, G.S., 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* 115, 1111–1119.
- Xiao, X.-H., Yuan, Z.-Q., Li, G.-K., 2013. Preparation of phytosterols and phytol from edible marine algae by microwave-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography. *Sep. Purif. Technol.* 104, 284–289.
- Xu, Z., Ju, J., Wang, K., Gu, C., Feng, Y., 2014. Evaluation of hypoglycemic activity of total lignans from *Fructus Arctii* in the spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *J. Ethnopharmacol.* 151, 548–555.
- Yabe, D., Seino, Y., 2013. Incretin actions beyond the pancreas: lessons from knockout mice. *Curr. Opin. Pharmacol.*
- Yamasaki, K., Hishiki, R., Kato, E., Kawabata, J., 2011. Study of Kaempferol Glycoside as an Insulin Mimic Reveals Glycon To Be the Key Active Structure. *ACS Med. Chem. Lett.* 2, 17–21.
- Yamashita, Y., Okabe, M., Natsume, M., Ashida, H., 2013. Cinnamtannin A2, a Tetrameric Procyanidin, Increases GLP-1 and Insulin Secretion in Mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 888–891.
- Yamauchi, T., Hara, M., Mihashi, K., 1972. Pregnenolone glucosides of *Nerium odorum*. *Phytochemistry* 11, 3345–3347.
- Yang, Q.-X., Ge, Y.-C., Huang, X.-Y., Sun, Q.-Y., 2011. Cynauriculose C–E, three new antidepressant pregnane glycosides from *Cynanchum auriculatum*. *Phytochem. Lett.* 4, 170–175.
- Yao, S., Liu, R., Huang, X., Kong, L., 2007. Preparative isolation and purification of chemical constituents from the root of *Adenophora tetraphylla* by high-speed counter-current chromatography with evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. A* 1139, 254–262.
- Yeo, H., Choi, Y.H., Kim, J., 2002. New Pregnane Glycosides from *Cynanchum ascyrifolium*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 50, 847–849.
- Yoon, M.-Y., Choi, N.H., Min, B.S., Choi, G.J., Choi, Y.H., Jang, K.S., Han, S.-S., Cha, B., Kim, J.-C., 2011. Potent in Vivo Antifungal Activity against Powdery Mildews of Pregnane Glycosides from the Roots of *Cynanchum wilfordii*. *J. Agric. Food Chem.* 59.
- Yoshikawa, K., Matsuchika, K., Arihara, S., Chang, H.-C., Wang, J.-D., 1998. Pregnane Glycosides, Gymnepregosides A–F from the Roots of *Gymnema alternifolium*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 46, 1239–1243.
- Yoshikawa, K., Matsuchika, K., Takahashi, K., Tanaka, M., Arihara, S., Chang, H.-C., Wang, J.-D., 1999. Pregnane Glycosides, Gymnepregosides G–Q from the Roots of *Gymnema alternifolium*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 47, 798–804.
- Yoshikawa, K., Okada, N., Kan, Y., Arihara, S., 1996. Steroidal Glycosides from the Fresh Stem of *Stephanotis lutchuensis* var. *japonica* (Asclepiadaceae). Chemical Structures of Stephanosides K–Q. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 44, 2243–2248.
- Yu, Y., Liu, L., Wang, X., Liu, X., Xie, L., Wang, G., 2010. Modulation of glucagon-like peptide-1 release by berberine: In vivo and in vitro studies. *Biochem. Pharmacol.* 79, 1000–1006.
- Zhang, S., Ma, Y., Li, J., Ma, J., Yu, B., Xie, X., 2014. Molecular matchmaking between the popular weight-loss herb *Hoodia gordonii* and GPR119, a potential drug target for metabolic disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 14571–14576.
- Zhang, S., Ma, Y., Li, J., Ma, J., Yu, B., Xie, X., 2014. Molecular matchmaking between the popular weight-loss herb *Hoodia gordonii* and GPR119, a potential drug target for metabolic disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 14571–14576.
- Zhang, X., Shan, L., Huang, H., Yang, X.W., Liang, X., Xing, A.T., Huang, H.Q., Liu, X.R., Su, J., Zhang, W.D., 2009. Rapid identification of acetophenones in two *Cynanchum* species using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49, 715–725.
- Zhang, Z., Yao, Y., Wang, N., Wang, J., Wang, Q., Wang, Y., 2011. Chemical composition of aerial parts of *Cynanchum Chinense* R. Br. *Guangpu Shiyanshi* 28, 2566–2569.
- Zheng, K., Zhang, G., Jiang, N., Yang, S., Li, C., Meng, Z., Guo, Q., Long, G., 2014. Analysis of the transcriptome of *Marsdenia tenacissima* discovers putative polyoxypregnane glycoside biosynthetic genes and genetic markers. *Genomics* 104, 186–193.
- Zimmet, P., Alberti, K., Shaw, J., 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414, 782–787.

Recherche de sécrétagogues naturels du GLP-1: exploration du potentiel antidiabétique d'espèces du genre *Cynanchum* (Apocynaceae).

Dans le cadre de la recherche de composés pouvant stimuler la sécrétion de l'hormone hypoglycémiant GLP-1 (*glucagon-like-peptide 1*) et sur des critères ethno-pharmacologiques et taxonomiques, différentes Asclepiadoïdées ont été criblées sur un modèle cellulaire (lignée STC-1). Cette approche nous a permis de sélectionner deux espèces de *Cynanchum* malgaches.

L'isolement bio-guidé de *C. marnierianum* a conduit à la purification de 2 nouveaux glycosides prégnaniques, les marnieranosides. L'exploration phytochimique de *C. menarandrense* a permis l'identification de 5 nouvelles structures prégnaniques et de 2 prégnanes déjà signalés dans un genre taxonomiquement proche et hypoglycémiant : *Caralluma*.

Les prégnanes purifiés ont aussi été évalués pour leur effet sécrétagogue GLP-1 et cytotoxique mais seuls les marnieranosides se sont avérés bioactifs. Des analogies structurales entre les molécules identifiées dans le genre *Cynanchum* et des molécules bioactives isolées au préalable d'espèces antidiabétiques (genres *Hoodia* et *Caralluma*) valident notre stratégie pour la découverte des métabolites secondaires avec un potentiel antidiabétique.

Mots clefs : Asclépiadoïdées, *Cynanchum marnierianum*, *Cynanchum menarandrense*, glycosides prégnaniques, diabète de type 2, incrétine, STC-1, P57, triterpènes, flavonoïdes, MTT, MTS, cytométrie

In the framework of our search for antidiabetic compounds capable of stimulating the secretion of the hypoglycemic hormone GLP-1 (glucagon-like-peptide 1), based on ethnopharmacological and taxonomic criteria, several Asclepiadoideae plants were screened with an *in vitro* model (STC-1 cell line). This approach led to the selection of two Malagasy *Cynanchum* species.

Bio-guided fractionation of *C. marnierianum* led to the purification of two new pregnane glycosides named marnieranosides. The phytochemical study of *C. menarandrense* led to the identification of 5 new pregnane structures along with 2 pregnanes previously reported in the closely related and hypoglycemic *Caralluma* genus.

The isolated pregnanes were evaluated for their GLP-1 secretagogue and cytotoxic activity but only the marnieranosides were proven bioactive. Structural similarities of the *Cynanchum* pregnanes with the ones previously isolated from antidiabetic plants (*Hoodia* and *Caralluma*), validated our approach for the discovery of secondary metabolites with antidiabetic potential.

Keywords : Asclepiadoideae, *Cynanchum marnierianum*, *Cynanchum menarandrense*, pregnane glycosides, type 2 diabetes, Incretin, STC-1 cell-line, P57, triterpenes, flavonoids, MTT, MTS, cytometry