

De la tradition à l'innovation : recherche de nouvelles molécules thérapeutiques pour le traitement du diabète

par Didier Tousch

Centre de Pharmacologie et Innovation dans le Diabète, Université Montpellier 1, UMR 5232 CNRS, Faculté de pharmacie, 15, avenue Charles Flahault, BP 14491, 34093 Montpellier Cedex 5 (France).
E-mail : didier.tousch@univ-montp1.fr

Reçu le 11 avril 2007

RÉSUMÉ

Les plantes sont toujours une source inépuisable de nouvelles substances à potentialité thérapeutique. Les nombreux laboratoires qui aujourd'hui se consacrent à cette thématique font le choix de plantes modèles objectivées par des données ethnopharmacologiques.

C'est ainsi que plusieurs milliers d'espèces végétales sont connues pour leur vertu antidiabétique. Le

CPID (Centre de Pharmacologie et Innovation dans le Diabète) propose un programme technologique innovant qui consiste à réaliser une chimiothèque de fractions à partir d'une collection de plantes méditerranéennes antidiabétiques puis à faire le criblage pharmacologique de ces dernières grâce à des tests physiologiques fonctionnels sur des cellules en culture.

SUMMARY From tradition to innovation: the search for novel therapeutic molecules to treat diabetes

There are over a hundred chemical substances that have been derived from plants for use as drugs and medicines; many more await and medicinal plants are the target of all the attention. The structural diversity of natural products still surpasses that from synthetic compounds and is far beyond any imagination of experts in the field. For many pharmaceutical companies, it is a good argument to investigate natu-

ral compounds. Many plants with antidiabetic virtues are known in traditional medicine over the world. The CPID (Centre de Pharmacologie et Innovation dans le Diabète) proposes a technology program to purify new natural antidiabetic substances. A large antidiabetic plant library is constructed for a high-throughput pharmacological screening with cell cultures.

INTRODUCTION

Depuis toujours, l'Homme pour se soigner a eu recours aux vertus médicinales des plantes. La richesse de la littérature dans le domaine démontre l'importance accordée par nos aînés aux plantes médicinales ; les plus anciens manuscrits datent d'environ 2200 av. J.-C. Les connaissances à la fois des plantes et de leurs vertus médicinales se sont transmises jusqu'à nous, époque après époque, génération après génération. Cependant, l'époque moderne, tournée vers le « pragmatisme de la Science », a largement privilégié la toute puissance des principes actifs purs ; peu à peu les soins par les plantes sont abandonnés pour une approche allopathique. La spectaculaire évolution des connaissances en chimie au début du XX^{ème} siècle a conduit au développement de la chimie de synthèse puis de la chimie combinatoire qui a engendré d'énormes chimiothèques, réserves de plusieurs milliers de molécules toutes potentiellement actives ; il en découlera une désaffection pour la chimie extractive à partir des plantes devenue trop complexe

aux yeux des pharmacologues. Pourtant depuis quelques années renaît l'attrait pour les produits naturels et, de fait, la recherche de nouveaux médicaments d'origine végétale s'intensifie ; la plante est à nouveau considérée comme une source d'innovation dans le domaine du médicament, une source inépuisable de molécules complexes et variées.

DE LA PHYTOTHÉRAPIE ET LA MÉDECINE TRADITIONNELLE À L'ISOLEMENT DES PRINCIPES ACTIFS

La phytothérapie qui signifie traitement par les plantes est une pratique millénaire basée sur un savoir empirique qui s'est transmis et enrichi au fil des générations. Dans son *corpus hippocraticum* (moins de 400 ans avant J.-C.) Hippocrate, qui a consacré une large partie de sa vie à l'étude et l'utilisation thérapeutique des plantes, traite d'environ 250 « simples » : plantes à usage médicinales. Le précieux *De Materia Medica* de Dioscoride

(1^{er} siècle), successeur spirituel d'Hippocrate, décrit environ 600 « simples ». Ce manuscrit restera l'ouvrage de référence en matière de plantes médicinales durant de nombreux siècles. Au Moyen-Âge, les drogues ou préparations médicamenteuses à partir de plantes étaient largement pratiquées et enseignées dans les monastères. Se trouvait toujours dans l'enceinte de ces derniers un jardin appelé *herbularius*, où étaient cultivées et récoltées les « simples » (Volák & Stodola, 1983 ; Le Jeune, 2006).

La phytothérapie s'est pratiquée jusqu'au début du XX^{ème} siècle, les praticiens se consacraient alors par une approche holistique aux effets de la plante dans sa globalité, et sur tout l'individu. Les préparations médicamenteuses, les « drogues » d'antan étaient obtenues par quelques techniques simples permettant d'extraire une partie des substances de la plante : ce sont des décoctions, des infusions, des macérations, des distillations, etc. Les extraits sont proposés sous la forme de décoctions, de tisanes, d'onguents, d'huiles essentielles, de teintures, etc. (Volák & Stodola, 1983). Les phytothérapeutes ont consacré une grande partie de leur activité à décrire les effets des « drogues » sur les symptômes de chaque pathologie. La pharmacologie prendra naissance à la fin du XIX^{ème} siècle lorsqu'entre autres la purification des substances actives est devenue possible (Landry & Gies, 2003). C'est par exemple en 1825 que Fontana, un pharmacien italien isole à partir d'écorce de saule blanc (*Salix alba*) l'acide salicylique plus connu sous la dénomination d'aspirine qui est probablement le médicament le plus utilisé au monde. Le saule n'était pas un choix fortuit puisque déjà les Sumériens (il y a plus de 4 000 ans) utilisaient les feuilles de saule comme antidouleur puis, vers l'an 400 avant J.-C., Hippocrate préconisait une préparation à partir d'écorce de saule blanc pour soulager les douleurs de l'accouchement et faire baisser la fièvre. L'acide salicylique est alors utilisée pour traiter les fièvres, les douleurs, les rhumatismes articulaires. C'est en 1887 que Hoffmann, chimiste allemand, trouve le moyen d'obtenir de l'acide acétyl salicylique de synthèse presque pur (Fig. 1).

Ainsi, l'extraction des principes actifs à partir des végétaux a permis de confirmer la justesse de nombreuses observations empiriques des anciens. Vingt-cinq pour cent des médicaments modernes sont issus de plantes qui ont, au départ, été utilisées traditionnellement.

À partir des années 1970, un essor considérable des techniques biochimiques conduira à la connaissance des voies de signalisation cellulaire et plus particulièrement à la structure des récepteurs, souvent les cibles des médicaments. La technologie de l'ADN recombinant permet de réaliser la synthèse *in vitro* de ces molécules de nature protéique. Le criblage moléculaire « haut débit » de chimiothèques (vastes collections de molécules pures) permet alors la mise en évidence des molécules affines pour nos cibles. Cette approche dite « massive » n'a de limite que le nombre de cibles connues et c'est l'enjeu aujourd'hui de la génomique de découvrir de nouvelles cibles pour les grandes pathologies humaines.

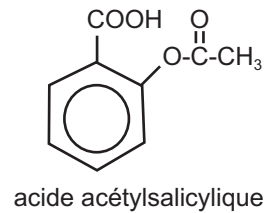
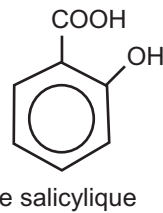
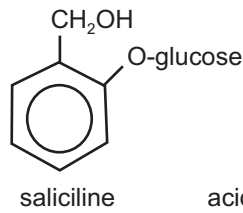
Une démarche alternative est-elle possible ? Le Centre de Pharmacologie et Innovation dans le Diabète (CPID) propose une démarche innovante pour la recherche de nouvelles molécules antidiabétiques d'origine végétale.

Aujourd'hui encore de nombreux pays en voie de développement, souvent trop pauvres pour s'approvisionner en médicaments coûteux, ont recours à la médecine traditionnelle. En Afrique, jusqu'à 80 % de la population a recours à la médecine traditionnelle, et les chiffres sont très comparables en Asie et en Amérique latine. Un nouvel engouement des pays industrialisés pour la phytothérapie est à noter. C'est pourquoi, de nombreux laboratoires de recherche s'intéressent à nouveau aux vertus des plantes. L'ethnopharmacologie qui repose essentiellement sur la collecte de données et de témoignages sur le terrain a permis de révéler des espèces végétales aux vertus médicinales originales ; les chercheurs sont allés à la rencontre de peuples dits « primitifs », ethnies et tribus qui ont encore largement recours aux plantes médicinales pour se soigner. Les enquêtes menées ont permis d'associer des préparations médicamenteuses et des pathologies traitées, ainsi que d'identifier les plantes à l'origine de ces préparations. L'ethnopharmacologie a pour autant ses limites, notamment le ressenti plutôt négatif des pays et des personnes interrogés, qui voient dans cette démarche un pillage culturel (Desclaux & Lévy, 2003).

Depuis de nombreuses années, le CPID (Centre de Pharmacologie et Innovation dans le Diabète) à Montpellier tente d'identifier de nouveaux principes actifs à partir de plantes réputées antidiabétiques.

Le diabète constitue un problème de santé publique considérable avec un nombre de malades de plus en plus important (l'OMS estime à 300 millions le nombre de diabétiques d'ici 2025) et par conséquent son poids économique est de plus en plus élevé (Eschwège *et al.*, 1998). Le diabète de type 2, diabète non insulino-dépendant largement prépondérant par rapport au type 1 (insulino-dépendant), est défini par une hyperglycémie chronique due à une altération de la sécrétion d'insuline associée à un phénomène d'insulino-résistance des tissus périphériques (musculaire et adipeux) et du foie, c'est-à-dire un déficit de l'action de l'insuline sur les tissus cibles (DeFronzo, 1988). Les médecins disposent actuellement d'un arsenal limité de médicaments pour soigner ces dysfonctionnements. Les principaux antidiabétiques oraux actuellement prescrits sont : les sulfamides hypoglycémisants et glinides qui sont insulino-stimulants, un biguanide (la metformine) et les thiazolidinediones qui sont insulino-sensibilisateurs, les inhibiteurs des α -glucosidases intestinales qui limitent l'absorption digestive du glucose. Aucun de ces médicaments n'est idéal. Il est donc important de rechercher de nouvelles molécules antidiabétiques visant à réduire l'insulino-résistance et/ou à amplifier de façon glucose dépendante la sécrétion d'insuline.

C'est ainsi qu'en 1992, l'équipe du CPID a isolé la 4-hydroxyisoleucine à partir de la graine de fenugrec (Broca *et al.*, 1999). Gérard Ribes et Yves Sauvaire à l'initiative de cette recherche ont privilégié une démarche



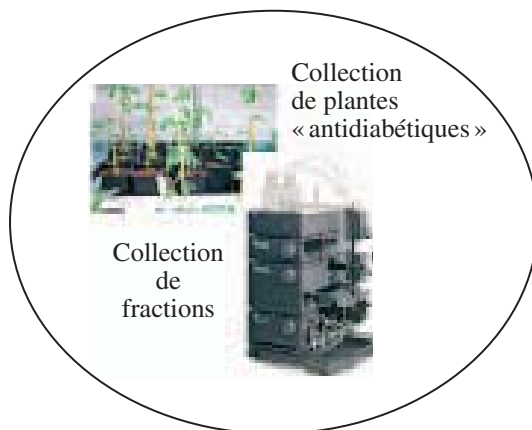
A

B

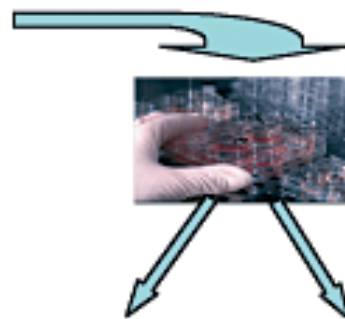
FIG. 1. – Illustration de la plante médicinale réputée antidouleur, le saule (*Salix alba*) (www.ping.be/~ping6998/image/asp-salix.jpg) (A) et de la molécule pure active analgésique, l'aspirine ou l'acide 2-(acétyloxy)benzoïque ou encore acide acétylsalicylique (B).



FIG. 2. – Culture de fenugrec, légumineuse qui produit des gousses chargées de graines connues pour leur vertu antidiabétique.



Phytochimie



Criblage sur tests fonctionnels

Test de sécrétion d'insuline sur des cellules β en culture

Test de captation du glucose sur des myocytes en culture

FIG. 3. – Programme technologique « bioressource et biomolécules » du CPID dont l'objectif est de rechercher de nouvelles molécules végétales antidiabétiques.

ethnopharmacologique. Ainsi, ils ont pu croiser de nombreuses informations sur une plante herbacée, le fenugrec (*Trigonella foenum-graecum* L.) (Fig. 2) qui pousse communément sur l'ensemble du pourtour méditerranéen et dont les graines sont utilisées dans les pays du Maghreb pour la préparation d'infusions réputées antidiabétiques. En séparant étape par étape les constituants de la graine et en les testant sur l'animal, ils ont isolé ainsi la 4-hydroxyisoleucine dont les propriétés antidiabétiques originales ont donné lieu à une valorisation et à un droit d'exploitation par la société Innodia Inc. Cette molécule est actuellement en fin de phase 2 des essais cliniques.

Actuellement, notre laboratoire développe un programme technologique nommé « bioressource et biomolécules » qui consiste à isoler de nouvelles substances potentiellement antidiabétiques à partir de nombreux extraits de plantes réputées antidiabétiques (Bailey & Day, 1989) (Fig. 3). Cette démarche systématisée se structure en deux axes : d'une part la gestion et la production d'une bioressource et d'autre part la réalisation de criblages sur tests fonctionnels. Le premier axe, en relation étroite avec le Jardin Botanique de Roquebrun a conduit, depuis deux ans, à la création d'une collection d'une centaine de plantes méditerranéennes à partir de laquelle est créée une collection de fractions suivant un protocole normalisé qui permet l'obtention de mélanges moléculaires peu complexes. Le deuxième axe du programme consiste à mettre au point une approche méthodologique afin de tester des mélanges moléculaires ou des molécules pures pour leurs activités antidiabétiques potentielles. À cette fin nous avons mis en place des

tests fonctionnels qui permettent d'évaluer des réponses pharmacologiques biologiquement pertinentes sur des cultures cellulaires sans préjuger d'un mode d'action particulier de ces molécules. Les effets observés seront ensuite confirmés et validés sur des modèles *in vivo* pour lesquels le laboratoire a un savoir faire reconnu par la communauté scientifique.

Deux tests fonctionnels sont actuellement utilisés.

Le premier consiste à explorer le potentiel insulino-stimulant des substances ou fractions obtenues (lutte contre l'altération de la sécrétion d'insuline). Pour cela, nous disposons d'une lignée de cellules β sensibles au glucose, issue d'insulinome de rat (INS1), sur laquelle nous mesurons la sécrétion d'insuline (Sekine *et al.*, 1997). Un tel criblage, réalisé sur un nombre raisonnable de fractions, a nécessité la mise au point d'un système de quantification rapide et fiable de la concentration d'insuline. Cette méthode de dosage par la technologie FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) a été développée dans le cadre d'une collaboration avec la société Cisbio International. Les fractions ayant un effet insulino-stimulant potentiel sont ensuite testées sur des modèles physiologiques de plus en plus intégrés, le modèle le plus abouti étant l'étude *in vivo* sur des rats normaux ou diabétiques. Ainsi, nous avons récemment mis en évidence l'activité insulino-stimulante d'une substance végétale originale (SAT2) (Fig. 4). Cette découverte a fait l'objet d'un dépôt de brevet (Tousch *et al.*, 2006).

Le deuxième test fonctionnel vise à révéler des substances susceptibles d'agir sur la résistance des tissus périphériques à l'action de l'insuline. L'insuline est un puissant anabolisant qui permet la captation cellulaire

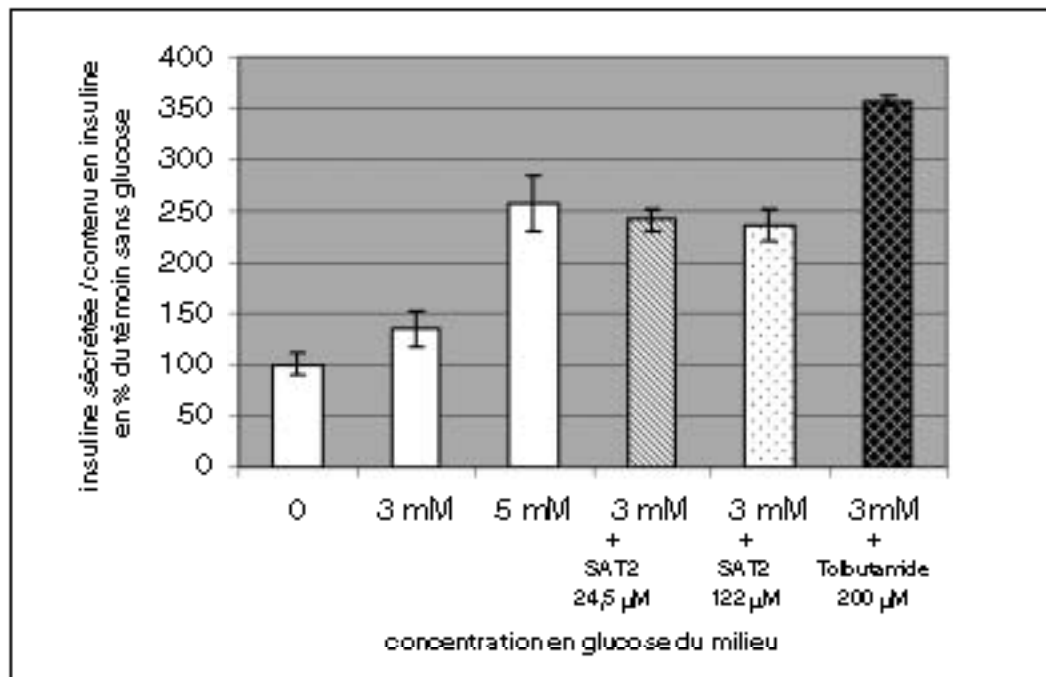


FIG. 4. – Stimulation de la sécrétion d'insuline de la lignée INS1 d'insulinome de rat en présence ou non de la molécule pure (SAT2).

de glucose dans un certain nombre de tissus hormone-sensibles. Elle joue un rôle essentiel, notamment pendant la période post-prandiale où elle permet la captation rapide du glucose par le tissu musculaire et le foie. Parmi les dysfonctionnements majeurs qui conduisent au diabète de type 2, l'insulino-résistance qui est une diminution importante de la réponse des tissus cibles à l'action de l'insuline, est une des cibles majeures pour le développement de nouvelles substances antidiabétiques. Cette altération qui peut se développer bien avant que la maladie ne se déclare, est en relation avec une diminution de la captation du glucose par les cellules des tissus périphériques, particulièrement le tissu musculaire (Hunter & Garvey, 1998). Le facteur limitant de la captation du glucose se situe au niveau de l'activité de transport de la cellule. Le transport de glucose est assuré par GLUT1 et GLUT4 notamment chez l'homme et chez le rat où GLUT4 aurait un rôle prépondérant dans la captation insulino-dépendante du glucose (Zorzano *et al.*, 2005) ce qui fait de ce transporteur un bon candidat comme facteur limitant dans l'insulino-résistance. De nombreux travaux mettent en évidence l'implication d'un mécanisme de translocation induite qui semble déficient dans l'insulino-résistance des tissus cibles pour l'insuline (Zierath *et al.*, 1996; Kelley *et al.*, 1996). Notre test consiste donc à quantifier le transporteur de glucose GLUT4 à la membrane plasmique sur une lignée de myocytes (L6) par une approche de type ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

CONCLUSION

Les plantes médicinales sont un enjeu important d'innovation dans le domaine du médicament mais au-delà de cette première considération, elles sont également un enjeu de développement économique. En effet, la redécouverte des pratiques ancestrales des soins par les plantes ainsi que les patrimoines naturels régionaux fait renaître un regain d'intérêt pour les jardins botaniques et d'espoir pour le développement d'une agriculture de complément. Du côté des laboratoires de recherche, la phytochimie aujourd'hui est devenue du fractionnement systématique et normalisé de grandes collections de plantes afin d'obtenir d'énormes collections de fractions, les extractothèques, qui sont alors utilisées pour le criblage soit moléculaire soit fonctionnel sur culture de cellules; rappelons qu'en France cette démarche a été initiée par

Pierre Potier qui fut le découvreur dans les années 80 de la 10-désacétylbaccatine ou taxol, puissant anticancéreux extrait de l'écorce d'if européen (*Taxus baccata*).

BIBLIOGRAPHIE

- Bailey C. J. & Day C., Traditional plant medicines as treatments for diabetes *Diabetes Care*, 1989, 12, 553-564.
- Broca C., Gross R., Petit P., Sauvaire Y., Manteghetti M., Tournier M., Masiello P., Gomis R. & Ribes G., 4-Hydroxyisoleucine: experimental evidence of its insulinotropic and anti-diabetic properties. *The American Physiological Society*, 1999, E617-E623.
- DeFronzo R. A., The triumvirate: β -cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes*, 1988, 37, 667-687.
- Desclaux A. & Lévy J. J., Anthropologie et Sociétés Cultures et médicaments. Ancien objet ou nouveau courant en anthropologie médicale? *Cultures et médicaments*, 2003, 27, 5-21.
- Le Jeune R., La visite de quelques jardins médicinaux dignes d'intérêt se poursuit. Balade informatique au gré des départements. *Phytothérapie*, 2006, 4, 205-206.
- Eschwège E., Simon D. & Balkau B., Diabetes as seen by the epidemiologist. *Disease Management & Health Outcomes*, 1998, 4 (Suppl. 1), 1-12.
- Hunter S. J. & Garvey W. T., Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system. *The American Journal of Medicine*, 1998, 105, 331-345.
- Kelley D. E., Mintun M. A., Watkins S. C., Simoneau J. A., Jadali F., Fredrickson A., Beattie J. & Theriault R., The effect of non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity on glucose transport and phosphorylation in skeletal muscle. *The Journal of Clinical Investigation*, 1996, 97, 2705-2713.
- Landry Y. & Gies J. P., Des cibles vers l'indication thérapeutique. *Pharmacologie*, 2003, Dunod, Paris.
- Sekine N., Fasolato C., Pralong W. F., Theler J. M. & Wollheim C. B., Glucose-induced insulin secretion in INS-1 cells depends on factors present in fetal calf serum and rat islet-conditioned medium. *Diabetes*, 1997, 46, 1424-1433.
- Tousch D., Ribes G. & Andary C., Composition antidiabétique apte à stimuler la sécrétion d'insuline et spécialement destinée au traitement du diabète de type 2 (diabète non insulino-dépendant). *Brevet français* 00740-01, 2006.
- Volák J. & Stodola J., Plantes médicinales. *GRÜND*, 1983, Paris.
- Zierath J. R., He L., Gumà A., Odegaard Wahlström E., Klip A. & Wallberg-Henriksson H., Insulin action on glucose transport and plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle from patients with NIDDM. *Diabetologia*, 1996, 39, 1180-1189.
- Zorzano A., Palacin M. & Guma A., Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*, 2005, 183, 43-58.