الجـــــــــــــــــــــــــــمـهـوريـــــة الجـــــــــــــــزائـريـة الديمـــــــقـراطيـة

الـشـــــــــعـبيـة

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التـــــــــــــــــــــــــــعـليـم العـــــالي و البـــــــــحث العـــلـمـــي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جـــــــــــــامعة أبي بكـــر بـلـقـايد – تـلمســـــــــــــان –

Université Abou Bekr Belkaïd – Tlemcen –

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de L'univers

Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique

THESE

Présentée pour l'obtention du **diplôme** de **DOCTORAT 3ème Cycle**

En : Biologie

Spécialité : Biochimie Appliquée

Par : Drissi Farah Djazia

Sujet

Recherche d'activités biologiques de « *Citrullus colocynthis* »

Soutenue publiquement, le / / , devant le jury composé de :

Mme Zahia BOUCHERIT	Professeur	UABTlemcen	Présidente
M. Farid LAHFA	Professeur	UABTlemcen	Directeur de thèse
M. Roland GOVERS	MCA	Univ. Aix Marseille	Co- Directeur de thèse
Mme Yasmina BENAZZOUG	Professeur	USTHB Alger	Examinatrice
M. Rachid AZZI	Professeur	UABTlemcen	Examinateur
M Nicolas FABRE	Professeur	Univ. Toulouse	Examinateur

Résumé

Le présent travail est une contribution à la recherche et à l'évaluation d'activités antidiabétiques de la graine et le pulpe de *Citrullus colocynthis*, plante médicinale locale utilisée pour traiter diverses pathologies, dont le diabète de type 2. Jusqu'à présent, ses effets antidiabétiques ont été attribués à son amélioration de la sécrétion d'insuline pancréatique. L'objectif de ces travaux de thèse est de rechercher et d'évaluer l'effet antidiabétique d'extraits de coloquinte sur deux cibles thérapeutiques, un transporteur de glucose : GLUT4 et une enzyme : l'α-amylase. En parallèle nous avons réalisé une étude comparative des effets biologiques et de la composition chimique de différents extraits de pulpe et de graine de Citrullus colocynthis.

Nos travaux ont révélé que les extraits de coloquinte améliorent de façon aiguë la translocation de GLUT4 induite par l'insuline et augmentent de façon significative l'absorption du glucose. Nous avons découvert qu'une des fractions de la pulpe augmentait la translocation de GLUT4 sans changer la dose demi-maximale d'insuline ni changer la cinétique de translocation de GLUT4. Sur le plan moléculaire, l'extrait de pulpe s'est révélé augmenter la phosphorylation de la Protéine Kinase B PKB induite par l'insuline sans modifier la phosphorylation du récepteur d'insuline. L'évaluation de l'effet hémolytique ainsi que les tests de viabilité cellulaire sur les adipocytes ont montré que les fractions actives n'étaient pas toxiques pour les cellules, de plus, elles présentaient même un effet protecteur. L'évaluation de l'inhibition de l'α-amylase a démontré que les extraits de pulpe et de graine de *Citrullus colocynthis* confirment la présence d'une activité inhibitrice. Enfin, nous avons déterminé les profils phytochimiques de nos extraits d'intérêt par LC-MS et identifié plusieurs composés qui constituaient 87% de l'extrait. La combinaison de plusieurs méthodes d'analyses chimiques, spectroscopiques et chromatographiques nous a permis d'évaluer qualitativement et quantitativement les biomolécules dans les extraits de différentes parties de Citrullus colocynthis ainsi que la mise en évidence d'une nouvelle molécule susceptible d'être une cucurbitacine non décrite encore dans la littérature.

Mots clés : Citrullus colocynthis, diabète de type 2, GLUT4, α-amylase, cucurbitacines.

Summary

The present work is a contribution to the research and evaluation of the anti-diabetic activities of Citrullus colocynthis, a local medicinal plant used to treat various pathologies, including type 2 diabetes. Until now, its anti-diabetic effects have been attributed to its improved pancreatic insulin secretion. The objective of this thesis work is to research and evaluate the anti-diabetic effect of extracts of colocynth on two therapeutic targets, a glucose transporter: GLUT4 and an enzyme: α-amylase. In parallel, we carried out a comparative study of the biological effects and the chemical composition of various extracts of pulp and seed of Citrullus colocynthis.
Our work revealed that colocynth extracts acutely improve insulin-induced GLUT4 translocation and significantly increase glucose uptake. We have shown that one of the pulp fractions increases the translocation of GLUT4 without changing the half-maximal dose of insulin or changing the kinetics of translocation of GLUT4. Molecularly, the pulp extract has been shown to increase insulin-induced phosphorylation of Protein Kinase B PKB without altering insulin receptor phosphorylation. Evaluation of the hemolytic effect as well as cell viability tests on adipocytes showed that the active fractions were not toxic to the cells, moreover, they even had a protective effect. Evaluation of α-amylase inhibition showed that extracts from the pulp and seed of Citrullus colocynthis confirmed the presence of inhibitory activity. Finally, we determined the phytochemical profiles of our extracts of interest by LC-MS and identified several compounds that made up 87% of the extract. The combination of several chemical, spectroscopic and chromatographic analysis methods allowed us to qualitatively and quantitatively assess the biomolecules in the extracts of different parts of Citrullus colocynthis as well as the demonstration of a new molecule likely to be a cucurbitacin. not yet described in the literature.

Keywords: Citrullus colocynthis, type 2 diabetes, GLUT4, α-amylase, cucurbitacins.

ملخص

هذا العمل هو مساهمة في البحث والتقييم للأنشطة المضادة لمرض السكري في Citrullus colocynthis ، وهو نبات طبي محلي يستخدم لعلاج أمراض مختلفة ، بما في ذلك مرض السكري من النوع 2. حتى الآن ، تُعزى آثاره المضادة للسكري إلى تحسين إفراز الأنسولين في البنكرياس. الهدف من هذه الرسالة البحثية وتقييم التأثير المضاد لمرض السكري لمستخلصات الكولوسينث على هدفين علاجين ، ناقل الجلوكوز: GLUT4 وإنزيم: α-amylase. بالتوازي مع ذلك ، أجرينا دراسة مقارنة للتأثيرات البيولوجية والتركيب الكيميائي لمستخلصات مختلفة من لب وبذور نبات سيتروس كولوسينثيس.

كشف عملنا أن مستخلصات الكولوسينث تحسن بشكل حاد انتقال GLUT4 الناجم عن الأنسولين وتزيد بشكل كبير من تحفيز الأنسولين لامتصاص الجلوكوز الخلوي. لقد أظهرنا أن أحد أجزاء اللب يزيد من انتقال GLUT4 دون تغيير نصف جرعة الأنسولين القصوى أو تغيير حركية انتقال GLUT4. جزينيًا ، ثبت أن مستخلص اللب يزيد من الفسفرة التي يسببها الأنسولين لبروتين Kinase B PKB دون تغيير فسفرة مستقبلات الأنسولين. أظهر البحث والتقييم للتأثير الانحلالي وكذلك اختبارات حيوية الخلية على الخلايا الشحمية أن الكسور النشطة لم تكن سامة للخلايا ، علاوة على ذلك ، كان لها تأثير وقائي. أظهر تقييم تثبيط α-amylase أن المستخلصات من لب وبذور Citrullus colocynthis أكدت وجود نشاط مثبط. جزء اللب مع أفضل معدل لتثبيط ألفا الأميليز. أخيرًا ، حددنا الملامح الكيميائية النباتية لمقتطفاتنا التي تهمنا بواسطة LC-MS وحددنا العديد من المركبات التي تشكل 87 ٪ من المستخلص. سمح لنا الجمع بين العديد من طرق التحليل الكيميائي والطيفي والكروماتوغرافي بإجراء تقييم نوعي وكمي للجزيئات الحيوية في مقتطفات من أجزاء مختلفة من Citrullus colocynthis بالإضافة إلى إظهار جزيء جديد يحتمل أن يكون كوكوربيتاسين. لم يتم وصفها بعد في الأدبيات.

الكلمات المفتاحية: Citrullus colocynthis ، داء السكري من النوع 2 ، α- ، GLUT4 amylase ، cucurbitacins

« J'ai appris que la voie du progrès n'était ***ni rapide ni facile.*** *»*

Marie Curie

À mes parents, pour la qualité de l'éducation qu'ils m'ont conférée et les vertus qu'ils m'ont transmises. Je leur exprime ici toute mon affection, tout mon amour et toute ma gratitude pour m'avoir encouragée et soutenue tout au long de mes études, et aujourd'hui encore. Qu'ils voient en ce travail l'aboutissement de leurs efforts.

Papa, merci de m'avoir inculqué les valeurs de la science qui sont la rigueur, l'honnêteté et le partage, ta confiance en moi ton soutien infaillible et ton amour m'ont permis d'arriver là aujourd'hui, tu es et resteras mon phare.

Maman, ton l'amour inconditionnel me pousse toujours à donner le meilleur de moi, tu as su m'encourager quand je n'avais plus la force de continuer et me canaliser lorsque j'en avais besoin.

Merci également à mon grand frère, mon meilleur ami, mon confident Mehdi qui m'a toujours soutenue et cru en moi. Merci à ma petite sœur chérie Naila, merci pour tes petits plats et gâteaux, tu m'as chouchoutée et supportée tout le long.

À l'ensemble de ma famille, qu'ils soient assurés de ma plus profonde sympathie.

À tous mes proches et amis, pour les instants de joie partagés en leur compagnie, leur gentillesse et tous les sentiments qu'ils me témoignent. Qu'ils soient assurés de toute ma reconnaissance et de mon amitié la plus sincère.

Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier Le Pr **Zahia Boucherit** d'avoir accepté de présider le jury, je tiens également à vous remercier ici pour votre enseignement et accompagnement tout au long de mon parcours académique, je vous suis très reconnaissante d'avoir bien voulu porter intérêt à ce travail.*

*Je remercie mon directeur de thèse le **Pr Farid Lahfa** de m'avoir accordé sa confiance et de m'avoir encadrée tout le long de mon parcours universitaire. Je remercie tout particulièrement son encouragement permanent, sa disponibilité et ses précieux conseils.*

*Je remercie également les membres du jury : **Pr Yasmina BENAZZOUG**, et le **Pr Rachid Azzi** d'avoir accepté d'examiner mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.*

*Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à mon co-directeur de thèse le **Dr Roland Govers**, qui m'a offert l'opportunité de pouvoir effectuer la majeure partie de ma thèse au sein de sa formidable équipe au C2VN. Je te remercie pour ta bienveillance, ton encadrement et tous les conseils que tu m'as apportés tout au long de notre collaboration. Grace à toi j'ai pu voir combien la science pouvait être passionnante. Je tiens également à te remercier pour ta grande contribution à faciliter toutes les étapes de ma formation, et ce, malgré toutes les embuches que nous avons pu rencontrer. Tu trouveras ici le témoignage de toute ma gratitude, ma profonde reconnaissance et ma grande estime.*

*Je souhaite remercier le **Pr Nicolas Fabre** de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, PharmaDev, et que je considère comme mon 3eme directeur de thèse. Je te remercie pour ton chaleureux accueil au sein de ton équipe cosmopolite et ta bienveillance. Grace à toi j'ai pu acquérir des connaissances en pharmacognosie, qui font de moi une meilleure scientifique aujourd'hui. Mon apprentissage et la réalisation d'une partie de mes travaux de thèse se sont faits dans les meilleures conditions qu'un étudiant puisse espérer. Aussi, je te remercie tout particulièrement pour tout le temps que tu as consacré pour me former aux différentes techniques d'analyses chimiques.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement **Teresa Gonzales**, qui m'a tout appris, ton exigence m'a permis de m'améliorer très rapidement. Merci pour le partage de tes connaissances, pour ta patience et pour notre complicité. Sans toi ce travail n'aurait pas été ce qu'il est. Nos petites discussions et nos rires autour de la machine à café vont me manquer.*

*Merci au **Dr Mohamed Hadad** pour avoir été un soutien et un repère, merci de m'avoir épaulée et guidée dès mon arrivée à Toulouse.*

Mes remerciements et ma reconnaissance au directeur de laboratoire Laapsab ***Dr Nadjib Rahmoun*** *et à la directrice du laboratoire C2VN* ***Pr Marie-Christine Alessi*** *qui m'ont permis de réaliser mon doctorat au sein de leur équipe.*

Je tiens à remercier profondément le ***Pr Zahia Boucherit*** *et le* ***Pr Kébir Boucherit****, qui m'ont apporté leur soutien durant un moment particulièrement difficile au début de mon doctorat, vous avez été là pour moi lorsque j'en avais le plus besoin, je n'oublierai pas votre précieuse aide et vos mots réconfortants.*

Je remercie tout le reste de l'équipe Laapsab : ***Faiza, Dounia*** *et* ***Ikram****, ainsi que le reste de l'équipe PharmaDev :* ***Romina, Ines, Fatima, Franck, Messi et Ingrid.***

Je remercie également le ***ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*** *de m'avoir accordé une bourse d'étude Profas B+ qui nous a permis de réaliser une thèse dans le cadre d'un accord triangulaire.*

Table des matières

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS XI
LISTE DES FIGURES XIII
LISTE DES TABLEAUX XV
INTRODUCTION GENERALE ..... - 16 -

CHAPITRE 1 ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE ..... - 18 -

1. DIABETE ..... - 19 -
1.1. PREVALENCE DU DIABETE ..... - 19 -
1.2. DEFINITION ..... - 19 -
1.3. DIABETE DE TYPE 1 ..... - 20 -
1.4. DIABETE DE TYPE 2 ..... - 20 -
1.5. ACTION DES HORMONES PANCREATIQUES : ..... - 21 -
1.5.1. L'INSULINE ..... - 22 -
1.5.2. GLUCAGON ..... - 22 -
1.6. COMPLICATIONS DU DIABETE ..... - 22 -
1.6.1. NEUROPATHIE DIABETIQUE ..... - 23 -
1.6.2. NEPHROPATHIE DIABETIQUE ..... - 23 -
1.6.3. MACRO-ANGIOPATHIE DIABETIQUE ..... - 23 -
1.6.4. RETINOPATHIE DIABETIQUE ..... - 24 -
1.7. TRAITEMENTS DU DIABETE ..... - 24 -
2. LE TRANSPORTEUR DE GLUCOSE GLUT4 ..... - 28 -
2.1. STRUCTURE DE GLUT4 ..... - 29 -
2.2. MECANISME D'ACTION DE GLUT4 ..... - 30 -
2.2.1. STIMULATION MEDIEE PAR L'INSULINE ..... - 30 -
2.2.2. STIMULATION PAR L'ACTIVITE PHYSIQUE ..... - 31 -
2.3. LA VOIE GLUT4, UNE CIBLE THERAPEUTIQUE ? ..... - 32 -
3. PHYTOTHERAPIE ..... - 33 -
3.1. DEFINITION ..... - 33 -
3.2. HISTORIQUE ..... - 35 -
3.3. CONTROLE DES PLANTES MEDICINALES ..... - 36 -
3.4. RECHERCHE DE PRINCIPES ACTIFS ..... - 37 -
3.5. LA NOTION DE « TOTUM » ..... - 40 -
3.6. AVANTAGES DE LA PHYTOTHERAPIE ..... - 40 -
3.7. LIMITES DE LA PHYTOTHERAPIE ..... - 41 -
3.8. LE TRAITEMENT DU DIABETE PAR LA PHYTOTHERAPIE ..... - 42 -
4. CITRULLUS COLOCYNTHIS ..... - 44 -
4.1. DESCRIPTION BOTANIQUE ..... - 44 -
4.2. TAXONOMIE ..... - 45 -
4.3. PHYTOCHIMIE DE *CITRULLUS COLOCYNTHIS* ..... - 46 -
4.4. UTILISATION EN MEDECINE TRADITIONNELLE ..... - 50 -
4.5. TOXICITE ..... - 50 -
4.6. ACTIVITES BIOLOGIQUES DE LA COLOQUINTE ..... - 51 -
4.6.1. ACTIVITE ANTIOXYDANTE ..... - 51 -
4.6.2. ACTIVITE ANTIDIABETIQUE ..... - 51 -

4.6.3. ACTIVITE ANTITUMORALE ..... - 54 -
4.6.4. ACTIVITE ANTIPARASITAIRE ET INSECTICIDE ..... - 54 -

***CHAPITRE 2 PREPARATION DU PANEL D'EXTRAITS DE CITRULLUS COLOCYNTHIS* . - 58 -**

I. MATERIEL ET METHODE ..... **- 59 -**
1. EXTRACTIONS ..... **- 59 -**
1.1. RECOLTE ET PREPARATION DE LA MATIERE VEGETALE ..... **- 59 -**
1.2. LES EXTRAITS BRUTS ..... **- 59 -**
1.2.1. LA GRAINE ..... - 60 -
1.2.2. LA PULPE ..... - 60 -
1.3. LES FRACTIONS DES EXTRAITS BRUTS ..... **- 60 -**
II. BILAN DES EXTRAITS OBTENUS ..... **- 61 -**

CHAPITRE 3 EFFET DES EXTRAITS DE CITRULLUS COLOCYNTHIS SUR LA TRANSLOCATION GLUT4 INDUITE PAR L'INSULINE : ARTICLE PUBLIE ..... **- 64 -**

CHAPITRE 4 EFFET INHIBITEUR DES EXTRAITS DE CITRULLUS COLOCYNTHIS SUR L'ACTIVITE DE L'ALPHA-AMYLASE ..... **- 79 -**

I. INTRODUCTION ..... **- 80 -**
II. MATERIEL ET METHODE ..... **- 81 -**
III. RESULTATS ET DISCUSSION ..... **- 82 -**
IV. CONCLUSION ..... **- 85 -**

CHAPITRE 5 ÉVALUATION DE L'EFFET HEMOLYTIQUE DES EXTRAITS DE CITRULLUS COLOCYNTHIS ..... **- 87 -**

I. INTRODUCTION ..... **- 88 -**
II. MATERIEL ET METHODE ..... **- 89 -**
III. RESULTATS ET DISCUSSION ..... **- 89 -**
IV. CONCLUSION ..... **- 92 -**

CHAPITRE 6 ANALYSES PHYTOCHIMIQUES DES EXTRAITS ACETATE D'ETHYLE DE GRAINE ET DE PULPE DE CITRULLUS COLOCYNTHIS ..... **- 93 -**

I. MATERIEL ET METHODES ..... **- 94 -**
1. METHODES DE SEPARATION ET D'IDENTIFICATION DES METABOLITES ..... **- 94 -**
1.1. METHODES CHROMATOGRAPHIQUES D'ANALYSE ET DE SEPARATION ..... **- 94 -**
1.1.1. **CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM)** ..... - 94 -
1.1.2. **CHROMATOGRAPHIE SPE SUR CARTOUCHES DE SILICE C18** ..... - 94 -
1.1.3. **CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE OUVERTE (CC)** ..... - 94 -
1.1.4. **CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE SOUS MOYENNE PRESSION (MPLC)** ..... - 95 -
1.1.5. **HPLC SEMI-PREPARATIVE** ..... - 95 -

1.2. METHODES ANALYTIQUES OU PHYSICO-CHIMIQUES ..... - 96 -
1.2.1. SYSTEME UHPLC-DAD HITACHI ..... - 96 -
***1.2.2.* COUPLAGE UHPLC-DAD-CAD-LTQ ORBITRAP XL ..... - 96 -**
1.2.3. RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN) ..... - 97 -
II. RESULTATS ET DISCUSSION ..... - 98 -
1. ANALYSE DE LA COMPOSITION PHYTOCHIMIQUE DE PNA1 ..... - 98 -
1.1. CCM FRACTIONS ACETATE D'ETHYLE ..... - 98 -
1.2. ÉTUDE ET COMPARAISON PAR LC-MS DE PNA1 ET SNA1 ..... - 98 -
2. DEREPLICATION DES MOLECULES MAJORITAIRES ..... - 104 -
2.1. FRAGMENTATION DE LA GLUCOCUCURBITACINE I ..... - 104 -
2.2. FRAGMENTATION DE LA GLUCOCUCURBITACINE E ..... - 105 -
2.3. FRAGMENTATION DE LA CUCURBITACINE I ..... - 106 -
2.4. FRAGMENTATION DE LA CUCURBITACINE E ..... - 107 -
3. FRACTIONNEMENT DE PNA1 ET SNA1 ..... - 108 -
***3.1.* FRACTIONNEMENT DE PNA1 PAR VACELUT ..... - 108 -**
3.2. FRACTIONNEMENT DE PNA1 PAR MPLC ..... - 109 -
3.3. PURIFICATION DE F1 PAR HPLC SEMI PREPARATIVE ..... - 110 -
3.4. BILAN ..... - 112 -
4. IDENTIFICATION DES COMPOSES ISOLEES ..... - 112 -
4.1. RMN PROTON ET CARBONE DU COMPOSE C1 ..... - 112 -
4.2. RMN PROTON ET CARBONE DU COMPOSE C2 ..... - 115 -
III. CONCLUSION ..... - 117 -

CHAPITRE 7 CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES ..... - 118 -

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... - 121 -
ANNEXE ..... - 141 -
MATERIEL ET METHODE- EFFET DE CITRULLUS COLOCYNTHIS SUR LA TRANSLOCATION GLUT4 ..... - 142 -
1. MATERIEL BIOLOGIQUE ..... - 142 -
2. LES ADIPOCYTES 3T3-L1 ..... - 142 -
3. TRANSFECTION DES CELLULES PLAT-E ET INFECTION DES FIBROBLASTES 3T3-L1 ..... - 142 -
***4.* CULTURE CELLULAIRE ..... - 143 -**
5. TECHNIQUES DE FLUORESCENCE ..... - 144 -
5.1. MESURE DU TAUX DE TRANSLOCATION DE GLUT4 ..... - 144 -
5.2. MESURE DE LA CYTOTOXICITE DES EXTRAITS ..... - 144 -
6. MESURE DE LA CAPTATION DU GLUCOSE ..... - 145 -
7. EXTRACTION ET DOSAGE DES PROTEINES ..... - 145 -
8. WESTERN BLOT ..... - 145 -
9. STATISTIQUES ..... - 146 -

Liste des principales abréviations

AKT2 thréonine-protéine kinase,

AMPK AMP-activated protein kinase

AQP Aquaporine

ARNM Acide ribonucléique messager

AS160 Akt substrate of 160 kDa)

ATP adénosine-triphopshate

CAD ChargedAerosol Detector

CCM Chromatographie sur couche mince

CD3OD Méthanol deutéré

CDCL3 Chloroforme deutéré

CH2CL2 Dichlorométhane

$CHCL_3$ Chloroforme

CID Collision Induced Dissociation

DAD Diode Array Detector

DNS acide dinitrosalicylique

DT2 Diabète de type 2

ESI electrospray ionisation

FID Fédération internationale du diabète

G6P Glucose-6-phosphate

GLP-1 Glucagon-like peptide-1

GLUT4 Le transporteur de glucose 4'

GR globule rouge

GSV GLUT4 storage vesicles

HBA1C Hémoglobine glyquée A1c

HCD High EnergyCollisional Dissociation

HCOOH Acide méthanoïque

HPLC Chromatographie en phase liquide à haute performance

HZ hertz

IC50 Concentration inhibitrice médiane

IPSC: cellules souches progénitrices induites

IR Récepteur de l'insuline

IRS1 **Insulin receptor substrate 1**

LC-**MS** Chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse

LDH Lactate déshydrogénase

MEOH Méthanol

MODY: Maturity Onset Diabetes of the Young

MPLC Medium pressure liquid **chromatography**,

MS spectrométrie de masse

NACL Chlorure de sodium

NAOH Hydroxyde de sodium

OMS Organisation mondiale de la santé

PBS Tampon phosphate salin

PDA détecteur à barrette de diodes

PDK1 protéine kinase-1 dépendante de la protéine 3-phosphoinositide

PI3K Phosphoinositide 3-kinase

PKB protéine kinase B

PPARΓ Peroxisome proliferator-activated receptor

PPM Partie par million

RMN Résonance magnétique nucléaire

RPM Revolution Per **Minute**

SNP singlenucleotide polymorphism

TGN trans Golgi network

TIC : Total Ion Current

TR temps de rétention

UV ultra violet

Liste des figures

Figure **1**. Carte du monde des individus diabétiques en 2014 (D'après Atlas du diabète de la FID)

Figure **2.** Mécanisme de transport insulinodépendant de GLUT4

Figure **3.** Aspects généraux du cycle de GLUT4

Figure **4.** Les voies de signalisation de la translocation de GLUT 4 stimulées par l'insuline

Figure **5.** Comparaison des voies de signalisation de la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique médiées et non médiées par l'insuline

Figure **6.** Description phénotypique de Citrullus colocynthis

Figure **7.** Fruit de Citrullus colocynthis séché utilisé en laboratoire pour les extractions

Figure **8**. Structure des variétés de cucurbitacines

Figure **9.** Photographie d'un fruit de Citrullus colocynthis mure. Ain Sefra, Algérie- 2016.

Figure **10.** Diagramme des procédés d'extraction

Figure **11**. Structure et fonction inhibitrice de l' α-amylase par l'Acarbose.

Figure **12.** Évolution du taux d'inhibition de l' **α-** amylase en fonction des concentrations croissantes de différents extraits. (A) effet inhibiteur de Sna, (B) Sna1, (C) Pna et (D) Pna1.

Figure **13.** Étude de l'effet hémolytique de Sna, Sna1, Pna et Pna1. * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,005

Figure **14.** Montage d'une colonne MPLC

Figure **15.** CCM (CH_2Cl_2/MeOH (90/10, v/v))fractions Sna1 Sda1 Pna1 et Pda1 (de gauche à droite). Révélation sous UV plaque de gauche, et révélation par vanilline sulfurique plaque de droite

Figure **16.** (a) Chromatogramme (TIC) de l'extrait Pna1 avec détection ESI positif (b) Chromatogramme de l'extrait Pna1 avec détection UV. (c) Chromatogramme (TIC) de l'extrait Sna1 avec détection ESI positif (d) Chromatogramme de l'extrait Sna1 avec détection UV.

Figure **17.** Comparaison entre la composition phytochimique de Pna1 et Sna1

Figure **18.** De haut en bas : Spectres MS2 (+) MS2 (-) de la glucocucurbitacine I

Figure **19.** Schéma de la structure de la gluco-cucurbitacine I

Figure **20.** De haut en bas : Spectres MS2 (+) MS2 (-) de la glucocucurbitacine E

Figure **21**. Schéma de la structure de la gluco-cucurbitacine E

Figure **22.** De haut en bas : Spectres MS2 (+) MS2 (-) de la cucurbitacine I

Figure **23.** Schéma de la structure de la cucurbitacine I

Figure **24.** De haut en bas : Spectres MS2 (+) MS2 (-) de la cucurbitacine E

Figure **25.** Schéma de la structure de la cucurbitacine E

Figure **26.** Diagramme de purification de Pna1 par VacElut

Figure **27.** Diagramme de purification de Pna1 par MPLC

Figure **28.** CCM bilan du fractionnement de Pna1 par MPLC

Figure **29.** Profil UHPLC de la fraction F1

Figure **30.** Diagramme du fractionnement de F1 par HPLC semi-préparative

Figure **31.** Spectre RMN 13C de C1

Figure **32.** Spectre RMN H de C1

Figure **33.** Spectre RMN 13C de C2

Figure **34.** Spectre RMN H de C**2**
Figure **35.** Configuration expérimentale du test de l'état de transition

Liste des tableaux

Tableau **1.** Activités pharmacologiques des principales plantes utilisées contre le DT2

Tableau **2.** Variétés de cucurbitacines isolées et identifiées à partir de *Citrullus colocynthis*

Tableau **3.** Synthèse des propriétés pharmacologiques des extraits des différentes parties : pulpe, graine et écorce.

Tableau **4.** Références des extraits brutes et des fractions

Tableau **5.** Effet hémolytiques des extraits Sna, Sna1, Pna1 et Pna1

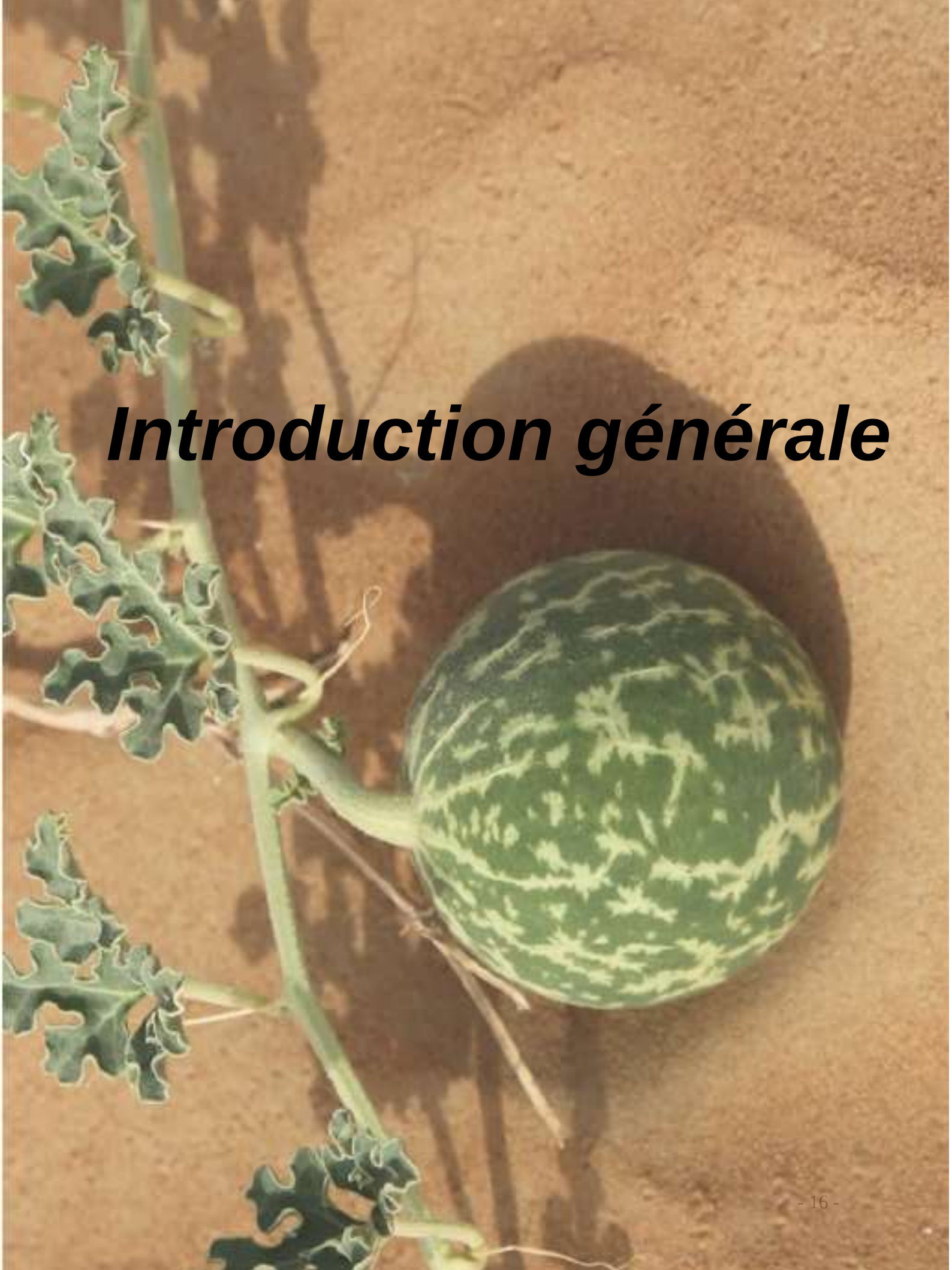
Tableau **6.** Gradient de la méthode de séparation en HPLC semi préparative

Tableau **7.** Gradient de la méthode d'analyse UHPLC-HRMS et UHPLC

Tableau **8.** Analyse LC- MS et comparaison de la composition phytochimique de Pna1 et Sna1

Tableau **9.** Correspondance des données spectroscopiques proton et carbone de C1 avec des données référencées

Tableau **10.** Correspondance des données spectroscopiques proton et carbone de C2 avec des données référencée



Introduction générale

La thématique de recherche porte sur la valorisation, la recherche et l'évaluation des activités biologiques des extraits d'une plante du sud-ouest algérien, la coloquinte «*Citrullus colocynthis*».

Des enquêtes ethnobotaniques et ethnopharmacologiques ont montré que le fruit et la graine de coloquinte sont fréquemment utilisés comme remèdes en médecine traditionnelle dans les régions ouest et sud-ouest de l'Algérie contre les hyperglycémies (Shi et al. 2014).

L'échec des traitements pharmaceutiques conventionnels, la forte incidence des effets secondaires indésirables qui leur sont associés, le prix élevé des médicaments, les ruptures de stock chroniques dans l'approvisionnement et l'insuffisance des infrastructures sanitaires en Algérie et dans les pays en voie de développement font qu'une large tranche de la population mondiale dépend essentiellement de la médecine traditionnelle ou complémentaire pour se soigner.

Cependant, la complexité chimique de beaucoup de produits naturels fait qu'actuellement le développement de la chimie organique s'associe à la chimie des produits naturels dans lesquels les techniques d'extraction, séparation, et de détermination de la structure et particulièrement de synthèse ont été développées afin d'identifier et de purifier les composés biologiquement actifs pour l'usage médicinal.

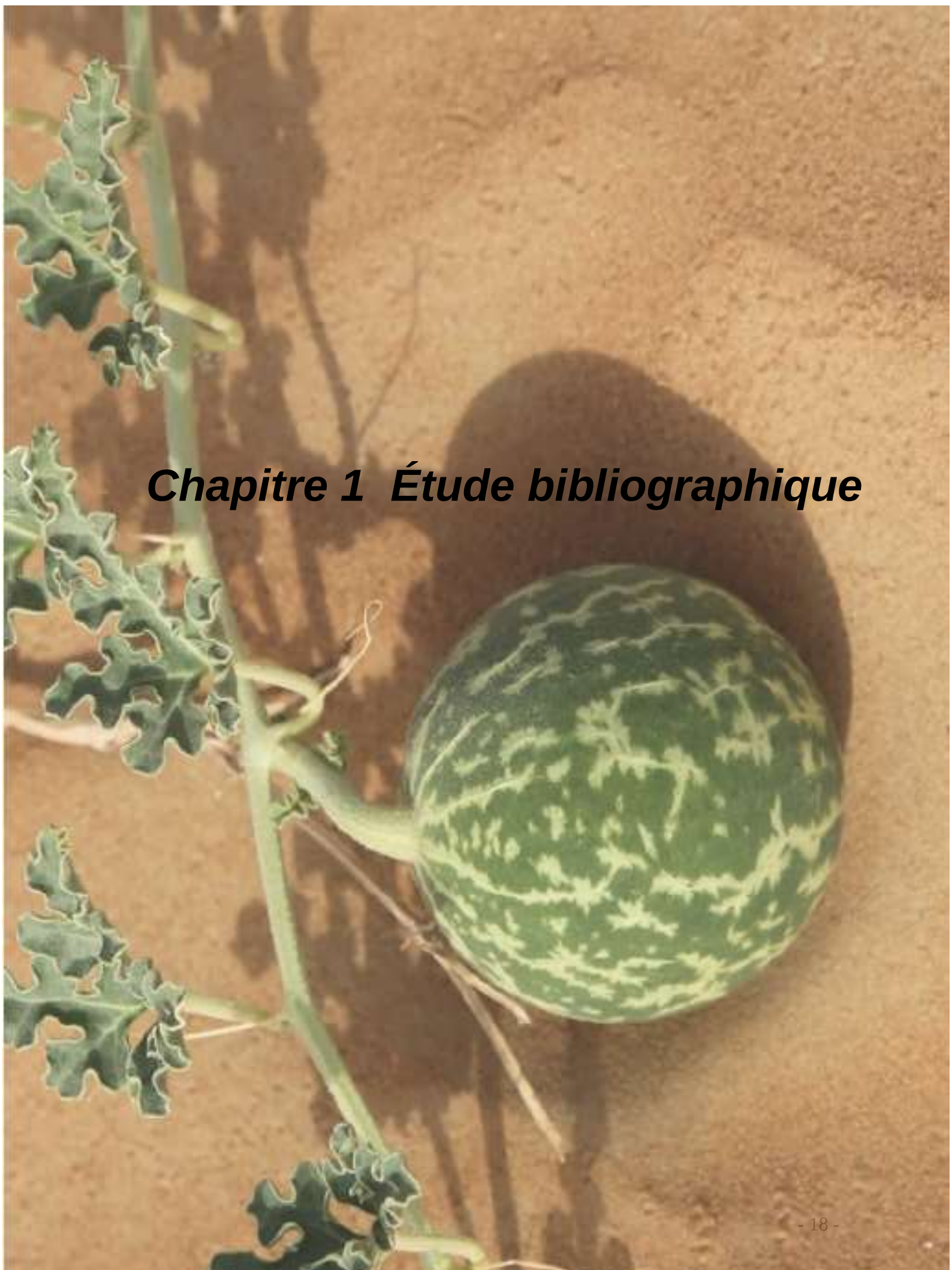
Dans la littérature, des résultats de travaux révèlent que des sujets diabétiques traités à la coloquinte présentent après traitement une première réponse qui se traduit par une diminution de la glycémie et une amélioration de la sensibilité à l'insuline, et à long terme une stimulation de la sécrétion d'insuline par les îlots pancréatiques voire même une régénération des îlots de Langerhans. La coloquinte aurait également un effet préventif contre le diabète et l'obésité (Yazit et al. 2020).

L'objectif de ces travaux de thèse est de mettre en évidence sur le plan moléculaire le mode d'action des extraits de coloquinte afin d'apporter une explication à ces effets hypoglycémiants ou plutôt anti-hyperglycémiants observés, car à ce jour la cible moléculaire des principes actifs de cette plante reste inconnue.

La première hypothèse est que l'action de la coloquinte pourrait être dirigée contre l'enzyme pancréatique : α-amylase et α-glucosidase intestinales et ce, en inhibant leurs activités et par conséquent l'entrée du glucose dans le sang. La seconde hypothèse de travail est que la cible pourrait être les transporteurs de glucose GLUT4 situés au niveau des tissus périphériques principalement le tissu hépatique, musculaire et adipeux.

La stratégie de recherche de nouvelles substances actives au sein du règne végétal met souvent en jeu des enquêtes ethnobotaniques. Nous avons donc exploré les potentialités biologiques de *Citrullus colocynthis*. Ainsi, un premier travail de criblage (chapitre III et IV) porte sur les effets antidiabétiques acutes de cette plante, en analysant son effet sur deux cibles thérapeutiques : GLUT4 et l' α-amylase, ainsi que son effet cytotoxique (chapitre V).

Au terme de ce criblage, les deux extraits les plus actifs sont retenus pour une étude phytochimique approfondie afin de mettre en évidence les molécules potentiellement responsables de ces activités anti-hyperglycémiantes (chapitre VI).



Chapitre 1 Étude bibliographique

1. Diabète

1.1. Prévalence du diabète

Le diabète sucré est actuellement un problème de santé publique majeur dans le monde où son taux prévalence augmente de manière constante. Ainsi, le diabète sucré touche actuellement 3,3 millions de personnes en France et environ 387 millions dans le monde (Guariguata et al. 2014). Selon l'OMS, plus de 14% de la population en Algérie est touchée par le diabète de type 2("enquete stepwise algerie 2016-2017 : meilleure connaissance du profil de sante des algeriens pour les facteurs de risque des maladies non transmissibles" n.d.). Les estimations de prévalence en 2035 sont de plus de 592 millions de personnes atteintes dans le monde. Une hyperglycémie chronique conduit bien souvent à de nombreuses complications qui auront une issue fatale dans un grand nombre de cas. De fait, en 2019 (figure 1), une personne meurt toutes les 7 secondes du diabète dans le monde, ce qui représente plus de 5 millions de morts par an. Le coût de prise en charge des patients diabétiques est très élevé. Dans le monde, le cout des dépenses liées au diabète est estimé à 548 milliards d'USD en 2013 et 1 dollar sur 9 dépensé en soins de santé l'est pour le diabète. Le diabète et notamment ses complications représentent donc un enjeu de santé publique majeur. En effet, les dépenses liées à celui-ci pèsent un poids considérable dans l'industrie de santé et cette maladie pose un problème socioéconomique non négligeable.

Figure 1. Carte du monde des individus diabétiques en 2014 (D'après Atlas du diabète de la FID)

1.2. Définition

Le diabète est une maladie métabolique complexe dont les causes sont issues d'une interaction entre génétique et environnement, constituant ainsi un ensemble hétérogène de désordres métaboliques qui, néanmoins, ont comme caractéristique commune de permettre l'installation d'une hyperglycémie chronique. La cellule ß répond à de fortes concentrations de glucose dans le sang par une sécrétion de l'insuline, une hormone peptidique qui agit sur d'autres tissus en captant le glucose présent dans le sang, par exemple dans le foie cette hormone favorise le stockage d'énergie grâce la synthèse du glycogène (Powers and D'Alessio 2017). Dans le

diabète, la dérégulation persistante de l'homéostasie du glucose conduit également à une variété de complications secondaires, y compris les maladies cardiovasculaires, la rétinopathie et la cécité associée, la neuropathie qui peut entraîner des amputations, et les maladies rénales conduisant à une insuffisance rénale.

1.3. Diabète de type 1

Le diabète de type 1, l'hyperglycémie résulte clairement de l'insulinopénie causée par la destruction immunologique des cellules β.

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune caractérisée par la destruction des cellules bêta pancréatiques sécrétrices d'insuline. La destruction de ces cellules a pour conséquence une insulinopénie (production insuffisante d'insuline) ce qui entraine une hyperglycémie chronique. L'hyperglycémie apparait après disparition de plus de 80% des cellules bêta fonctionnelles. Ce type de diabète est dit juvénile, car la maladie apparait bien souvent avant 30 ans chez des sujets donc relativement jeunes. Le diabète de type 1 survient sur un terrain génétique de prédisposition et plus d'une dizaine de gènes ont d'ores et déjà été liés à l'apparition de celui-ci (Bluestone, Herold, and Eisenbarth 2010). Comme il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement définitif du diabète de type 1 (Bluestone et al., 2010), cette maladie nécessite l'injection quotidienne d'insuline à vie . Le diabète de type 1 représente environ 10 % des cas de diabète observés dans le monde, bien loin derrière le diabète de type 2. L'OMS estime à 15 millions le nombre de diabétiques de type 1 dans le monde. De plus, pour des raisons liées aux modifications du mode de vie, l'incidence du diabète de type 1 augmente chaque année de 3 à 4% par an (Patterson et al. 2012).

1.4. Diabète de type 2

Le diabète de type 2 (ou diabète non insulinodépendant, 80 à 90% des cas) qui est souvent associé à l'obésité, se produit lorsque la demande d'insuline en raison de la persistance de sucre élevé dans le sang dépasse la capacité des cellules ß à produire suffisamment d'insuline pour prévenir l'hyperglycémie, les muscles squelettiques, le foie et le tissu adipeux blanc deviennent résistants à l'action de l'insuline, dans le diabète de type 2, les tissus périphériques, tels que les graisses et les muscles, aussi deviennent résistantes aux effets de l'insuline. Cette forte demande sur les cellules ß conduit souvent à un dysfonctionnement des cellules ß, dédifférenciation et la mort cellulaire (F. M. Ashcroft and Rorsman 2012a) (Talchai et al. 2012). Le nombre de cellules bêta- perdues dans le diabète de type 2 n'est pas précis mais peut approcher 60% (Butler et al. 2003) (Rahier et al. 2008),alors que les cellules ß restantes sont susceptibles d'être en quelque sorte dysfonctionnelles. Par ailleurs, l'adaptation compensatrice des cellules ß visant à produire plus d'insuline dans la circulation (l'hyperinsulinémie ayant pour fonction de compenser l'insulinorésistance) n'est plus suffisante pour assurer la normoglycémie, ce qui se traduit par un épuisement fonctionnel des cellules ß (Popa and Mota 2013) .Le diabète de type 2 n'est lui-même pas une maladie homogène, les diverses variantes de diabète de type 2 correspondant à un éventail de combinaisons, en proportion variables, des deux traits phénotypiques majeurs, l'insulinorésistance et le déficit de production d'insuline. Cependant, certaines

de ces variantes, simples et monogéniques, touchent la capacité des cellules ß à sécréter l'insuline, ce sont les MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) (Brunetti, Chiefari, and Foti 2014).

Différentes mutations ont été identifiées pour être responsables du diabète de type 2. Ces maladies monogéniques menant au diabète non auto-immun ont servi de paradigmes pour l'identification de gènes majeurs impliqués dans la sécrétion d'insuline chez l'homme (Bonnefond, Froguel, and Vaxillaire 2010). Le MODY, qui représente moins de 5% de tous les cas de diabète non auto-immun, se développe habituellement pendant l'enfance ou chez le jeune adulte. De nouvelles stratégies, basées sur l'utilisation de cellules souches progénitrices induites (iPSc) sont en cours de développement afin de reconstituer chez le patient MODY des cellules ß et de comprendre les mécanismes moléculaires liés aux mutation décrites (Pihoker et al. 2013).

Dans le diabète de type 2, deux altérations sont observées : l'insulinorésistance des tissus périphériques et le déficit de la fonction des cellules β, qui semblent évoluer en parallèle au cours de la progression de la maladie, sans qu'il n'ait été déterminé lequel de ces deux phénomènes apparait en premier(Lyssenko et al. 2005). Ces phénomènes peuvent dû à :

- une forte réduction de la masse des cellules β (Butler et al. 2003) mais ces résultats n'ont pas été reproduits(Rahier et al. 2008). Mais celle-ci n'est très certainement pas le seul ni même le principal facteur dans l'étiologie du DT2, le dysfonctionnement des cellules β étant probablement plus impliqué(F. Ashcroft and Rorsman 2004).
- la fréquence d'expression de multiples variants génétiques (souvent des polymorphismes nucléotidiques, ou singlenucleotide polymorphism – SNP) de nombreux SNP(Fagerholm et al. 2012) associés au DT2 ont été identifiés, parmi lesquels beaucoup semblent être impliqués dans la fonction des cellules β, leur développement ou encore la régulation la masse β-pancréatique(Lyssenko and Groop 2009).
- Des mutations de gènes impliqués dans la machinerie de détection du glucose ou de son métabolisme dans la cellule β (F. M. Ashcroft and Rorsman 2012b).

1.5. Action des hormones pancréatiques :

En période postabsorptive, la glycémie est comprise entre 0, 8 et 1,1 g/l et le glucose est utilisé en grande partie indépendamment de l'insuline (action insulino-indépendante). L'organe qui capte la majorité du glucose circulant (50%) est le cerveau et il le fait de manière insulinoindépendante. Mais, l'augmentation de la glycémie, comme après un repas, est un signal qui stimule la production d'insuline. La quantité de glucose captée de manière insulino-indépendante n'augmente pas. Le glucose est alors capté de manière insulino-dépendante par les muscles et le tissu adipeux. Ce sont eux qui, avec l'augmentation de l'insulinémie, deviennent les consommateurs de ce surplus de glucose et permettent ainsi à la glycémie de diminuer. Le taux de captation du glucose par les muscles et le tissu adipeux est fonction de l'insulinémie.

1.5.1. L'insuline

L'insuline est le signal primaire endocrinien anabolisant, et elle joue un rôle critique dans le métabolisme des glucides, des lipides et des autres métabolismes. L'insuline augmente l'absorption cellulaire du glucose, stimule la glycolyse, et favorise la synthèse du glycogène hépatique et musculaire, des triglycérides adipeux, et les protéines des muscles squelettiques; tout en empêchant leur dégradation (Hardie 2012). Dans le diabète de type 2 (DT2), ces processus de régulation sont altérés. D'une part, l'hyperglycémie entraîne dans un premier temps une hypersécrétion d'insuline afin de rétablir l'homéostasie du glucose puis à terme, une diminution de la sécrétion d'insuline due à un épuisement fonctionnel des cellules ß. D'autre part, la production de glucose par le foie est induite, dû à une insulino-résistance hépatique et une augmentation de la sécrétion du glucagon. Ces perturbations métaboliques sont donc associées à des modifications structurelles et fonctionnelles dans les îlots pancréatiques (Göke 2008)

L'insuline est une hormone constituée de 2 chaînes polypeptidiques reliées entre elles par 2 ponts disulfures et 1 pont disulfure intrachaîne dans la chaine A : une chaîne A de 21 et une chaîne B de 30 acides aminés. La structure de l'insuline a été déterminée par *Frederick Sanger*, son point isoélectrique est à pH 5.5.

Le gène de l'insuline (INS) code pour une seule prohormone: la proinsuline. Au cours de la traduction, une séquence signal de cette hormone immature est clivée dans le réticulum endoplasmique, elle est ensuite transportée vers l'appareil de Golgi dans le cadre de la voie de sécrétion (Boland, Rhodes, and Grimsby 2017) Une fois dans les granules de sécrétion, le peptide signal (C-peptide) est excisé à partir du précurseur ainsi est obtenu la molécule d'insuline mature. La synthèse de l'insuline est contrôlée à la fois au niveau transcriptionnel et de traductionnel, le glucose étant le principal stimulus de son expression génique(Baumgard, Hausman, and Sanz Fernandez 2016)

1.5.2. Glucagon

Le glucagon est la principale hormone contre-régulatrice de l'insuline. C'est une hormone synthétisée par les cellules alpha du pancréas, qui est libérée quand la glycémie est basse. Il stimule la production de glucose par le foie en augmentant la glycogénolyse et la néoglucogenèse et en diminuant la synthèse de glycogène et la glycolyse, ceci par des réactions régulatrices sur les enzymes clés de ces différentes voies métaboliques. C'est donc le rapport insuline/glucagon qui contrôle la régulation du métabolisme hépatique du glucose. Son action sur les tissus périphériques est plus limitée(Jiang and Zhang 2003). La sécrétion de glucagon est inhibée par l'ingestion de glucose et des acides gras.

1.6. Complications du diabète

Les hyperglycémies répétées, prolongées, et le déséquilibre du diabète provoquent une altération des nerfs et des vaisseaux et, par voie de conséquence, une altération de certaines cellules de l'organisme, avec des répercutions sur plusieurs organes. Cela s'explique par le fait que ce sont les vaisseaux sanguins qui permettent au sang

de circuler et d'irriguer tout le corps jusqu'aux organes, et que les nerfs transmettent les messages nerveux du cerveau aux organes. Leur altération entraîne donc des complications dans l'organisme.

Les complications liées au diabète peuvent toucher : les nerfs, le cœur, les artères, les yeux, les mains, les pieds, les reins ou encore les dents.

Les microangiopathies

1.6.1. Neuropathie diabétique

La fréquence de la neuropathie diabétique est diversement appréciée selon les critères pris en compte pour la définir. Si on retient des critères cliniques, on estime sa prévalence à 50% chez les diabétiques dont la maladie évolue depuis plus de 20 ans et également à 50% chez les diabétiques âgés de plus de 65 ans (Rayego-Mateos et al. 2020).

Parmi les formes cliniques, on distingue :

- les mononeuropathies et mononeuropathies multiples : Elles ne représentent que 10 à 15 % des neuropathies diabétiques. Leur début est souvent brutal, faisant suspecter une pathologie ischémique, mais parfois il s'agit seulement de la compression radiculaire ou tronculaire d'un nerf «fragilisé» par le diabète. Ces mononeuropathies se traduisent essentiellement par des signes moteurs déficitaires et des douleurs évocatrices par leur exacerbation nocturne.
- les polyneuropathies diabétiques : sont beaucoup plus fréquentes, puisqu'elles représentent 80 à 85% des neuropathies diabétiques. Il s'agit le plus souvent de polyneuropathies sensitives. Leur topographie est habituellement distale, le plus souvent en chaussettes, plus rarement en gants, exceptionnellement thoraco-abdominale
- la neuropathie végétative

1.6.2. Néphropathie diabétique

Données épidémiologiques La prévalence d'une albuminurie supérieure à 30 mg/24 heures est de 20 à 30% chez les diabétiques. Le risque cardiovasculaire est multiplié par 10 chez les diabétiques de type 1 et multiplié par 3 chez les diabétiques de type 2. Les décès en insuffisance rénale terminale représentent 25 à 30% des diabétiques de type 1 et 5% des diabétiques de type 2. Enfin 50 à 80% des diabétiques dialysés sont des diabétiques de type 2 (Piccoli et al. 2015).

1.6.3. Macro-angiopathie diabétique

Par opposition à la microangiopathie qui touche la micro-circulation, on désigne sous le terme de macroangiopathie diabétique, l'atteinte des artères musculaires allant de l'aorte jusqu'aux petites artères distales d'un diamètre supérieur à 200 µm. En réalité, la macroangiopathie diabétique associe deux maladies artérielles distinctes:

- d'une part, l'athérosclérose qui semble histologiquement identique à l'athérosclérose du patient non diabétique
- d'autre part, l'artériosclérose, caractérisée par une prolifération endothéliale et une dégénérescence de la média aboutissant à la médiacalcose.

Ainsi 75% des diabétiques décèdent d'accidents vasculaires, au premier rang desquels l'ischémie coronarienne responsable de 50% des décès.

1.6.4. Rétinopathie diabétique

Dans le monde, la rétinopathie diabétique reste la première cause de cécité chez les sujets de 20 à 60 ans. Au total, 2 % des diabétiques deviennent aveugles et 10 % deviennent mal voyants. La rétinopathie est la conséquence d'une hyperglycémie chronique. Elle fait partie des complications microangiopathiques du diabète. Sa survenue est corrélée à la durée du diabète et au degré d'équilibre glycémique. La rétinopathie menace donc les patients diabétiques après quelques années d'hyperglycémie mal maîtrisée (Jenkins et al. 2015).

1.7. Traitements du diabète

Les différents moyens de prendre en charge un patient diabétique ont pour but de normaliser la glycémie du patient. En effet, le traitement de l'hyperglycémie est une priorité car il permet de retarder l'apparition des complications du diabète, en particulier les complications microvasculaires (Taylor, Yazdi, and Beitelshees 2021).

Le traitement repose sur un suivi du diabète via 3 paramètres : la glycémie à jeun, la glycémie postprandiale (1 à 2 heures après le repas), et l'HbA1c (Hémoglobine glyquée A 1 c).

L'objectif recommandé par l'International Diabetes Fondation (IDF) est de maintenir l'HBA1c en dessous de 7 %. Bien que le pourcentage normal d'HbA1c soit inférieur à 6 %, aucune des thérapies actuelles n'a montré un bénéfice sur la morbi-mortalité à long terme lorsque le traitement était intensifié (dose journalière augmentée) pour atteindre l'objectif de moins de 6 % d'HbA1c.

Les différentes classes thérapeutiques mises sur le marché sont(Nathan et al. 2009)

La metformine :

Seul représentant de la famille des biguanides, la metformine possède trois niveaux d'action sur la glycémie : niveau digestif (diminution de l'absorption des sucres), niveau hépatique (diminution de la néoglucogenèse), niveau musculaire (augmentation de la captation du glucose en potentialisant l'effet de l'insuline : l'affinité de l'Insuline-Récepteur pour l'insuline est augmentée et la signalisation est facilitée). La metformine a surtout un impact sur la glycémie à jeun.

En monothérapie, elle permet une diminution d'environ 1,5 point de pourcentage de l'HbA1c. L'effet sur le poids est nul, voire légèrement bénéfique (perte de poids). Le

risque d'hypoglycémie est faible, même chez les patients prédiabétiques ayant une glycémie peu élevée. Les effets indésirables les plus fréquents sont des effets digestifs, non graves, mais qui peuvent diminuer l'observance.

- Les sulfonylurées (sulfamides hypoglycémiant) : Ex : Gliclazide

Cette classe de molécules se fixe sur des canaux potassiques ATP-dépendant (fixation à SUR = SulfonylUrea Receptor) et active leur fermeture, ce qui stimule la libération de l'insuline par les cellules β des ilots de Langerhans. L'augmentation de la production d'insuline permet une meilleure régulation de la glycémie (Colagiuri et al. 2018).

En monothérapie, les sulfonylurées permettent une diminution d'environ 1,5 point de pourcentage d'HbA1c. Le risque d'hypoglycémie est conséquent, car la stimulation d'insuline est ici indépendante de la glycémie, et peut donc favoriser la diminution d'une glycémie normale, par exemple si le patient saute un repas. Il est également possible de développer des allergies cutanées, voire une photosensibilisation. On observe aussi en général une prise de poids d'environ 2 kg.

- Les Glinides : Ex : Répaglinide

C'est une famille apparentée aux sulfonylurées. Ils ont la même action sur la même cible, les canaux potassiques ATP-dépendant des cellules β des ilots de Langerhans, mais ne possèdent pas de fonction sulfamide.

Ils peuvent permettre d'obtenir une diminution de l'HbA1c similaire à celle obtenue avec la metformine. La grosse différence avec les sulfonylurées est pharmacocinétique. La demi-vie des glinides est plus courte (1 h pour le répaglinide contre 12 à 20h pour le gliclazide), ce qui nécessite une prise plus fréquente, mais diminue le risque d'hypoglycémie, la prise s'effectuant en général 15 min avant chaque repas.

- Les inhibiteurs de l'α -glucosidase et α-amylase : Ex : Acarbose

L' α -glucosidase est une enzyme intestinale impliquée dans la digestion des dextrines et des disaccharides. L'objectif des inhibiteurs est de diminuer l'absorption intestinale des sucres. Ces inhibiteurs ont une biodisponibilité par voie orale nulle, et n'exercent donc qu'une action topique.

Ils permettent une diminution de 0,5 à 0,8 point de pourcentage de l'HbA1c, et sont sans effet sur le poids. Bien que n'ayant aucun effet systémique, ils ne sont pas dénués d'effets indésirables, et en particulier, l'augmentation d'afflux de saccharides dans le côlon entraine l'apparition de troubles digestifs et de flatulences qui, bien que bénins, sont à l'origine d'un gros problème d'observance : 25 à 45 % des patients arrêtent leur traitement pour cette raison.

- Les thiazolidinediones : Ex : Pioglitazone

Les thiazolidinediones, appelées aussi glitazones, sont des agonistes des récepteurs PPARγ (Peroxisome proliferator-activated receptor). Ces facteurs de transcription sont impliqués dans le métabolisme lipidique et glucidique. Ainsi, un agoniste des PPARγ stimule l'expression du transporteur au glucose des muscles et du tissu adipeux, le GLUT4, et favorise le catabolisme du glucose en stimulant l'expression de la 6-Phosphofructo-2-kinase, enzyme de la glycolyse, et en réprimant l'expression de la fructose 2,6-diphosphatase, enzyme de la néoglucogénèse (Karásek 2020).

En monothérapie, elles permettent d'obtenir une baisse 0,5 à 1,4 point de pourcentage d'HbA1c. De plus, l'activité de contrôle glycémique qu'elles exercent est moins rapide que celui des sulfonylurées, mais plus prolongée. Elles ont cependant de nombreux effets indésirables, comme la rétention hydrique accompagnée d'oedème, l'augmentation du risque de fracture osseuse (chez les femmes), le risque d'insuffisance cardiaque. La rosiglitazone, qui entraine en plus un risque d'infarctus du myocarde, n'est d'ailleurs pas recommandée par ce consensus, elle a même été suspendue du marché européen. Quant à la pioglitazone, elle semble favoriser l'apparition de cancer de la vessie, et a d'ailleurs pour cela été retirée du marché français. C'est une classe thérapeutique qui tend à s'effacer au profit de nouvelles options plus sûres.

- Agonistes de l'amyline **:** Ex : Pramlintide

L'amyline est une hormone peptidique sécrétée par les cellules β des ilots de Langerhans. Elle ralentit la vidange gastrique, diminue la production de glucagon glucose-dépendante, et favorise la sensation de satiété. Les agonistes synthétiques permettent de reproduire ces effets. Ainsi, le pramlintide est capable de diminuer de 0,5 à 0,7 point de pourcentage l'HbA1c. Le principal effet indésirable est l'apparition de nausée à l'initiation du traitement. Celles-ci ont tendance à s'estomper par la suite. On observe également un effet positif sur le poids, qui peut être expliqué en partie par l'effet émétique. C'est un médicament approuvé en 2005 aux Etats-Unis, et qui n'est pas commercialisé ailleurs. Le pramlintide est administré par voie injectable sous-cutanée uniquement (Camilleri and Acosta 2018).

- Analogues du GLP-1 : Ex : Exenatide

Le GLP-1 est une hormone peptidique de la famille des incrétines, sécrétée par les cellules entéroendocrines L de l'intestin. Cette hormone est notamment capable de stimuler la sécrétion d'insuline glucose-dépendante, de ralentir la vidange gastrique, ou encore de favoriser la sensation de satiété. Nous reviendrons plus en détail sur la voie incrétine par la suite. Les analogues thérapeutiques de cette hormone produisent les mêmes effets que l'hormone naturelle, mais sont beaucoup moins sensibles à l'enzyme qui dégrade cette hormone, la DiPeptidylPeptidase IV (DPP4) (Bridges, Bistas, and Jacobs 2021).

On peut obtenir avec ces traitements une diminution de 0,5 à 1 point de pourcentage de l'HbA1c. Il n'y a pas de risque d'hypoglycémie avec ces composés. Les effets indésirables principaux sont les diarrhées, nausées et vomissements, à l'initiation du

traitement. On observe en général une perte de poids de 2 à 3 kg après les six premiers mois de traitement. L'exenatide est suspecté d'entrainer des risques de pancréatites, mais aucune relation causale n'a encore été établie.

- Inhibiteurs de la DPP4 : Ex : Sitagliptine

Ces composés, en inhibant l'enzyme responsable de la dégradation du GLP-1, favorisent l'action de celui-ci. On obtient ainsi des réductions de 0,6 à 0,9 point de pourcentage de l'HbA1c. Il n'y a pas avec ces traitements de risques d'hypoglycémie, ni d'effet sur le poids. Ils pourraient induire des risques d'infections respiratoires. En effet, la DPP4 est exprimée à la surface de certaines cellules immunitaires, et son inhibition pourrait avoir un impact sur l'immunité (Scott 2017).

- Inhibiteurs de SGLT-2 : Ex : Canagliflozine

Le Sodium-Glucose Transporter 2 est une protéine transmembranaire exprimée uniquement au niveau rénal et permettant la réabsorption active du glucose filtré par le glomérule vers le sang, au niveau du tube contourné proximal. Plusieurs inhibiteurs de ce transporteur ont récemment obtenu leur autorisation de mise sur le marché, suite à de bons résultats lors des essais cliniques (Johnston et al. 2017).

Ces molécules sont capables de générer une baisse du pourcentage d' HbA1c de 0,3 à 1 point de pourcentage. De plus, de par leur mécanisme insuline-indépendant, le risque d'hypoglycémie est faible. Cette nouvelle classe pharmaceutique présente qui plus est un effet intéressant de réduction du poids dû à une excrétion rénale du glucose augmentée. La glycosurie constante chez les patients traités s'accompagne cependant d'un risque augmenté d'infections génitales, sans toutefois avoir un impact fort sur le suivi du traitement.

- Insulines **:**

Les insulines sont le traitement le plus efficace et le plus adaptable de l'hyperglycémie. Il existe plusieurs types d'insuline, qui varient selon leur pharmacocinétique. Certaines insulines ont une action très brève et intense, tandis que d'autre une action très prolongée et régulière. En adaptant les doses, il est possible d'atteindre l'objectif de 7 % d'HbA1c quel que soit le statut du patient. Cependant, l'utilisation de l'insuline, qui est aussi un facteur de croissance auquel sont sensibles les adipocytes, génère une prise de poids proportionnelle à la réduction de la glycémie. Des épisodes d'hypoglycémie peuvent également survenir (Danne, Heinemann, and Bolinder 2018).

L'insuline a également un impact intéressant sur le profil lipidique puisqu'elle permet une diminution des triglycérides et une augmentation du HDL cholestérol (High density Lipoprotein). Il est à noter qu'à l'exception de l'insuline inhalable Afrezza®, toutes les insulines actuellement disponibles sont uniquement proposées en voie injectable, sous-cutanée le plus souvent. Ce mode d'administration reste un inconvénient, malgré les progrès réalisés en termes de simplicité d'utilisation, de sécurité et de confort (Posner 2017).

2. Le transporteur de glucose GLUT4

Les maladies métaboliques comme le diabète de type 2 est en constante progression depuis deux décennies et le fardeau économique sur la société est profond. La résistance à l'insuline est une caractéristique unificatrice de la plupart des maladies métaboliques. Par conséquent, tous les efforts doivent être faits pour comprendre la cause sous-jacente de la résistance à l'insuline si nous voulons ralentir la progression de ces maladies. Étant donné que l'une des actions les plus importantes de l'insuline dans le corps est de stimuler le transport du glucose dans les muscles et les tissus adipeux, dont les défauts contribuent à la résistance à l'insuline du corps entier chez l'homme, l'accent est mis sur la délimitation des caractéristiques réglementaires de ce système.

Contrairement à la plupart des autres cellules du corps, où le transport du glucose est constitutivement «actif», dans les cellules musculaires et adipeuses, le transport du glucose est rapidement régulé à la hausse plusieurs fois en réponse à l'insuline, et dans les muscles également par l'exercice. La découverte de GLUT4 il y a 30 ans a été une avancée capitale dans la recherche métabolique (Baumgard, Hausman, and Sanz Fernandez 2016) car elle a fourni une explication biologique moléculaire et cellulaire à la façon dont l'insuline et l'exercice régulent le transport du glucose dans les cellules musculaires et adipeuses (De Meyts 2000). GLUT4 est principalement exprimé dans les muscles squelettiques et cardiaques ainsi que dans les adipocytes, bruns et blancs, les mêmes cellules qui présentent un système de transport du glucose profondément insulino-sensible (figure2) (Charron et al. 1989; Kaestner et al. 1989).

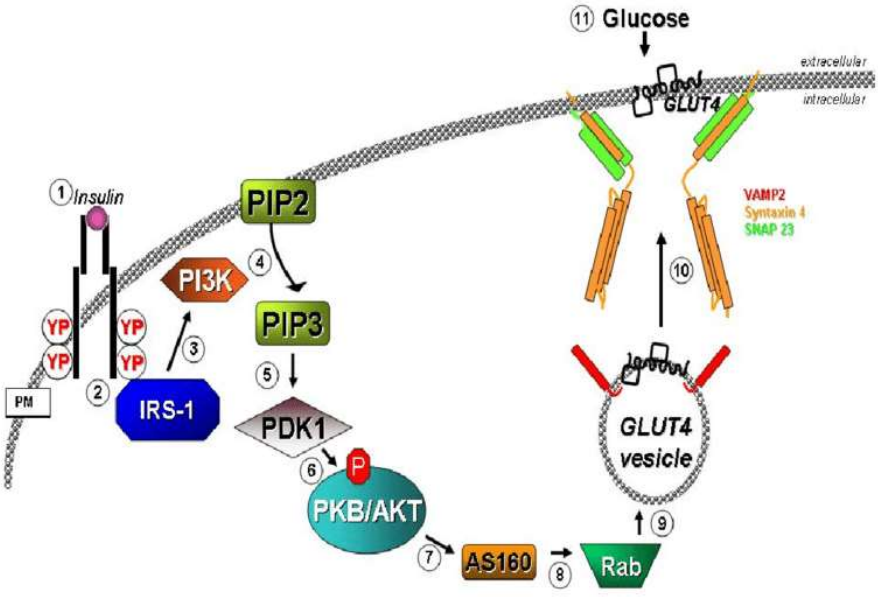


Figure 2. Mécanisme de transport insulinodépendant de GLUT4 (Jewell 2010)

2.1. Structure de GLUT4

GLUT4 fait partie d'une famille de protéines de transport du glucose contenant 12 domaines transmembranaires. Il s'exprime principalement dans le muscle squelettique et le tissu adipeux. Les séquences uniques N-terminales et COOH-terminales sont responsables de la réactivité de GLUT4 à la signalisation de l'insuline et au trafic membranaire. Le transport du glucose à travers la membrane cellulaire se fait via le mécanisme de GLUT4 de diffusion facilitante indépendante de l'ATP. Une fois que le glucose arrive dans la cellule, il peut être métabolisé pour la synthèse d'énergie ou de lipides, ou stocké sous forme de glycogène (Huang and Czech 2007).

GLUT4 déplace son emplacement entre le domaine intracellulaire et la membrane plasmique. En faisant partie d'un réseau tubulo-vésiculaire intracellulaire connecté au système de réseau endosomal-trans-Golgi (TGN), il est capable de changer d'emplacement en fonction de la présence de stimulation. En l'absence d'insuline ou d'exercice, 90% de GLUT4 reste intracellulaire.

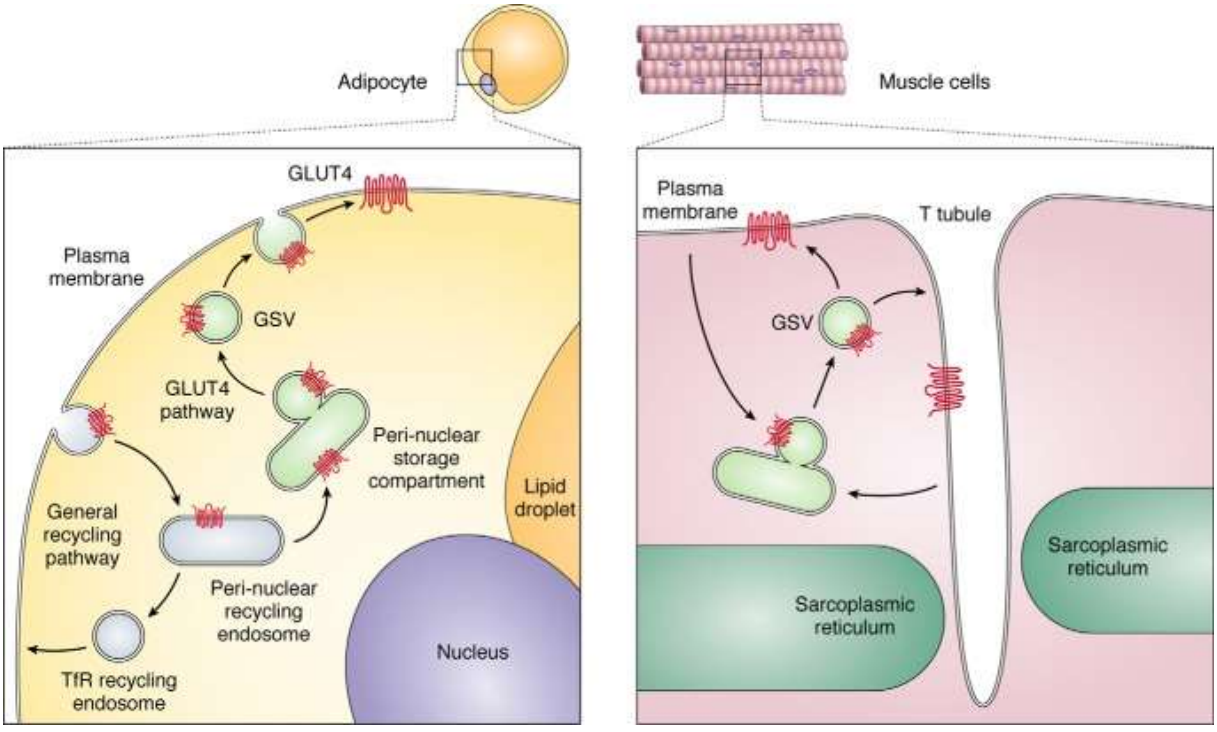


Figure 3. Aspects généraux du cycle de GLUT4. Aspects généraux du cycle GLUT4 qui ont émergé au fil des ans et ont servi de modèle pour comprendre la régulation dynamique de l'itinéraire du transporteur dans les cellules adipeuses (gauche) et musculaires (droite). TfR, récepteur de transferrine (recyclage du marqueur endosomique); Vésicules de stockage GSV, GLUT4. (Klip, McGraw, and James 2019)

En présence d'insuline ou d'exercice, les vésicules de stockage GLUT4 subissent une exocytose à la membrane plasmique, ainsi que le sarcolemme et les tubules T des cellules musculaires squelettiques, où ils peuvent exercer leur fonction sur le transport du glucose. Cette augmentation du nombre de molécules GLUT4 disponibles à la

surface cellulaire augmente la vitesse maximale du taux de transport du glucose dans les cellules (Vargas, Podder, and Carrillo Sepulveda 2020). Une fois qu'il y a suppression de la stimulation par l'insuline, GLUT4 est de nouveau intégré dans la cellule par bourgeonnement de vésicules sur la membrane plasmique contenant de la clathrine. Lors de l'internalisation, GLUT4 devient une partie des endosomes précoces et se reforme en vésicules intracellulaires. (Bryant, Govers, and James 2002; Shepherd and Kahn 1999).

2.2. Mécanisme d'action de GLUT4

2.2.1. Stimulation médiée par l'insuline

La principale voie de signalisation de l'insuline impliquée dans la translocation des GSV est la voie PI3K / PDK1 / AKT2, par phosphorylation du substrat AS160 (Figure 4). (Sayem et al. 2018).

L'effet métabolique prototypique de l'insuline est la stimulation du transport du glucose dans le tissu adipeux et le muscle squelettique et cardiaque (Levine et al. 1950; Jameson et al. 2016). L'élimination du glucose dans les muscles est la principale composante de l'action de l'insuline qui prévient l'hyperglycémie postprandiale. Ceci est accompli par la translocation par exocytose du transporteur de glucose insulino-sensible GLUT4 des vésicules intracellulaires à la membrane plasmique, par un mécanisme qui est encore loin d'être complètement compris (Huang and Czech 2007; Khan and Pessin 2002).

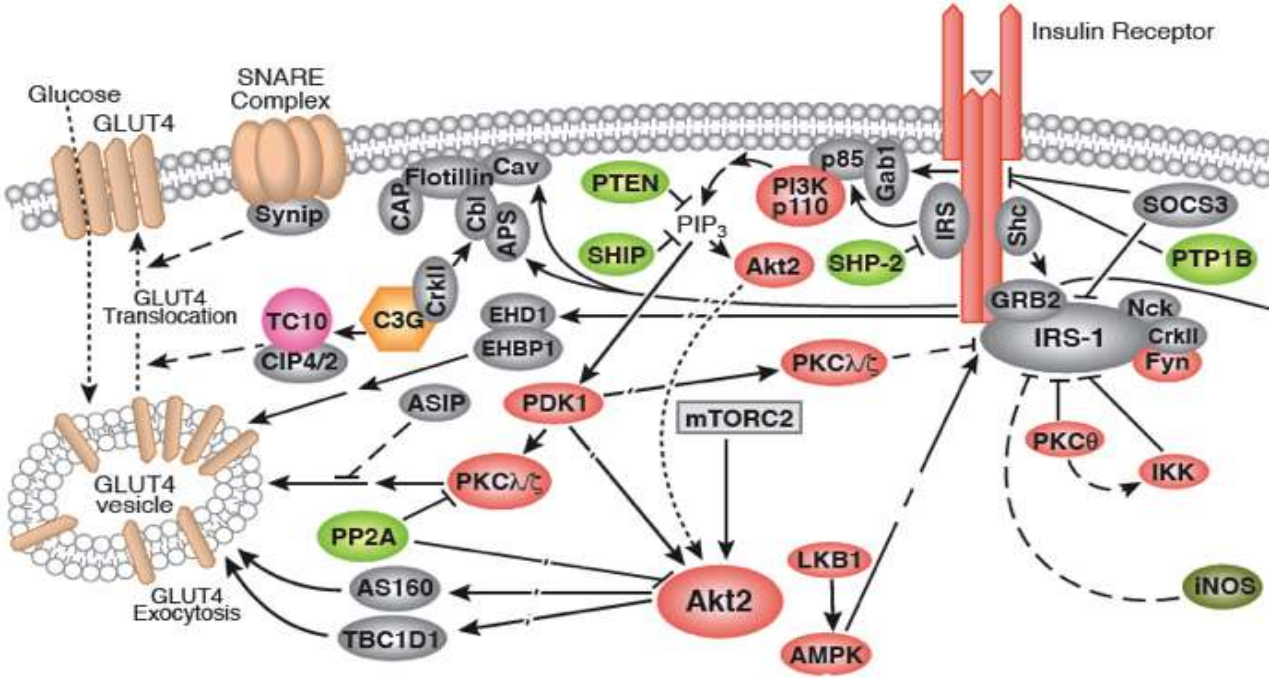


Figure 4. Les voies de signalisation de la translocation de GLUT 4 stimulées par l'insuline Mécanisme du transport du glucose stimulé par l'insuline et de la translocation du GLUT4. Cette caricature illustre la stimulation de la translocation de GLUT4 des vésicules de stockage intracellulaire (GSV) à la membrane plasmique par la cascade de signalisation IRS / PDK1 / AKT2 /, agissant sur la protéine activant la GTPase AS160 qui active la petite protéine G RAB. Les PKC

atypiques sont également impliqués. D'après la référence 1, utilisé avec permission (De Meyts 2000).

La liaison de l'insuline au récepteur de l'insuline (IR) conduit à des changements structurels au sein du récepteur qui induisent la transphosphorylation de divers résidus tyrosine. Il en résulte le recrutement de substrats IR vers l'IR, parmi lesquels le substrat IR 1 (IRS1), et leur phosphorylation ultérieure de tyrosine. L'IRS1 phosphorylée active la PI 3-kinase dans le feuillet interne de la membrane plasmique (Kotani et al. 1995) conduisant à la phosphorylation du cycle inositol du phosphatidylinositol et à la formation locale du second messager lipidique PIP3. Celui-ci sert à son tour de plate-forme de recrutement pour la kinase-1 dépendant du phosphoinositide (PDK1) et la sérine / thréonine protéine kinase B (PKB, également connue sous le nom d'Akt2). PKB puis devient phosphorylée par PDK1 ainsi que par mTORC2, ce qui entraîne son activation. La kinase PKB activée se lie également aux vésicules intracellulaires qui contiennent du GLUT4 (Kupriyanova and Kandror 1999) et phosphoryle une multitude de substrats. Alors que la PKB est considérée comme un acteur clé dans la translocation de GLUT4 induite par l'insuline (Ng et al. 2008), il existe des voies indépendantes de la PKB qui contribuent au plein effet de l'insuline sur la redistribution de GLUT4 au plasmamembrane (Gonzalez and Mcgraw, 2006).

D'autres voies indépendantes de PKB impliquées dans la translocation de GLUT4 incluent la phospholipase C (PLC) qui interagit avec et est activée par l'IR (Kayali et al. 1998), et la voie TC10 indépendante IRS1 / PI 3-kinase / PKB (Chiang et al. 2001).

Parmi les substrats PKB, le substrat Akt de 160 kDa (AS160; également connu sous le nom de Tbc1d4) est le plus connu et s'est avéré être un modulateur clé de la translocation de GLUT4 (Kane et al. 2002). AS160 a été la première molécule qui relie directement la signalisation de l'insuline au trafic intracellulaire GLUT4. AS160 est une protéine d'activation de la Rab-GTPase (GAP) et active sous sa forme déphosphorylée.

2.2.2. Stimulation par l'activité physique

L'activité physique stimule la translocation du GLUT4 vers la membrane plasmique du muscle squelettique. Cette stimulation se produit via un mécanisme indépendant de PI3K, qui est nécessaire pour la voie stimulée par l'insuline. La contraction des muscles squelettiques active la protéine kinase activée par la 5'-AMP (AMPK), qui est supposée translater des vésicules contenant du GLUT4 sensibles à l'exercice à la surface cellulaire pour médier le transport du glucose; cela se produit pour répondre aux besoins énergétiques accrus du muscle squelettique pendant l'exercice. (Bryant, Govers, and James 2002; Shepherd and Kahn 1999).

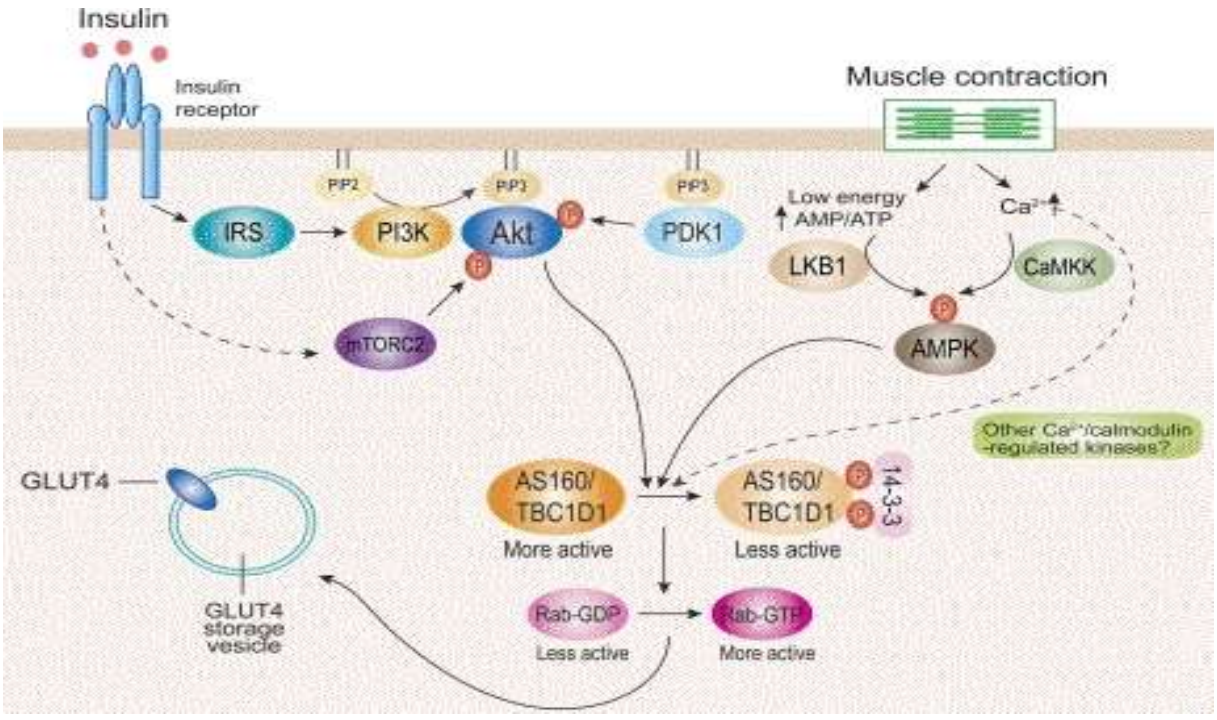


Figure 5. Comparaison des voies de signalisation de la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique médiées et non médiées par l'insuline. Voies de signalisation actuellement proposées pour la translocation du transporteur de glucose stimulé par l'insuline et la contraction (GLUT4) dans le muscle. L'insuline stimule l'Akt par le biais de 2 médiateurs distincts en amont, la protéine kinase-1 dépendante des phosphoinositides (PDK1) et la cible mammifère du complexe de rapamycine-2 (mTORC2). Akt activé phosphoryle AS160 et TBC1D1 principalement à Thr642 et Thr596, respectivement. Cela améliore la liaison du 14-3-3 à ces protéines, ce qui est proposé pour inhiber l'activité de la protéine activatrice de Rab-GTPase (GAP) vers une ou des isoformes de Rab particulières. L'inhibition de GAP favorise la conversion de Rab moins actif chargé en PIB en Rab plus actif chargé en GTP. Le Rab plus actif chargé de GTP permet ensuite aux vésicules de stockage GLUT4 de se déplacer vers la membrane plasmique et de fusionner avec elle. La contraction par épuisement énergétique (c.-à-d., Un rapport AMP / ATP élevé) et [Ca2 +] intracellulaire élevée conduit à l'activation de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) via LKB1 et Ca2 + / protéine kinase kinase dépendante de la calmoduline (CaMKK), respectivement (et éventuellement d'autres protéines kinases régulées par Ca2 +). Ces régulateurs conduisent à la phosphorylation de AS160 et TBC1D1 à plusieurs sites de phosphorylation. On pense que cela régule la fonction de ces protéines et le trafic de GLUT4 par des mécanismes largement non caractérisés. IRS, substrat récepteur de l'insuline; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase.(Sakamoto and Holman 2008)

2.3. La voie GLUT4, une cible thérapeutique ?

En plus de fournir un aperçu considérable du transport des vésicules et de la voie de signalisation de l'insuline, la découverte de GLUT4 a fait progresser notre compréhension du métabolisme du corps entier et en particulier de la diaphonie tissulaire. Plus particulièrement, comme indiqué en 2005, la suppression de GLUT4 spécifiquement dans les adipocytes entraîne des défauts métaboliques majeurs dans tout le corps, y compris dans le foie et les muscles (Yang et al. 2005). Cela soutient le

concept selon lequel des défauts dans la régulation de l'insuline du trafic de GLUT4 pourraient contribuer à la résistance à l'insuline du corps entier chez l'homme. L'impact de la suppression spécifique du tissu de GLUT4 sur les défauts métaboliques dans d'autres tissus a donné lieu à la notion que le métabolisme du glucose dans un tissu régule la libération de facteurs circulants qui influencent le métabolisme ailleurs. Plusieurs de ces facteurs, comme l'hormone sécrétoire RBP4 (Norseen et al. 2012) ou une nouvelle classe de lipides adipocytaires (esters d'acide gras ramifiés d'acides gras hydroxylés) ont été identifiés (Moraes-Vieira, Saghatelian, and Kahn 2016), et la justification de leur participation est vigoureusement recherchée (Hammarstedt et al. 2018).

Des tentatives de manipulation positive de l'absorption du glucose ont également été faites en surexprimant GLUT4 dans divers tissus de souris transgéniques. Alors que ces études ont en général donné des résultats très positifs sur le métabolisme du glucose (Gibbs et al. 1995), elles ont également montré combien il est important de maintenir l'expression de GLUT4 dans sa gamme physiologique. En effet, l'expression supraphysiologique de GLUT4 a provoqué une hypoglycémie, une hypoinsulinémie et une lactacidémie. D'autres stratégies, plus directement axées sur le processus qui est réellement défectueux dans la résistance à l'insuline ou sur les voies utilisées pendant l'exercice pour évoquer la translocation de GLUT4, sont susceptibles d'être plus efficaces.

Malgré les mises en garde avec les études de surexpression de GLUT4, ils ont fourni des indices importants de l'utilité clinique future. Premièrement, comme observé chez les souris surexprimant le GLUT4, l'amélioration de la translocation du GLUT4 médiée par l'insuline dans le muscle réduira probablement la glycémie et, par conséquent, l'insuline également, les deux résultats étant métaboliquement souhaitables dans les états résistants à l'insuline. Une telle approche pourrait être plus efficace que d'autres stratégies, telles que l'administration d'insuline, qui a d'autres conséquences indésirables. Deuxièmement, l'augmentation des niveaux de GLUT4 peut atténuer la lipotoxicité, en particulier dans le foie, une caractéristique commune des maladies métaboliques, en améliorant la capacité des cellules graisseuses à stocker les lipides. Surtout, comme le montre une décennie après le clonage de GLUT4 à partir d'un muscle, une augmentation de son expression est une conséquence physiologique de l'entraînement physique (Daugaard et al. 2000; McGee and Hargreaves 2004), démontrant qu'il existe des voies physiologiques accessibles pour améliorer la redirection du glucose vers ce tissu.

3. Phytothérapie

3.1. Définition

Le mot "phytothérapie" se compose étymologiquement de deux racines grecques : phuton et therapeia qui signifient respectivement "plante" et "traitement". La Phytothérapie peut donc se définir comme étant une discipline allopathique destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de plantes, de parties de plantes ou de préparations à base de plantes

(“Plantes Thérapeutiques WICHTL Max, ANTON Robert” n.d.), qu’elles soient consommées ou utilisées en voie externe.

Depuis 1987, la phytothérapie est reconnue à part entière par l’organisation mondiale de la santé. Il est important de ne pas confondre cette discipline avec la phytopharmacie qui, quant à elle, désigne l'ensemble des substances utilisées pour traiter les plantes, à savoir les pesticides, fongicides, herbicides, ou encore insecticides(“Bien Utiliser Les Plantes En Situation de Soins” n.d.).

On distingue deux types de phytothérapies : traditionnelle et clinique.

Tout d’abord se place la phytothérapie traditionnelle. C'est une thérapie de substitution qui a pour but de traiter les symptômes d’une affection. Ses origines peuvent parfois être très anciennes et elle se base sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement. Les indications qui s’y rapportent sont de première intention, propres au conseil pharmaceutique (*Henri Leclerc* 1999). Elles concernent notamment les pathologies saisonnières depuis les troubles psychosomatiques légers jusqu’aux symptômes hépatobiliaires, en passant par les atteintes digestives ou dermatologiques.

La seconde forme existante est la phytothérapie clinique dite « moderne ». C'est une médecine de terrain dans laquelle le malade passe avant la maladie. Une approche globale du patient et de son environnement est nécessaire pour déterminer le traitement, ainsi qu'un examen clinique complet. La phytothérapie clinique utilise la plante médicinale selon toutes les données issues de la connaissance pharmacologique et certaines données ancestrales confirmées par la pratique clinique, en les réintégrant dans le contexte des connaissances scientifiques, médicales et pharmacologiques actuelles, prenant en compte la notion de totum, les mécanismes de synergie et de potentialisation des différents constituants d'une même plante et des plantes entre elles, ainsi que les réactions physiologiques cliniques qu'elles provoquent sur un individu donné, avec en parallèle la prise en compte du système régulateur de sa fonctionnalité, à savoir le système endocrinien CARILLON A.,2009).

Son mode d’action est basé sur un traitement à long terme agissant sur le système neuro-végétatif. Cette fois-ci les indications sont liées à une thérapeutique de complémentarité. Elles viennent compléter ou renforcer l’efficacité d’un traitement allopathique classique pour des pathologies aiguës d’importance. On va principalement agir sur les effets secondaires.

De nos jours, la Phytothérapie est basée sur les avancées scientifiques et les recherches des extraits actifs des plantes. Une fois identifiés ces derniers sont standardisés. Cette pratique conduit aux phytomédicaments et selon la réglementation en vigueur dans le pays, la circulation de ces derniers est soumise à l'autorisation de mise sur le marché. On parle alors de Pharmacognosie ou de biologie pharmaceutique (Monnier and Potier 2002). La phytothérapie moderne trouve donc sa justification dans la pharmacognosie, aspect multidisciplinaire de la connaissance du végétal et de ses propriétés. Enfin il est important de préciser que connaître une plante, c’est aussi être conscient de ses limites et de ses dangers car la phytothérapie n’est en aucun cas une technique anodine. Son utilisation thérapeutique nécessite une bonne connaissance de la matière médicale.

Le développement de l'utilisation de la phytothérapie et des plantes médicinales comme première stratégie de soin a été stimulée par les différentes publications, conférences et recommandations de l'organisation mondiale de la santé.

L'utilisation de la phytothérapie a divers motifs tels que l'expansion des ressources thérapeutiques, la survie du savoir traditionnel légué depuis des générations et la préservation de la biodiversité, encourager l'agroécologie.

3.2. Historique

L'Histoire de l'aromathérapie se confond avec celle de la phytothérapie jusqu'au XXème siècle. En réalité le terme « aromathérapie », issu du latin « aroma = odeur » et du grec « therapein = soin », fut crée en 1928 par un chercheur lyonnais, Monsieur Gattefossé René-Maurice.

L'existence de systèmes de médecine à base de plantes peut être attestée depuis le Paléolothique moyen, il y a près de 60 000 ans, suites aux découvertes effectuées sur le site archéologique de Shanidar IV, en Iraq. Les premières traces écrites témoignant de l'existence de ce type de médecine datent de 2 600 ans avant notre ère. Les Sumériens, installés en basse Mésopotamie, utilisaient des plantes médicinales et aromatiques telles que le cèdre (Cedrus spp., Pinaceae), le cyprès (Cupressus sempervirens L., Cupressaceae), la myrrhe (Commiphora spp., Burseraceae) ou le jus de pavot (Papaver somniferum L., Papaveraceae) (Gurib-Fakim, A. 2006) .

Parmi les civilisations anciennes ayant fait grand usage des plantes pour se soigner figurent les Chinois et les Egyptiens. Le système de médecine chinoise, basé sur les concepts de yin et de yang, est supposé dater de plus de 5 000 ans, et a en particulier été décrit par l'empereur Shen Nung en 2 500 avant J.C. (Gurib-Fakim, 2006).

Sur le Bassin Méditerranéen, à Babylone on utilisait comme référence la Tablette d'argile de NIPPUR (à 160km de Bagdad), datée de -2500ans avant J-C, et le Code d'HAMMOURABI (-1750 av J-C) en basalte noir. En Egypte, le papyrus d'EBERS, plus ancien « papier » décrivant l'usage des plantes dans la médecine. Le pavot soulageait les maux de tête et les végétaux pouvaient être utilisés lors d'incantations. Des modes d'administration ingénieux y étaient aussi décrit comme les tisanes, les potions, les pommade et les collyres à instiller à l'aide d'une plume de vautour.

En Occident la médecine était pratiquée par les moines qui la voyaient comme un acte de miséricorde plus qu'une discipline intellectuelle. Au XIème siècle, la médecine sort du domaine religieux avec la fondation de l'école de Salerne(Italie) abritant un jardin botanique et de la faculté de médecine de Montpellier accueillant les érudits juifs et arabes. Le bassin méditerranéen est alors le pilier de la connaissance médicale. En 1241, l'édit de Salerne promulgué par Fréderic II, roi de Naples puis empereur d'Allemagne, sépara définitivement la profession de médecin et celle d'apothicaire (« boutiquier » en latin) .

La Renaissance marqua aussi l'époque de la diffusion des connaissances grâce notamment à l'invention de l'imprimerie par Gutenberg en 1454. En Amérique

précolombienne, d'autres drogues végétales furent découvertes. Le coca, le maté et le cacao furent identifiés comme stimulants. En 1492, Christophe Colomb exporta 12 nombre de plantes comme la coca, le quinquina, la salsepareille (contre la Syphilis), le tabac, l'ipéca ou les citrons grâce auxquels il combattait le scorbut sur ses bateaux. Le quinquina fut ensuite exporté en Espagne sous le nom « d'écorce du Pérou » ou «poudre de la comtesse ».

Du XVIIème siècle à nos jours En 1638, un codex officiel fit son apparition à Paris avec des plantes « récemment » importées en Europe comme la vanille, le tabac, le café et l'hamamélis.

Au XXème siècle la phytothérapie fut délaissée au profit des molécules issues de la chimie de synthèse. De grandes avancées scientifiques comme la découverte des antibiotiques par Fleming en 1928 et la vaccination par Pasteur ont révolutionné la médecine. Aujourd'hui la phytothérapie connait un nouvel élan. Les scandales sanitaires seraient-ils responsables d'une perte de confiance en l'industrie pharmaceutique ? Cependant, il ne faut pas opposer ces deux thérapies mais plutôt les considérer comme complémentaires pour le bien être du malade qui est le principal objectif de la médecine.

3.3. Contrôle des plantes médicinales

Les médicaments à base de plantes, élément essentiel des soins de santé dans le monde entier depuis les premiers jours de l'espèce humaine, ils sont encore largement utilisés et ont une importance considérable dans le commerce international. La reconnaissance de leur valeur clinique, pharmaceutique et économique continue de croître, bien que cela varie fortement selon les pays (Fabricant and Farnsworth 2001). Les plantes médicinales sont nécessaires à la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments. Les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs. En vue d'assurer la conservation et la disponibilité de ces plantes pour l'avenir, la réglementation de leur exploitation et de leur exportation est essentielle, tout comme la coopération et la coordination au niveau international. Il est stipulé dans la Convention des Nations Unies sur la diversité biologique que la conservation et l'utilisation durables de la biodiversité sont d'une importance cruciale pour la satisfaction des besoins alimentaires, sanitaires et autres de la population mondiale en croissance. A cet effet, l'accès aux ressources et aux techniques de la génétique ainsi que leur partage sont essentiels. Les contrôles législatifs relatifs aux plantes médicinales n'ont pas évolué autour d'un modèle de contrôle structuré. Les pays définissent de différentes manières les plantes médicinales ou les simples ou produits qui en sont tirés, et ils ont adopté plusieurs approches de l'octroi de licences, de la préparation, de la fabrication et de la commercialisation en vue d'assurer leur innocuité, leur qualité et leur efficacité. Malgré l'utilisation de médicaments à base de plantes pendant de nombreux siècles, seul un nombre relativement petit d'espèces de plantes ont été étudiées pour d'éventuelles applications médicales. Les données

relatives à l'innocuité et à l'efficacité sont disponibles pour un nombre encore plus restreint de plantes, leurs extraits et principes actifs et les préparations qui les contiennent (Jahromi et al. 2021) .

3.4. Recherche de principes actifs

Les plantes ont développé au cours de l'évolution des substances (qu'on nomme ici principes actifs) avec des fonctions différentes, cela peut être un moyen de défense contre des parasites ou autres agresseurs (micro-organismes), une technique pour empêcher la croissance d'autres plantes à proximité et donc lui assurer une bonne nutrition, comme moyen de croissance ou pour le renouvellement de l'espèce
Un principe actif est une molécule présentant un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'Homme ou l'animal. Le principe actif est contenu dans une drogue végétale ou une préparation à base de drogue végétale. Une drogue végétale en l'état ou sous forme de préparation est considérée comme un principe actif dans sa totalité, que ses composants ayant un effet thérapeutique soient connus ou non.
Les Principaux principes actifs recherchés sont :

Alcaloïdes

Les alcaloïdes contiennent un composé organique azoté (N). Les alcaloïdes peuvent représenter des structures complexes. Ces substances sont souvent toxiques ou dangereuses pour l'organisme, surtout à forte dose. Il faudra donc les utiliser sous strict contrôle médical et à un dosage très faible. Des alcaloïdes célèbres sont la scopolamine, l'atropine que nous trouvons dans la morphine, la nicotine, la strychnine, l'aconitine, etc. Plus de 7'000 alcaloïdes différents ont déjà été identifiés (Amirkia and Heinrich 2014).Les alcaloïdes peuvent avoir de précieuses propriétés en pharmacologie : anti-cancéreux, antiparasitaires, etc.

Terpènes et stéroïdes

Les terpènoïdes sont une vaste famille de composés naturels près de 15000 de molécules différentes et de caractère généralement lipophiles, leurs grandes diversités due au nombre de base qui constituent la chaîne principale de formule (C5H8) n selon la variation de nombre n, dont les composés monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes, … (WICHTL et ANTON, 2009). Ces molécules présentent en forme des huiles essentielles ; parfums et goût des plants, pigments (carotène), hormones (acide abscissique), des stérols (cholestérol)

Huiles essentielles

Il s'agit de substances complexes et très riches en principes actifs. Les huiles essentielles sont des composés très volatiles, comme dans les vapeurs d'eau. Le thymol est un composé de l'huile essentielle de thym très utilisé en phytothérapie, en particulier pour soigner les affections des voies respiratoires supérieures.

Phénols et acides phénols (composés phénoliques)

Les phénols ou les acides phénoliques sont des petites molécules constituées d'un noyau benzénique et au moins d'un groupe hydroxyle, elles peuvent être estérifiées, éthérifiées et liées à des sucres sous forme d'hétérosides, ces phénols sont solubles dans les solvants polaires, leur biosynthèse dérive de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique. L'aspirine est un dérivé de la saliciline et de l'acide salicylique (qu'on trouve dans le saule blanc) ainsi que de l'aldéhyde salicylique (qu'on trouve dans la reine-des-prés). Toutes ces molécules appartiennent à la famille des phénols. Les flavonoïdes représentent la plus grande famille des composés phénoliques. On estime que plus de la moitié des composés phénoliques connus (environ 8'000 en 2013 (Quideau et al. 2011) appartiennent à la famille des flavonoïdes.

Les flavonoïdes

Terme en latin ; flavus= jaune. Ont une structure de C6-C3-C6 à poids moléculaire faible, ils peuvent être considérés parmi les agents responsables des couleurs de plante à côté des chlorophylles et caroténoïdes. Les flavonoïdes ont des sous-groupes caractérisés à contenant deux ou plusieurs cycles aromatiques existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, chacun portant une ou plusieurs groupes hydroxyles phénoliques et reliées par un pont carboné. Les flavonoïdes sont généralement des antibactériennes. Ils peuvent être exploités de plusieurs manières dans l'industrie cosmétique et alimentaire (jus de citron) et de l'industrie pharmaceutique (les fleurs de trèfle rouge traitent les rhumes et la grippe en réduisant les sécrétions nasales), comme certains flavonoïdes ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et antivirales (Bruneton 2016).

Anthocyanosides

Les anthocyanosides appartiennent à la fammille des flavonoïdes. Ces pigments peuvent prendre une couleur bleue, rouge ou encore pourpre. On les utilise surtout en cas de troubles circulatoires ainsi que lors d'insuffisance veineuse.

Tanins

Les tanins sont des composés complexes pouvant être solubles dans l'eau ou l'alcool. Ils sont présents en quantité importante dans de nombreuses plantes médicinales et sont souvent très amers. Ils appartiennent à la famille des flavonoïdes. On distingue deux catégories : Les tanins condensés, polymères d'unités flavonoïdes reliées par des liaisons fortes de carbone, non hydrolysable mais peuvent être oxydées par les acides forts libérant des anthocyanidines. Les tanins hydrolysables, polymères à base de glucose dont un radical hydroxyle forme une liaison d'ester avec l'acide gallique.
On peut trouver des tanins principalement dans les cortex, racines, fruits ou feuilles.
Ils ont des propriétés surtout astringentes. Les tanins sont principalement utilisés en usage externe en particulier contre les blessures et plaies (Bruneton 2016)..

Saponosides

Le mot saponoside provient du savon et a donc des propriétés moussantes et détergentes. Ces substances ont à la fois un côté hydrophile et hydrophobe. Elles sont parfois utilisées en cosmétique (ex. saponaire), mais de nos jours on préfère d'autres molécules (obtenue par synthèse chimique en général).
D'un point de vue pharmacologique les saponosides ont des propriétés antitussives et anti-inflammatoires.
Certaines plantes médicinales contenant des saponosides comme le petit houx sont utilisées pour soigner les hémorroïdes.

Lipides

Les lipides sont un groupe diversifié et omniprésent de composés qui ont de nombreuses fonctions biologiques clés, telles qu'agir en tant que composants structurels des membranes cellulaires, servant de sources de stockage d'énergie et participant aux voies de signalisation(Oresic, Hänninen, and Vidal-Puig 2008). La biologie lipidique est devenue une cible de recherche majeure de la révolution post-génomique et de la biologie des systèmes. Le terme «lipide» a été vaguement défini comme l'un quelconque d'un groupe de composés organiques qui sont insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques . Ces caractéristiques chimiques sont présentes dans une large gamme de molécules telles que les acides gras, les phospholipides, les stérols, les sphingolipides, les terpènes et autres (Fahy et al. 2011).

Coumarines

Les coumarines ont une odeur typique de foin coupé.
Ces substances ont surtout des actions veinotoniques et vasoconstrictrices mais aussi contre les troubles digestifs (coriandre).

Caroténoïde

Un groupe de molécules qui appartient aux terpénoïdes. Un caroténoïde important est le lycopène (trouvé dans la tomate.)

Vitamines

Les vitamines sont des subtances chimiques indispensables à l'organisme pour réaliser des réactions chimiques clés pour l'être humain, comme par exemple la transformation d'énérgie (les glucides en ATP). La carence de vitamines ainsi que son excès peuvent mener à de graves maladies ou des complications.
Vitamines liposolubles : Vitamines insolubles dans l'eau : vitamines moins vite éliminées par l'organisme, car un stockage de ces vitamines dans les graisses est possible.
Faire ainsi attention aux excès lors de prise de vitamines liposolubles (vitamines A, D, E et K)
Vitamines hydrosolubles : Vitamines solubles dans l'eau : vitamines plus vites éliminées dans l'urine, car hydrosolubles.

Mais comme elles sont très vite éliminées, il faut en absorber très souvent (quotidiennement) par l'alimentation ou par des compléments alimentaires.

3.5. La notion de « Totum »

L'activité d'un végétal est communément rattachée à la présence du principe actif majoritaire qu'elle renferme. Le terme de "totum" désigne l'ensemble des constituants de la plante supposés actifs, agissant en synergie et par complémentarité pour moduler, modérer ou renforcer l'activité de la drogue. Il est plus efficace que le principe actif isolé et souvent en tempère les effets secondaires. La plante dans son totum présente des potentialités d'action très variées, pour un résultat plus sûr, plus complet sur le terrain du malade. En effet ce n'est pas toujours le principe actif majoritaire qui est responsable de l'effet thérapeutique, ni le marqueur choisi. Par exemple citons le Millepertuis (Hypericum perforatum L.) dont l'hypericine est photosensibilisante et anti-virale alors que se sont les xanthones, et plus particulièrement la kielcorine, qui sont responsables de l'effet IMAO, antidépresseur(*Arnal-Schnébelen,* 2009). C'est l'ensemble des principes actifs du végétal qui confère son activité thérapeutique au végétal. Notons tout de même que certains avis diffèrent quant à cette notion de totum. Il pourrait arriver que des constituants du mélange soient toxiques ou indésirables.

3.6. Avantages de la phytothérapie

La phytothérapie clinique présente de nombreux avantages, qui ont permis d'élargir le champ d'efficacité d'une approche thérapeutique, ainsi que son domaine d'activité dans divers affections fonctionnelles et organiques. Elle présente essentiellement un avantage de multiplicité des principes actifs complémentaires permettant une utilisation à doses pharmacologiquement faibles voire physiologiques, elle présente également un bénéfice des effets de synergie et de potentialisation de l'action thérapeutique de la plante, une excellente tolérance de la plante médicinale qui permet de minimiser les effets secondaires, les problèmes de rebond, de rétrocontrôles négatifs et de dépendance si fréquemment rencontrés avec les médicaments de synthèse, et sans oublier l'aspect économique indéniable (rapport coût/efficacité). (Carillon 2009).

Les pays à revenu faible ont besoin de traitements peu coûteux et efficaces contre les maladies courantes. Les tradipraticiens vivent et travaillent dans la communauté, de sorte que ces traitements sont accessibles à un coût abordable pour la majorité de la population. Le rôle des tradipraticiens devrait être reconnu et la coopération entre ces praticiens et les agents de santé communautaires renforcée.

En Afrique, par exemple, il existe dans 17 pays une instance nationale de gestion ou de coordination des activités de médecine traditionnelle. Une étude récente sur le rapport coût/efficacité de la médecine complémentaire ou parallèle effectuée pour le compte des autorités péruviennes et soutenue par le Bureau régional OMS des Amériques a conclu que, pour neuf pathologies bénignes ou chroniques, le coût direct de l'utilisation de la médecine traditionnelle était inférieur à celui du traitement conventionnel, et que l'efficacité était meilleure et les effets secondaires moins nombreux. Il faut faire des études plus approfondies pour comprendre les différences à plus grande échelle.

La protection du savoir et l'utilisation durable des ressources phytothérapeutiques sont déterminantes pour assurer l'accès à la médecine traditionnelle. L'OMS aide les Etats Membres à recueillir et préserver le savoir en médecine traditionnelle et à établir un inventaire national des plantes médicinales pour que ce savoir soit bien utilisé et se maintienne sur plusieurs générations. Ainsi, le Ministère de la Santé de Côte d'Ivoire a mené une enquête auprès des tradipraticiens et recensé plus de 2000 plantes traditionnellement utilisées. En Inde, une base de données correspondant à l'état actuel des connaissances sur l'ayurveda et les plantes médicinales est déjà dans le domaine public. Le Gouvernement de la République islamique d'Iran a recensé 2500 des 8000 plantes utilisées à des fins médicales. L'information contenue dans ces inventaires devrait être communiquée aux offices nationaux des brevets pour que les données soient dûment examinées lors du traitement des demandes de brevet (OMS, 2003).

3.7. Limites de la phytothérapie

De ce fait, la médecine traditionnelle peut être considérée comme partie intégrante des soins de santé primaire, pour améliorer l'accès aux soins. Ainsi, il faut évaluer l'efficacité clinique, assurer la sécurité des plantes médicinales, renforcer les connaissances et les performances des herboristes tradithérapeutes et garantir un suivi suffisant des patients. Un regain d'intérêt envers la phytothérapie durant ces dernières années a permis d'approfondir l'analyse de son efficacité thérapeutique et surtout de son aspect toxicologique. Ce dernier aspect reste en retrait par rapport à l'avancement de la phytothérapie. En effet, plusieurs études réalisées sur les traitements traditionnels à base de plantes ont fait état de problème de toxicité ou d'interaction pouvant causer des échecs thérapeutiques ou des accidents (Hmamouchi M. 1998) . D'autre part, les principes toxiques des plantes sont peu connus, essentiellement du fait de leur complexité naturelle. Ces plantes médicinales doivent alors, comme les « médicaments conventionnels », obéir à des règles strictes de culture, de contrôle et de dispensation. Actuellement, 205 drogues végétales entrent dans la composition de médicaments dits de phytothérapie et bénéficient d'un dossier allégé d'autorisation de mise sur le marché. En 2007, 62 pays avaient des instituts de médecine traditionnelle, contre 12 en 1970 . L'Organisation Mondiale de la Santé a établi une liste de monographies de plantes médicinales qui est divisée en trois catégories: plantes dont l'utilisation est supportée par des données cliniques, celles dont l'utilisation est supportée par des pharmacopées et des systèmes traditionnels de médecine et celles dont l'utilisation est décrite dans le milieu populaire mais non supportée par des données cliniques et expérimentales(Salhi et al. 2010)

L'Afrique est réputée pour la richesse de sa flore d'où la nécessité de prendre les initiatives pour une meilleure valorisation de ces ressources naturelles. L'Algérie, possédant une richesse importante en plantes(Errajraji, Ouhdouch, and El-Anssari 2010) connaît une incidence non négligeable des intoxications issues des plantes (5.1%).

Toute plante médicinale, dans les conditions normales de son utilisation, est susceptible de générer des effets secondaires généralement indésirables. Dans certaines circonstances, l'usage de plantes peut même être à l'origine d'intoxications.

Parfois, ce sont des substances non végétales, contaminant des plantes, ou encore leur interaction avec les médicaments qui peuvent présenter un risque pour la santé.

Les effets indésirables induits par les plantes médicinales sont généralement mineurs et rares (Posadzki et al. 2013). Il peut s'agir de réactions allergiques, de réactions cutanées type photosensibilisation, ou d'atteintes de différents organes tels que le tractus gastro-intestinal, le foie, les reins, le cœur, le système nerveux central, etc.

Certaines plantes contiennent des substances susceptibles de provoquer des réactions allergiques, notamment la dermatite de contact. Parmi ces substances figurent certaines lactones sesquiterpéniques dont les familles végétales concernées sont les Astéracées, Apiacées, Lauracées, Magnoliacées, etc (Schempp, Schöpf, and Simon 2002).

3.8. Le traitement du diabète par la phytothérapie

La phytothérapie est depuis longtemps une source de médicaments et au fil des ans, de nombreuses tentatives ont été faites pour utiliser des plantes médicinales pour le traitement du diabète. Il a été démontré que plusieurs plantes médicinales et leurs préparations agissent à des points clés du métabolisme glucidique. Les mécanismes d'action les plus courants trouvés comprennent l'inhibition de l'α-glucosidase, l'augmentation de l'expression du GLUT-4 et des PPAR et l'activité antioxydante.

La phytothérapie est depuis longtemps une source de médicaments et il y a eu de nombreuses tentatives d'utilisation de plantes médicinales pour le traitement du diabète au fil des ans(Kooti et al. 2016; Ota and Ulrih 2017) .De plus, le nombre de publications scientifiques concernant la phytothérapie et le diabète de type 2 ne cesse d'augmenter (Tabatabaei-Malazy et al. 2016).

Parmi les mécanismes d'action possibles des produits naturels dans le diabète, tels que l'inhibition de l'α-glucosidase et de l'α-amylase, les effets sur la captation et les transporteurs du glucose, l'augmentation de la sécrétion d'insuline et de la prolifération des cellules β pancréatiques, l'inhibition de L'activité de la protéine tyrosine phosphatase 1B et l'activité antioxydante ont été étudiées en profondeur (Ríos, Francini, and Schinella 2015).

Ci-dessous une revue des activités pharmacologiques des principaux constituants chimiques des plantes médicinales hypoglycémiques identifiées à ce jour (Governa et al. 2018):

Tableau 1. Activités pharmacologiques des principales plantes utilisées contre le DT2

Espèces	Principaux constituants chimique	Activités pharmacologiques	Références
Allium cepa L.	Quercetine	Inhibition de l'α-glucosidase	(Marrelli et al. 2018)
	Rutin	Augmentation de la translocation du GLUT-4 et de l'absorption du glucose; stimulation de l'action de l'insuline	
	l-cysteine sulfoxides Allyl-propyl disulphide	Piégeage des radicaux libres; augmentation de l'activité SOD et catalase	
Azadirachta indica A. Juss.	Azadirachtins	Inhibition de l'α-amylase et de l'α-glucosidase	(Patil, Shirahatti, and Ramu 2021)
Momordica charantia L.	Cucurbitane triterpenoids	Réduction de la glycémie; modulation de la sécrétion d'insuline; stimulation de la translocation de GLUT-4; la régulation à la hausse du substrat-1 du récepteur de l'insuline; augmentation de la phosphorylation de l'AMPK	(Jia et al. 2017)
	EMCD	Réduction de l'expression du TNF-α, de l'iNOS et de la translocation nucléaire de NF-κB	
	Momordin	Induction de l'expression de l'ARNm de PPARγ	
Ocimum tenuiflorum L.	Huile essentiel	Reduction of lipid peroxidation; stimulation of antioxidant enzymes; stimulation of insulin secretion; free radical scavenging activity	(Mahomoodally, Protab, and Aumeeruddy 2019)
Panax ginseng C.A. Meyer, and Panax quinquefolius L	Protopanaxidioles	Augmentation du peptide-1 de type glucagone; réduction de la libération de TNF-α et d'IL-6; augmentation de l'activité de la superoxyde dismutase; réduction de l'activité malondialdéhyde; la régulation à la baisse du coactivateur PPAR-γ la, de la phosphoénolpyruvate carboxykinase et de la glucose-6-phosphatase; augmentation de l'expression de l'ARNm du substrat-1 du récepteur de l'insuline, PI3Kp85, pAkt et GLUT-4	(Shishtar et al. 2014)
	Ginsenoside-Rg1	Induction de l'expression eNOS et VEGF; inhibition de l'apoptose	
	20(S)-ginsenoside-Rg3	Inhibition du stress nitrosatif médié par les récepteurs NMDA; stimulation de l'acide nucléique et du métabolisme énergétique; effet positif sur la flore intestinale	
	Ginsenoside-Rh2	Augmenter la sécrétion de β-endorphine; régulation positive de l'expression de GLUT-4	
Rehmannia glutinosa (Gaertn.)	Polysaccharides	Amélioration de l'homéostasie redox; réduction de l'activité hépatique de la glucose-6-phosphatase; augmentation du taux de glycogène hépatique; réduction de la production de ROS; inhibition de la translocation de NF-κB; régulation à la baisse du TNF-α, COX-2, MCP-1 et protéine inductible-10	(Zhou et al. 2019)
	Catalpole	Inhibition de la production intracellulaire de ROS; suppression de l'activité de la NADPH-oxydase	
Trigonella foenum-graecum L.	Trigonelline	Activité antioxydante; modulation du métabolisme du glucose; induction de la régénération des cellules β	(Gong et al. 2016)
	Diosgenin	Augmentation de la sécrétion d'insuline; l'induction de la régénération des cellules β; activité antioxydante; promotion de la différenciation des adipocytes; amélioration de l'absorption du glucose insulino-dépendant	
	4-hydroxyisoleucine	Stimulation de la sécrétion d'insuline dépendante du glucose; réduction de la résistance à l'insuline; inhibition de la saccharose α-d-glucosidase et α-amylase	
	Fiber	Inhibition des enzymes hydrolysant les lipides et les glucides; réduction de l'absorption de glucose	
Gymnema sylvestre (Retz.) R.Br. ex Sm.	Acide gymnemique; gymnemasaponines gurmarin	Augmentation de la sécrétion d'insuline; l'induction de la régénération des cellules β; réduction de l'absorption intestinale et glycémique	(Tiwari, Ahmad, and Baig 2017)
Cinnamomum verum J. Presl. and Cinnamomum cassia (L.) J. Presl.	Cinnamaldehyde	Effet insulino tropique; régulation de la protéine-tyrosine phosphatase 1B; la régulation du récepteur de l'insuline kinase; modulation du métabolisme des glucides; inhibition de l'amylase et de la glucosidase pancréatiques et intestinales; stimulation de l'absorption cellulaire du glucose; augmentation de l'expression de GLUT-4; augmentation de l'expression des PPAR.	(Santos and da Silva 2018)

4. *Citrullus colocynthis*

Citrullus colocynthis (L) Schrad est une espèce de la famille des cucurbitacées, cette famille est reconnue pour sa diversité génétique(Zaini et al. 2011).

Citrullus colocynthis est communément appelée coloquinte en français, handal en arabe ou encore la pomme amère en anglais.

La coloquinte est retrouvée dans différentes zones désertiques et semi désertiques du monde telles que l'Iran, l'Egypte, l'Algérie, l'Australie…

Cette plante est très rependue en médecine traditionnelle, elle est utilisée comme remède contre les hyperglycémie, la jaunisse et l'asthme (Qureshi et al. 2010)(Shahin-Kaleybar et al. 2020).

La coloquinte est souvent citée dans des ouvrages historiques, elle était populaire chez les civilisations gréco-romaines, pendant l'âge d'or des arabes où elle a été citée par Ibn E Baytar dans ses ouvrages, elle a également été citée par Hippocrate qui en 460 avant. J.-C- la recommandait comme purgatif. Un herbier Anglais du 11ème siècle décrivait également les biens faits de la coloquinte dans ses écrits.

Le fruit de la coloquinte a été introduit en Espagne et à Chypre par les arabes pendant le moyen âge. (Carillon 2009) (Schempp, Schöpf, and Simon 2002)

4.1. Description botanique

La coloquinte pousse de façon spontanée dans les sols arides, elle occupe une zone géographie très vaste qui s'étend du sahara, désert d'Arabie, Soudan, sud de l'Asie incluant l'Inde et le Pakistan jusqu'en Australie(Selvaraj and Kaliamurthi 2010; B. Marzouk et al. 2011), elle est peu présente dans les régions tempérées.

La coloquinte est une plante monoïque (fleurs males et fleurs femelles séparées) rampante, herbacée annuelle ou vivace de la famille des cucurbitacées.

La pollinisation se fait naturellement par des insectes. La plante fleurit entre Avril et Mai, elle est entièrement couverte de poils courts, et possède des racines charnues.

Les tiges sont rampantes munies de vrilles de 0,5 à 1,5 m de longueur, portant des feuilles multilobées et velues de couleur verte, profondément découpées en lobes velues. Les fleurs sont bisexuées, solitaires, auxiliaires à 5 lobes et de couleur jaune pâle. Le fruit appelé péponide ou gourde est une baie sphérique et lisse à écorce dure de 7 à 10 cm de diamètre, de couleur verte puis ocre à maturité à sarcocarpe spongieux qui renferme entre 200 à 300 graines brunes, lisses, ovales et insipides de 6 mm de long. La totalité des graines représente 75% du poids du fruit. Le fruit est d'un gout très amer(Hammiche and Maiza 2006).

Figure 6. Description phénotypique de *Citrullus colocynthis*

4.2. Taxonomie

Règne : Végétal

Sous règne : Plantes vasculaires

Embranchement : Ptéridophytes

Sous embranchement : Angiospermes

Super division : Spermaphytes

Division : angiospermes

Classe : dicotylédones

Sous classe : dialypétales

Série : Gamopétales tétra cycliques inférovariées à étamines libres

Ordre : Curcubitaceae

Genre : Citrullus

Espèce : colocynthis

Figure 7. Fruit de *Citrullus colocynthis* séché utilisé en laboratoire pour les extractions

4.3. Phytochimie de *Citrullus Colocynthis*

Plusieurs composés bioactifs du fruit de *Citrullus colocynthis* ont été cités dans la littérature. Les produits naturels exercent souvent des effets pléiotropes, une caractéristique qui peut s'avérer particulièrement avantageuse.

Les composés bioactifs sont regroupés sous la forme de glycosides, de flavonoïdes, d'alcaloïdes, de glucides, d'acides gras et d'huiles essentielles(Najafi et al. 2010). Les alcaloïdes vinblastine et camptothécine et leurs dérivés respectifs ainsi que les terpénoïdes et leurs dérivés ont été les produits naturels les plus pertinents introduits dans la pratique clinique. Pour cette raison, l'intérêt pour l'élucidation de nouvelles structures de constituants de métabolites secondaires à partir de ces sources reste élevé. D'autres triterpènes peuvent constituer un groupe prometteur d'agents thérapeutiques contre le cancer, notamment l'acide ursolique et l'acide oléanolique.

Les cucurbitacines sont des métabolites secondaires dont les cucurbitacées sont la source la plus connue. Elles se rencontrent plus particulièrement dans les espèces végétales de la famille des Cucurbitacées. On les rencontre également dans d'autres familles comme les Brassicaceae, Scrophulariaceae, Begoniaceae, Cruciferae, Elaeocarpaceae, Datiscaceae, Desfontainiaceae, Polemoniaceae, Primulaceae, Rubiaceae, Scrofulariaceae, Sterculiaceae, Rosaceae et Thymelaeaceae. Selon les différentes familles, elles sont localisées dans les racines, les feuilles, les rhizomes, les fruits ou les graines de la plante. A l'exception des dérivés hétérosidiques des

cucurbitacines, ces substances présentent un goût très amer qui permet de protéger les plantes des herbivores. De nombreux travaux sur l'isolement de ces principes actifs ont été menés avec succès. C'est ainsi qu'une vingtaine de ces substances ont été isolées et identifiées par les lettres de l'alphabet : cucurbitacines A, B, C, D, E, I, J, K, Q…(Zheng et al. 2020) .

Ils contiennent un groupe méthyle situé en C9 et un groupe diméthyle en C4. En outre, ils permettent divers degrés de substitution et d'insaturation pour fournir un grand nombre et une grande variété de composés chimiques, tous avec plusieurs caractéristiques communes. Par exemple, toutes les cucurbitacines connues (tableau 2) présentent une double liaison entre C5-C6, et beaucoup d'entre elles présentent une double liaison au niveau de C1 et / ou C23. Souvent, de nombreux carbones sont oxygénés, conférant ainsi à cette famille de composés un haut degré d'oxydation. Les hydroxyles sont généralement présents en C16, C20 et C25, tandis que les carbonyles peuvent être présents en C11 et C22. Pour leur part, C2 et C3 peuvent être indistinctement substitués par des groupes hydroxyle ou carbonyle. L'hydroxyle en C25 est parfois acétylé. Enfin, les cucurbitacines se retrouvent sous forme libre ou glycosidique, cette dernière étant généralement liée à la présence d'un hydroxyle en C2 , C3 et / ou C25 pour les monosides ou en C26 ou C27 pour les bisdesmosides. En général, différentes cucurbitacines sont distinguées par des lettres, par ex. les cucurbitacines B, D ou E; cependant, certains d'entre eux sont décrits en référence à leur structure chimique ou à leur modification, par ex. 23,24-dihydrocucurbitacine B ou 3-épi-cucurbitacine F (Hussain et al. 2019).

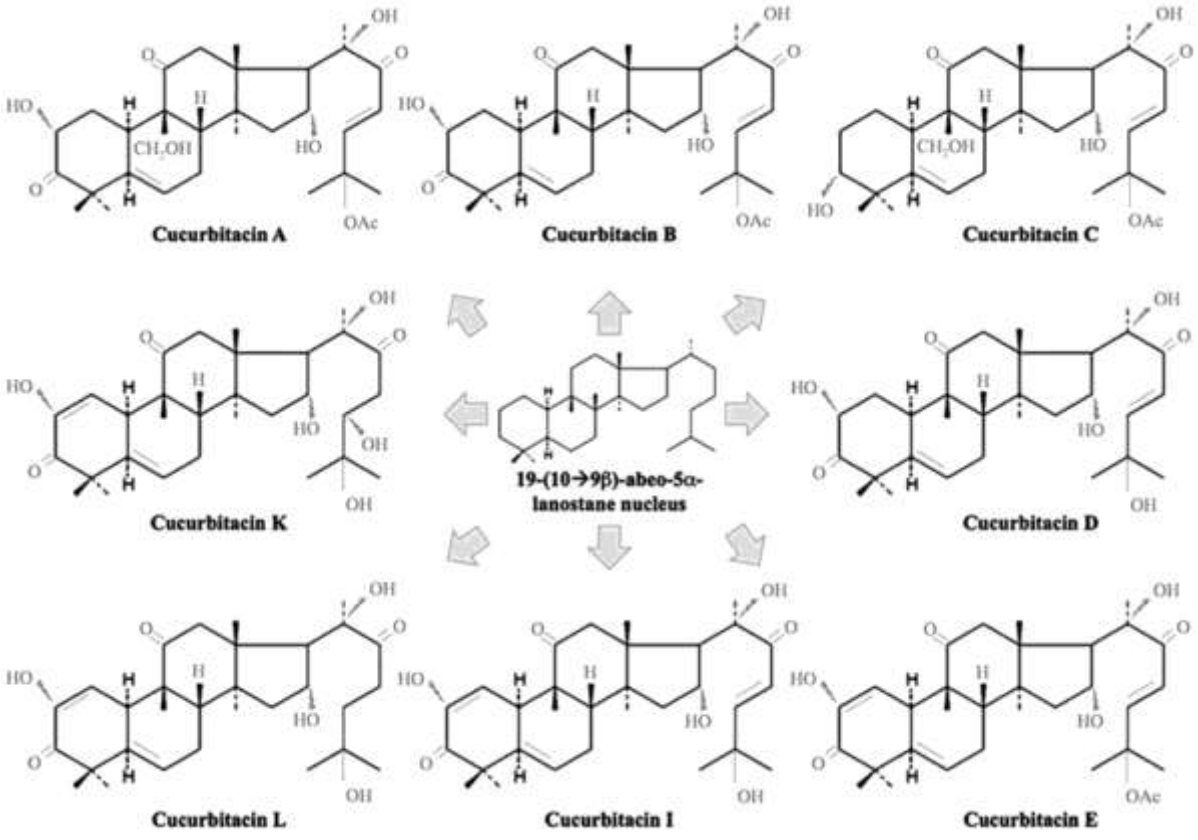


Figure 8. *Structure des variétés de cucurbitacines* (Sukant 2017)

Tableau 2. *Variétés de cucurbitacines isolées et identifiées à partir de Citrullus colocynthis (Chawech, Mhalla, et al. 2015)*

Molécule	Source	Formule	Masse (g/mol)
Cucurbitacine A	Cucumis	C32H46O9	574
Cucurbitacine B	Cucurbitacea	C32H46O8	558
Cucurbitacine C	Cucumis	C32H48O8	560
Cucurbitacine D	Ubiquitaire	C30H44O7	516
Cucurbitacine E	C. colocynthis	C32H44O8	556
Cucurbitacine F	Cucurbitacea	C30H46O7	518
Cucurbitacine G		C30H46O8	534
Cucurbitacine H		C30H46O8	534
Cucurbitacine I	C. colocynthis	C30H42O7	514
Cucurbitacine J	Cucurbitacea	C30H44O8	532
Cucurbitacine K		C30H44O8	532
Cucurbitacine L		C30H44O7	516
Cucurbitacine O		C30H46O7	518
Cucurbitacine P		C30H48O7	520
Cucurbitacine Q		C32H48O8	560
Cucurbitacine S		C30H42O6	498
2-O-β-D- glucopyranosyl-cucurbitacin E	C. colocynthis	C38H54O13	718
2-O-β-D- glucopyranosyl-cucurbitacin I		C36H52O12	676
2-O-β-D- glucopyranosyl-cucurbitacin L		C36H54O12	678
2-O-β-D- glucopyranosyl-cucurbitacin J		$C_{36}H_{54}O_{13}$	694
2-O-β-D- glucopyranosyl-cucurbitacin K		$C_{36}H_{54}O_{13}$	694
2-O-β-D- glucopyranosyl-cucurbitacin B		$C_{38}H_{56}O_{13}$	720
dihydrocucurbitacine E		C32H46O8	558
Khekadaengoside K (Hexanocucurbitacine I glycosylée)		C30H42O10	562
Dihydrocucurbitacine B		C32H48O8	560
colocynthine B		C37H54O12	690

4.4. Utilisation en médecine traditionnelle

La coloquinte est très populaire en médecine traditionnelle dans différents pays, elle est utilisée pour le traitement d'un certain nombre de maladies telles que le diabète, la constipation, la lèpre, l'asthme, la bronchite, la jaunisse, les douleurs articulaires et le cancer (Asyaz et al. 2010). Les utilisations médicinales de cette plante ont été rapportées par l'héritage de médecines indigènes au Pakistan, en Inde, en Chine, en Afrique et en Asie, notamment dans les troubles intestinaux tels que l'indigestion, la dysenterie, la gastro-entérite et les coliques, mal aux dents, plaies et diabète.

Dans les pays tropicaux et subtropicaux, *Citrullus colocynthis* est traditionnellement utilisé comme médicament antidiabétique (Huseini et al. 2009; Rahbar and Nabipour 2010).

Au Maroc, elle est également utilisée pour traiter le diabète et l'hypertension(Tahraoui et al. 2007).

Au Pakistan et en Inde, les fruits sont utilisés pour le traitement des troubles intestinaux, des infections bactériennes, du diabète et du cancer chez les humains et les animaux (Dhakad, Sharma, and Kumar 2017).

Une décoction des différentes parties de cette plante est utilisée pour soigner la douleur rhumatismale et comme agents anticancéreux et hépatoprotecteurs (Barth, Müller, and Dürrling 2002). En Algérie, en Tunisie et dans d'autres pays méditerranéens, différentes parties de cette plante, notamment les fruits et les graines, sont souvent utilisées pour traiter les infections urinaires (Belsem Marzouk et al. 2010), en plus de traiter de nombreuses autres maladies telles que l'hypertension, les rhumatismes, problèmes et infections pulmonaires et gynécologiques.

En Arabie Saoudite, les fruits de *Citrullus colocynthis* sont utilisés comme purgatif, antirhumatismal, anthelminthique, carminatif et comme remède contre les maux de gorge et les infections cutanées(Adam, Al-Yahya, and Al-Farhan 2001). Le fruit est également un purificateur de sang et un remède pour les tumeurs et l'élargissement de la rate.

Les graines de *Citrullus colocynthis* sont utilisées pour le traitement du diabète, tandis que les feuilles sont utilisées pour le traitement de la jaunisse et de l'asthme (Qureshi et al., 2010).

4.5. Toxicité

La toxicité des plantes médicinales peut être liée à des mélanges de composés actifs qu'elles contiennent, leurs interactions avec d'autres herbes, les médicaments et les contaminants. En effet, les plantes contiennent des mélanges complexes de terpènes, alcaloïdes, des saponines et autres substances chimiques. Ce qui augmente le risque de réactions indésirables par leurs effets additifs ou synergiques des interactions chimiques.

Depuis l'antiquité, les fruits de la coloquinte sont considérés comme un poison mortel. La coloquinte est une plante irritante, elle agit même à des doses modérées, produisant des inflammations de la muqueuse intestinale, des vomissements et du sang dans les selles. Les effets toxiques après utilisation chronique des fruits de cette plante, provoquent une hypokaliémie, une oligurie et des oedèmes, semblables à une néphrite aigue(Yaniv, Shabelsky, and Schafferman 1999).

4.6. Activités biologiques de la coloquinte

4.6.1. Activité antioxydante

L'effet piégeur de radicaux libres de la coloquinte augmente avec l'augmentation de la concentration et l'activité antioxydante maximale a été observée à 2500 mg mL-1.

L'activité antioxydante peut être due à des composés phénoliques présents dans les extraits de coloquinte.

Selon la littérature, les polyphénols et les flavonoïdes sont connus pour leur pouvoir antioxydant. Tels que la capacité antioxydante des flavonoïdes dépend de leur structure chimique, en particulier du groupe 3 ', 4'-orthodihydroxy sur le cycle B et du groupe 4-carbonyle sur le cycle C. Les groupes 3-OH et 5-OH sur le cycle C sont également pertinents pour l'effet antioxydant. L'absence d'une structure O-dihydroxy sur le cycle B fournit une structure de catéchol qui peut compenser l'activité antioxydante des flavonoïdes. Dans le cas des flavonols (quercétine, myricétine, kaemoferol), le groupe hydroxyle situé sur le cycle C3 du cycle C est recommandé comme site critique pour les radicaux libres piégeurs.

4.6.2. Activité antidiabétique

Des résultats de travaux révèlent que des modèles animaux (rats, souris) diabétiques traités à la coloquinte présentent après traitement :

- une régulation du taux de l'hémoglobine glyquée (Barghamdi et al. 2016)
- une amélioration de la sensibilité à l'insuline, une augmentation de la taille du pancréas (Sebbagh et al. 2009),
- une stimulation de la sécrétion d'insuline par les ilots pancréatiques(Ebrahimi et al. 2016).
- un effet protecteur et/ou régénérateur vis-à-vis de la masse des cellules pancréatiques des rats rendus diabétiques par la streptozotocine.
- une régénération des ilots de Langerhans (Ismail et al. 2016; Oryan et al. 2014)
- la coloquinte aurait également un effet préventif contre le diabète et l'obésité.

Sur le plan moléculaire, les rats diabétiques traités à la coloquinte ont montré une régulation positive significative dans les expressions d'ARNm des enzymes antioxydants, de l'insuline, pyruvate kinase, GLUT-2 dans le foie et AQP1, AQP5, AQP7 et AQP8 dans les reins, les glandes salivaires et le pancréas.

Les examens immunohistochimiques ont révélé une régulation négative de l'insuline et des GLUT-2 dans le pancréas et une régulation positive de l'AQP2 dans le rein des

rats diabétiques, mais des traitements à la coloquinte augmentent l'effet de l'insuline et restauraient leur expression à la normale.

Enfin, l'administration orale de coloquinte induit une activité antihyperglycémique, antihyperlipidémique, antioxydante, hépatoprotectrice et rénoprotectrice chez des rats diabétiques induits par la streptozotocine (Lahfa et al. 2017).

Pour fournir des bases scientifiques à l'utilisation médicinale de *Citrullus colocynthis* comme remède antidiabétique, divers chercheurs ont mené des études scientifiques sur ses différentes parties. En ce qui concerne la préparation de l'extrait de la partie souhaitée, la partie de la plante séchée (graines, fruits, racines, écorces ou feuilles) est coupée en poudre et une quantité pesée de la poudre est soumise à une extraction au solvant à l'aide d'un instrument approprié tel que Soxhlet appareil et système solvant / solvant approprié à une température appropriée. Le marc est entièrement séché et pesé avant et après chaque extraction suivie de la concentration de l'extrait à sec à 40 ° C sous pression réduite dans un évaporateur rotatif sous vide (Agarwal et al. 2012).

Nous avons identifié deux études dans la littérature, qui impliquaient l'utilisation d'extrait de racine de *Citrullus colocynthis*. L'une d'elles a été menée par Agarwal et al. (Agarwal et al. 2012), qui ont évalué les paramètres biochimiques de rats diabétiques, après administration d'extraits aqueux, chloroformes et éthanoliques de racine de *Citrullus colocynthis* pour observer son effet thérapeutique. L'extrait aqueux a illustré un effet hypoglycémiant notable (58,70%) par rapport aux extraits de chloroforme (34,72%) et d'éthanol (36,60%). Les extraits aqueux présentaient des taux sériques améliorés d'urée, de protéines et de lipides ainsi que le taux sérique récupéré de bilirubine, de glutamate oxaloacétate transaminase, de glutamate pyruvate transminase et de phosphatase alcaline.

Dans une autre expérience, les chercheurs ont administré 50 mg et 100 mg d'extrait de racine de *Citrullus colocynthis* par kilogramme de poids corporel de rat pendant 28 jours pour l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de *Citrullus colocynthis*. Les données hématologiques, histopathologiques et biochimiques ont montré un effet antidiabétique significatif de *Citrullus colocynthis* et une absence de toxicité chez le rat à la dose d'antidiabétique (Atole et al. 2009).

Rajangam et coll. (Rajangam et al. 2009) ont rapporté un effet hypoglycémiant significatif de l'extrait d'éther de pétrole de la pulpe de fruit de *Citrullus colocynthis* chez des rats après administration orale de deux doses différentes, à savoir 300 et 500 mg d'extrait de fruit de *Citrullus colocynthis* par kilogramme de poids de rat.

Dans une autre étude menée sur 36 lapins blancs mâles néo-zélandais en Iran, l'effet antidiabétique de la pulpe de fruit de *Citrullus colocynthis* ainsi que de l'extrait de graine a été déterminé. Par rapport au groupe témoin, un effet hypoglycémiant significatif a été observé après administration orale de 100 mg d'extrait de pulpe de *Citrullus colocythis* par kilogramme de poids de lapin (Dashti et al. 2011).

L'extrait de pulpe de *Citrullus colocynthis* a de nouveau été utilisé par Khalil et al., En 2010, pour étudier son effet sur le foie de rats (Khalil 2010). Par rapport au groupe

témoin, l'étude histologique du foie de rats traités par *Citrullus colocynthis* a montré des changements significativement moindres. Alternativement, les rats diabétiques ont retrouvé une histologie normale de leur foie après avoir traité avec l'extrait de pulpe de *Citrullus colocynthis*.

Alia Amin (Amin, Tahir, and Lone 2017), a observé l'effet de *Citrullus colocynthis* sur la régénération des cellules bêta et le système vasculaire intra-îlot. *Citrullus colocynthis* a stabilisé le poids corporel des rats et la différence était statistiquement significative aux jours 7 ($p < 0,013$) et 14 ($p < 0,001$). *Citrullus colocynthis* a réduit de manière significative ($p < 0,001$) le taux de sucre dans le sang à jeun en fonction de la dose et du temps. Il a augmenté le diamètre des îlots ($p < 0,001$) et le nombre de cellules bêta ($p < 0,001$).

El-Baky et Amin(El-Baky and Amin, 2011) ont rapporté que les complications diabétiques impliquant des microvaisseaux se traduisent par une néphropathie due à une filtration excessive de divers composés comme les sucres. Dans ce contexte, l'effet de l'extrait de fruits de *Citrullus colocynthis* sur la prévention de la néphropathie diabétique a été illustré chez des rats albinos mâles diabetiques. Selon les résultats, les taux de glucose sanguin, d'urée, de créatinine, d'albumine et d'acide urique ont été considérablement abaissés. Selon les résultats histopathologiques, l'extrait de fruit de *Citrullus colocynthis* a des effets néphroprotecteurs concluant que la pulpe de fruit de *Citrullus colocynthis* peut exercer des influences néphroprotectrices sur le fonctionnement des tissus rénaux.

Dans une autre étude Ostovar et al (Ostovar et al. 2020)a examiné les effets biochimiques, histopathologiques et physiologiques de *Citrullus colocynthis* sur la neuropathie périphérique chez des rats atteints de diabète induit par la streptozotocine, Les résultats métaboliques (poids corporel et glycémie) ont été améliorés dans les groupes traités par *Citrullus colocynthis* par rapport au placebo. Les tests de coup de queue et de plaque chauffante avaient également une latence plus faible dans les groupes traités par *Citurullus colocynthis.* La mesure des marqueurs du stress oxydatif (malondialdéhyde, superoxyde dismutase et catalase) a montré l'effet antioxydant de Citrullus colocynthis. L'évaluation histologique du nerf sciatique a montré que *Citrullus colocynthis* diminuait le nombre de fibres nerveuses démyélinisées et dégénérées.

Nous avons également identifié deux de ces études dans la littérature, qui impliquaient l'utilisation d'extrait de graines de *Citrullus colocynthis*. Sebbagh et coll. (Sebbagh et al. 2009) ont comparé le potentiel antidiabétique de *Citrullus colocynthis*, des huiles de tournesol ou d'olive dans le diabète induit par la streptozotocine chez le rat et ont constaté qu'une alimentation riche en huile de *Citrullus colocynthis* exerçait un effet hypoglycémiant significativement plus élevé chez les rats administrés avec ou sans l'insuline par rapport aux aliments contenant d'autres huiles. En conclusion, les résultats ont rapporté que l'effet antidiabétique de l'huile de *Citrullus colocynthis* se produit par la préservation ou la restauration des cellules β pancréatiques chez les rats rendus diabétiques.

Lakshmi et coll. (Lakshmi, Sendrayaperumal, and Subramanian 2013) ont testé l'extrait ethanolique (aux doses orales de 250 mg / kg de poids corporel) de graines de *Citrullus colocynthis* pour sa fonction hypoglycémique chez les rats diabétiques, Après l'administration d'extraits, les valeurs de ces paramètres biochimiques sont revenues

de manière significative à leurs niveaux approximativement normaux avec l'amélioration de leur niveau de glycogène. En conclusion, l'extrait de graines de *Citrullus colocynthis* a une activité hypoglycémique similaire au médicament hypoglycémiant oral standard, le gliclazide.

Nous avons également identifié une étude dans la littérature, qui impliquait l'utilisation d'extrait de feuilles de *Citrullus colocynthis*. Gurudeeban et Ramanathan (Gurudeeban 2010) ont étudié l'influence hypoglycémique de *Citrullus colocynthis* sur l'hexokinase hépatique et les enzymes gluconéogéniques comme la glucose-6-phosphatase et la fructose 1,6-bisphosphatase de rats témoins et diabétiques après ingestion orale de sa suspension de feuilles à des doses de 250 mg / kg et 500 mg / kg de poids corporel pendant soixante jours et ont constaté une baisse significative de la glycémie de 381 ± 34 à 105 ± 35 mg / dL. Il y avait une réduction des activités de la glucose-6 phosphatase et de la fructose 1,6-bisphosphatase, et une augmentation de l'activité hexokinase hépatique soutenant l'importance hypoglycémique de cette plante médicinale.

4.6.3. Activité antitumorale

Récemment, des travaux ont révélé l'activité anti-tumorale de la coloquinte et ce grâce à l'action antimitotique de la cucurbitacine I qui est un composant majeur de la coloquinte, ce dernier induit la co-agrégation de l'actine et de la myosine II qui est associée au blocage de la migration cellulaire et à la division qui aboutit finalement à l'apoptose des cellules cancéreuses(Sari-Hassoun et al. 2016).

La cucurbitacine I induit effectivement la co-agrégation de l'actine avec la phosphomyosine II. Cette co-agrégation résulte très probablement de la stimulation de la voie Rho / ROCK et de l'inhibition directe de la LIMKinase.Les résultats aident à comprendre l'impact des cucurbitacines sur la transduction du signal et la dynamique de l'actine et ouvrir de nouvelles perspectives pour l'utiliser comme candidats-médicaments pour la recherche sur le cancer.

Ce nouveau point de vue réactive l'intérêt que l'on peut avoir pour les cucurbitacines car ces molécules semblent intéressantes pour la recherche afin d'étudier l'impact de la modification de cascades de signalisation spécifiques. Les données ouvrent également pour l'avenir, la possibilité d'étudier les relations structure-activité de ces molécules pour fournir de nouveaux dérivés de la cucurbitacine qui pourraient être pertinents en tant que futurs médicaments candidats pour lutter contre le cancer.

4.6.4. Activité antiparasitaire et insecticide

L'étude de l'activité antiparasitaire de la coloquinte a montré que moins de 5ug/ml d'extrait inhibe la croissance parasitaire à plus de 50% de *Plasmodium falciparum*.

Les extraits de feuilles de *Citrullus colocynthis* ont montré des propriétés

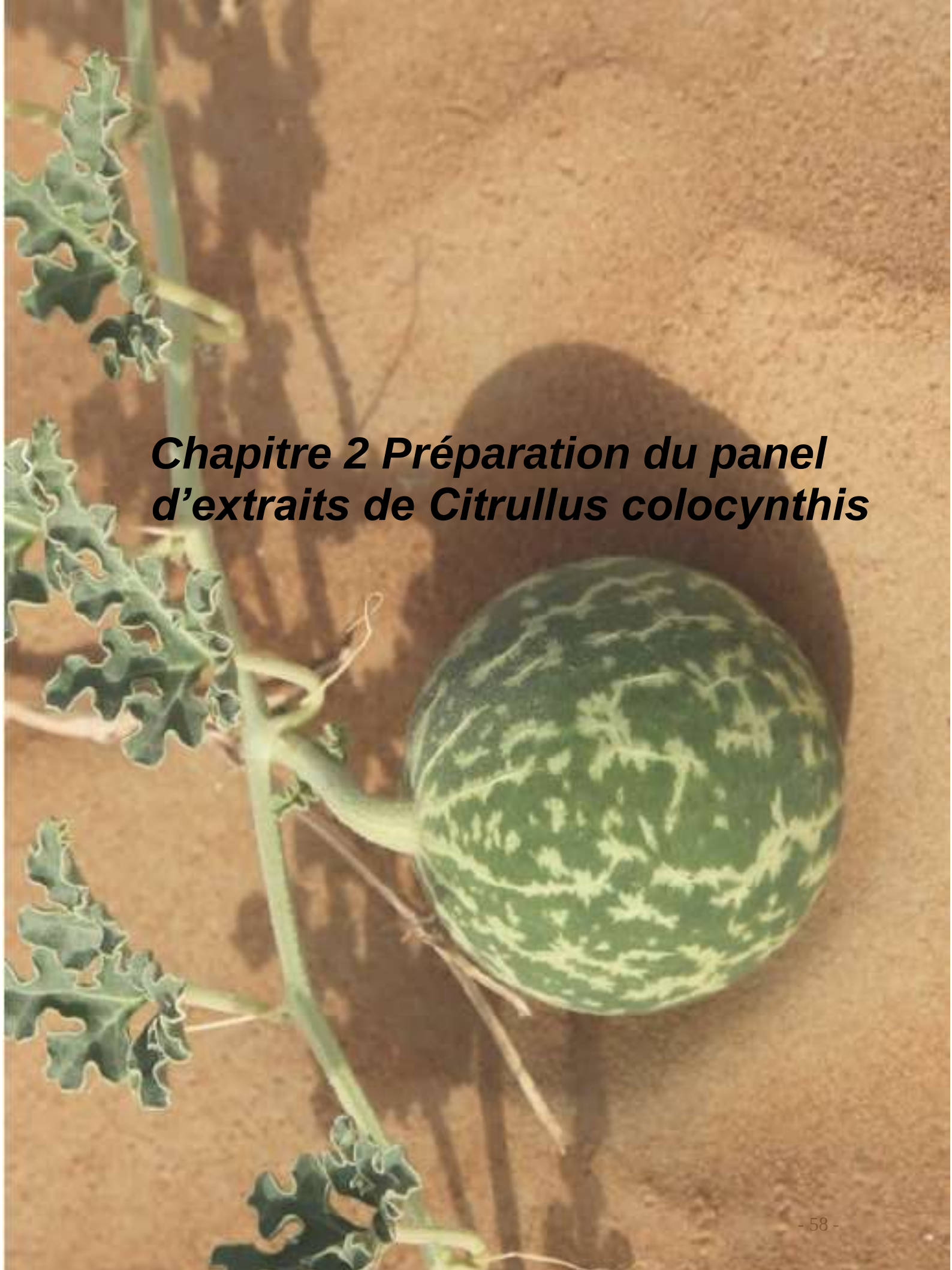
- larvicides, ovicides et de répulsion contre le moustique de *Culex quinquefasciatus*
- larvicides contre les larves du quatrième stade *d'Anopheles stephensi Aedes aegypti* et *Culex quinque fasciatus*

- insecticide contre *Triboliumcustaneum*
- larvicides contre les larves du 3ème stade de *Culex quinque fasciatus*, *Anopheles stephensi* et *Aedes aegyptv*

Tableau 3. *Synthèse des propriétés pharmacologiques des extraits des différentes parties : pulpe, graine et écorce.*

Pays	Métabolites/ parties utilisées	Effets thérapeutiques	Référence
Tunisie	Extrait aqueux et Extrait acétone (différentes parties)	Propriété analgésique et anti-inflammatoire	(Belsem Marzouk et al. 2009)
	Extrait aqueux des fruits	Propriété analgésique et anti-inflammatoire	(Belsem Marzouk et al. 2010)
	Extrait aqueux (feuilles)	Effet anticoagulant et anti microbien	(Belsem Marzouk et al. 2012)
Algérie	Extrait aqueux (fruits)	Activité immunostimulante	(Bendjeddou, Lalaoui, and Satta 2003)
	Huile fixe des graines	Hypolipidémiant chez des rats obèses	(Sebbagh et al. 2009)
Maroc	β-(Pyrazol-1-yl-)-L-alanine (Graines)	Activité insulino-stimulante	(Nmila et al. 2000)
Egypte	Extrait des graines	Effets hypoglycémiant, hypolipidémiant chez des rats normaux et rendus diabétiques Activité antifongique et antibactérienne	(Abdullah et al. 2010)
Soudan	Graines		(Aljabry, Alrasheid, and Ramadan 2019)
Iraq	Extrait aqueux, Saponines, alcaloïdes et glycosides	Effets hypoglycémiant et anti-hyperglycémiant Chez des lapins normaux et rendus diabétiques par l'alloxane	(Abdel-Hassan, Abdel-Barry, and Mohammeda 2000)
Pakistan	Extrait méthanolique (fruits)	Anti hémorragique et contre les morsures de serpents	(MHHB Asad 2012)
Inde	Extrait méthanolique (Fruits)	Pouvoir antioxydant	(Kumar et al. 2008)
	Extrait méthanolique (graines)	Antiulcéreux	(Gill et al. 2011)
	Extrait méthanolique (feuilles)	Activité anti-inflammatoire	(Rajamanickam et al. 2010)
	Extrait d'éther de pétrole (Fruits)	Effets anti diabétiques chez les rats rendus diabétiques par STZ*	(Rajangam et al. 2009)
	Extraits aqueux, éthanolique et chloroformique (racines)	Effet hypoglycémiant sur des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane	(Agarwal et al. 2012)
Iran	Flavonoïdes (Fruits)	Pouvoir antioxydant	(Delazar et al. 2006)
	Poudre (Fruits)	Effet antidiabétique sur des patients diabétiques	(Huseini et al. 2009)
	Extrait des graines et de pulpe	Effets hypoglycémiant sur lapins normaux et rendus	(Dashti et al. 2011)

		diabétiques par l'alloxane	



Chapitre 2 Préparation du panel d'extraits de Citrullus colocynthis

I. Matériel et méthode

1. Extractions

1.1. Récolte et préparation de la matière végétale

Dans un but de confirmation de la reproductibilité de nos résultats, deux séries d'extractions ont été réalisés sur la même récolte, et sur une récolte différente de ce fait nous avons obtenu 3 séries d'extractions. Les deux collectes des fruits de coloquinte *(C. colocynthis*) se sont faites en septembre 2016 et septembre 2017 dans la région de Ain Sefra (Sud Oued de l'Algérie). Les fruits ont été récoltés à maturité puis ont été séchés pendant plusieurs semaines dans un endroit tempéré et à l'abri de la lumière.

Les fruits ont été identifiés au sein du laboratoire antibiotiques, antifongiques, physico chimique synthèse et activité biologique à l'université de Tlemcen.

Après séchage des fruits, la pulpe a été séparée de la graine et de l'écorce. Dans le but d'une étude comparative entre les activités des 2 parties du fruit de coloquinte des extractions ont été réalisées séparément.

Figure 9. Photographie d'un fruit de *Citrullus colocynthis* mure. Ain Sefra, Algérie- 2016.

1.2. Les extraits bruts

L'extraction des métabolites secondaires de végétaux est influencée par différents facteurs comme le pH, la température, le rapport quantité de matière au volume du solvant et le temps d'extraction.

Le procédé d'extraction est basé sur la différence des solubilités des composés d'un mélange dans un solvant. Le mélange peut être solide ou liquide et le solvant liquide ou fluide supercritique.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés aux procédés d'extraction d'un système solide : la plante. Le mode d'extraction utilisé dans notre travail est la macération. En effet, les deux parties du fruit de *Citrullus colocynthis* ont été mis à macérer pendant 24h à température ambiante, dans deux solvants de polarités différentes (H2O, MeOH/H2O 80/20).

Chaque partie a été extraite deux fois sur une même récolte et une autre fois sur une autre récolte.

1.2.1. La graine

Les graines ont été séparées en deux, certaines ont été extraites entières et d'autres broyées. Les graines broyées ont été soit dégraissée ou non.

Le dégraissage s'est fait sur des graines broyées par de l'éther de pétrole dans un Soxhlet pendant 4 heures. Le solvant de récupération a été ensuite évaporé au rotavapor Buchi R 114 à 45°c afin d'obtenir le produit de la délipidation qui forme l'huile de graine de coloquinte.

Les trois formes de graine : entière, broyée et broyée dégraissée ont été extraites chacune par macération et par deux systèmes de solvants différents (protocole décrit dans le paragraphe précédent).

1.2.2. La pulpe

La pulpe a été broyée séparément en fine poudre. Comme pour la graine une partie de la pulpe a également été dégraissée, et l'extraction des deux s'est faite selon le même protocole.

1.3. Les fractions des extraits bruts

Chaque extrait brut a été fractionné en utilisant une méthode de fractionnement liquide/liquide à l'aide d'une ampoule à décanter. Pour ce fait deux solvants aux polarités différentes ont été choisi : l'acétate d'éthyle et le n-butanol.

Avant le fractionnement l'extrait brut aqueux a été concentré ainsi que l'extrait hydrométhanolique afin d'éliminer toute trace de méthanol pour ce dernier.

Le premier fractionnement a été celui à l'acétate d'éthyle, il s'est fait par plusieurs lavages jusqu'à obtention d'une phase aqueuse transparente. La phase aqueuse est alors récupérée pour un fractionnement au n butanol, qui s'est fait dans les mêmes conditions que le fractionnement à l'acétate d'éthyle.

A la fin du fractionnement nous obtenons 3 fractions pour chaque extrait brut : 2 Fractions organiques et une fraction aqueuse.

II. Bilan des extraits obtenus

La préparation des extraits des différents organes séchés a consisté à les faire macérer dans des solvants de polarités croissantes. La figure 10 récapitule les différentes étapes d'extraction et le tableau 4 référence les différents extraits obtenus.

***Tableau 4**. Références des extraits brutes et des fractions*

Organe	Référence	Fraction
Graine	**Sna**	Extrait aqueux de graine entière
	Sna1	fraction AcEth de Sna
	Sna2	fraction butanolique de Sna
	Sna3	fraction aqueuse de Sna (partie résiduelle)
	Snh	Extrait hydrométhanolique de graine entière
	Snh1	fraction AcEth de Snh
	Snh2	fraction butanolique de Snh
	Snh3	fraction aqueuse de Snah (partie résiduelle)
	Sda	Extrait aqueux de graine dégraissée
	Sda1	fraction AcEth de Sda
	Sda2	fraction butanolique de Sda
	Sda3	fraction aqueuse de Sda (partie résiduelle)
	Sdh	Extrait hydrométhanolique de graine dégraissée
	Sdh1	fraction AcEth de Sdh
	Sdh2	fraction butanolique de Sdh
	Sdh3	fraction aqueuse de Sdh (partie résiduelle)
Pulpe	**Pna**	Extrait aqueux de pulpe entière
	Pna1	fraction AcEth de Sna
	Pna2	fraction butanolique de Sna
	Pna3	fraction aqueuse de Sna (partie résiduelle)
	Pnh	Extrait hydrométhanolique de pulpe entière
	Pnh1	fraction AcEth de Snh
	Pnh2	fraction butanolique de Snh
	Pnh3	fraction aqueuse de Snah (partie résiduelle)
	Pda	Extrait aqueux de pulpe dégraissée
	Pda1	fraction AcEth de Sda
	Pda2	fraction butanolique de Sda
	Pda3	fraction aqueuse de Sda (partie résiduelle)
	Pdh	Extrait hydrométhanolique de pulpe dégraissée
	Pdh1	fraction AcEth de Sdh
	Pdh2	fraction butanolique de Sdh
	Pdh3	fraction aqueuse de Sdh (partie résiduelle)

Diagramme des extractions :

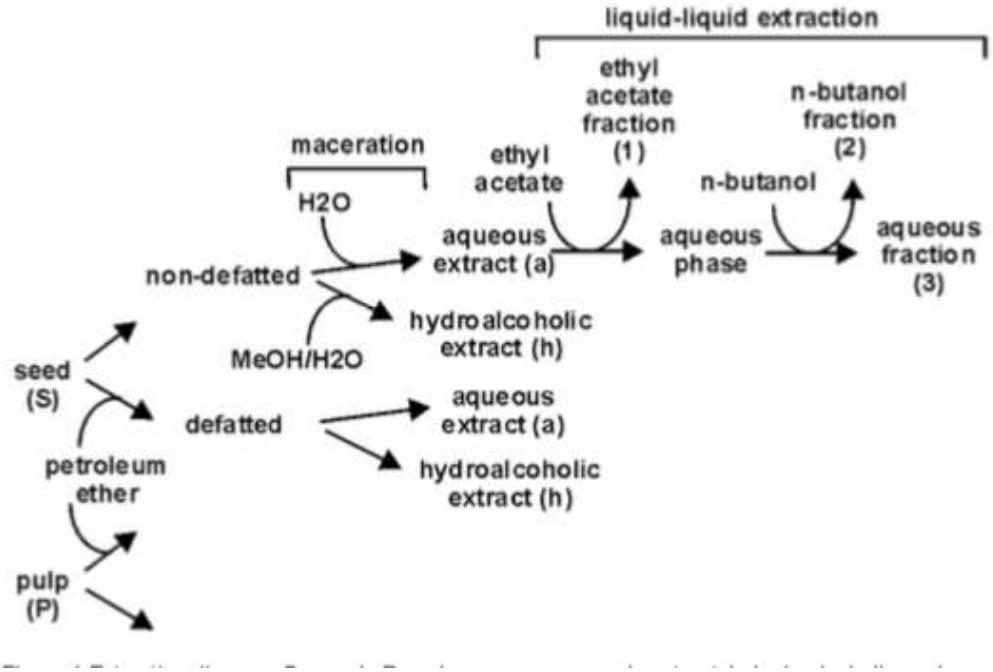
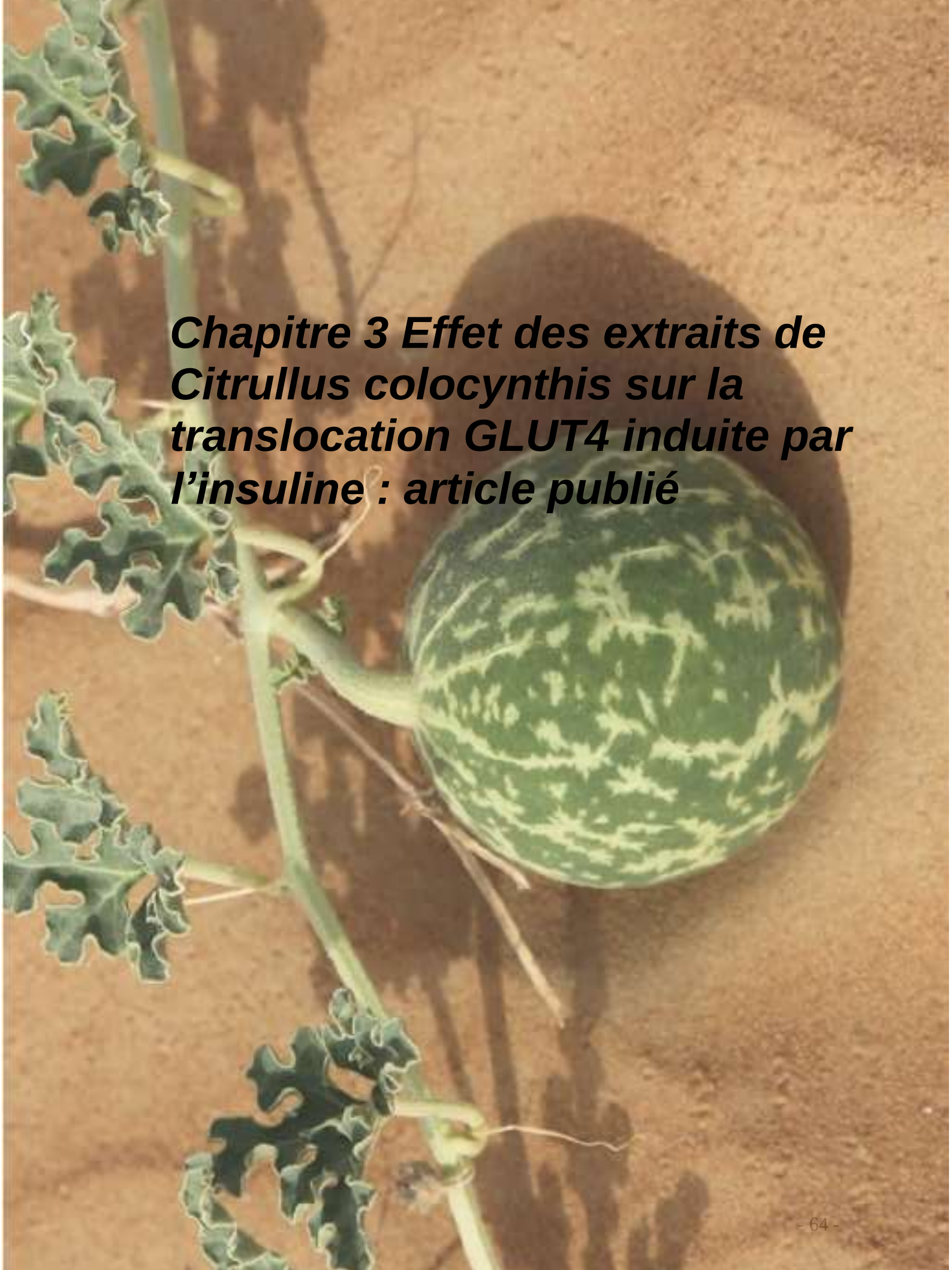


Figure 10. Diagramme des extractions



Chapitre 3 Effet des extraits de Citrullus colocynthis sur la translocation GLUT4 induite par l'insuline : article publié

Journal of Ethnopharmacology 270 (2021) 113772

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm

A *Citrullus colocynthis* fruit extract acutely enhances insulin-induced GLUT4 translocation and glucose uptake in adipocytes by increasing PKB phosphorylation

Farah Drissi [a], Farid Lahfa [a], Teresa Gonzalez [b], Franck Peiretti [b], Jean-François Tanti [c], Mohamed Haddad [d], Nicolas Fabre [d], Roland Govers [b,*]

[a] Department of Synthesis and Biological Activities, University of Abou Bekr Belkaïd, 119 13000, Tlemcen, Algeria
[b] Aix Marseille Université, INSERM, INRAE, C2VN, 13385, Marseille, France
[c] Université Côte D'Azur, INSERM, C3M, Team "Cellular and Molecular Physiopathology of Obesity", 06204, Nice, France
[d] UMR 152 Pharma Dev, Université de Toulouse, IRD, UPS, 31400, Toulouse, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Diabetes
Metabolism
Signal transduction
Chromatography
Citrullus colocynthis
Type 2 diabetes
GLUT4
Insulin enhancers
Cucurbitacins
Traditional herbal medicine

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: Citrullus colocynthis (L.) Schrad is a common fruit in traditional medicine and used as remedy against various diseases, especially diabetes. Up to now, its anti-diabetic effects have been fully attributed to its enhancement of pancreatic insulin secretion. Whether *C. colocynthis* also ameliorates insulin action in peripheral tissues has not been investigated.

Aim of the study: In the present study, using 3T3-L1 adipocytes as cell model, we have investigated whether colocynth fruit extracts affect insulin action.

Materials and methods: Various extracts were prepared from the *C. colocynthis* fruit and screened using a cell-based 96 well plate GLUT4 translocation assay. Promising extracts were further studied for their effects on glucose uptake and cell viability. The effect on insulin signal transduction was determined by Western blot and the molecular composition was established by LC-MS.

Results: The ethyl acetate fractions of aqueous non-defatted extracts of seed and pulp, designated Sna1 and Pna1, acutely enhanced insulin-induced GLUT4 translocation. In accordance, both extracts increased insulin-stimulated cellular glucose uptake. Pna1, which displayed greater effects on GLUT4 and glucose uptake than Sna1, was further investigated and was demonstrated to increase GLUT4 translocation without changing the half-maximum dose (ED50) of insulin, nor changing GLUT4 translocation kinetics. At the molecular level, Pna1 was found to enhance insulin-induced PKB phosphorylation without changing phosphorylation of the insulin receptor. Pna1 appeared not to be toxic to cells and, like insulin, restored cell viability during serum starvation. By investigating the molecular composition of Pna1, nine compounds were identified that made up 87% of the mass of the extract, one of which is likely to be responsible for the insulin-enhancing effects of Pna1.

Conclusions: The *C. colocynthis* fruit possesses insulin-enhancing activity. This activity may explain in part its anti-diabetic effects in traditional medicine. It also identifies the *C. colocynthis* as a source of a potential novel insulin enhancer that may prove to be useful to reduce hyperglycemia in type 2 diabetes.

1. Introduction

Type 2 diabetes (T2D) prevalence is rapidly increasing around the world and associated with obesity, unhealthy diets, and a sedentary lifestyle (Lam and LeRoith, 2012). The onset of T2D is closely related to the desensitization of skeletal muscle, adipose tissue, and liver for insulin, also known as insulin resistance (Fujimoto, 2000; Thule, 2012). Insulin resistance is characterized by a reduced response of skeletal muscle and adipose tissue to regular insulin levels, in particular concerning the uptake of glucose from the blood during the postprandial phase. To compensate for this insulin resistance, the pancreas secretes high amounts of insulin, just until its β cells cannot further sustain the

* Corresponding author. Aix Marseille Université, C2VN, Faculty of Medicine, Campus Timone, 27 Bd Jean Moulin, 13385, Marseille Cedex 5, France.
E-mail addresses: drissi.djazia@gmail.com (F. Drissi), f_lahfa@yahoo.fr (F. Lahfa), teresa.gonzalez@univ-amu.fr (T. Gonzalez), franck.peiretti@univ-amu.fr (F. Peiretti), tanti@unice.fr (J.-F. Tanti), mohamed.haddad@ird.fr (M. Haddad), nicolas.fabre@univ-tlse3.fr (N. Fabre), Roland.Govers@univ-amu.fr (R. Govers).

https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113772
Received 18 September 2020; Received in revised form 14 December 2020; Accepted 24 December 2020
Available online 6 January 2021
0378-8741/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

increased production of insulin, resulting in hyperglycemia. Glucose transporter GLUT4 is responsible for the insulin-regulated uptake of glucose from the blood during the postprandial phase (Fukumoto et al., 1989; James et al., 1988, 1989). In between postprandial phases, insulin levels are low and GLUT4 is retained within intracellular compartments in muscle and adipose tissue. Once insulin levels rise during the postprandial phase, intracellular signaling cascades are activated, leading to the translocation of GLUT4 from the intracellular compartments towards the cell surface, allowing these tissues to take up glucose (Bogan, 2012; Govers, 2014).

Despite the use of numerous drugs for the treatment of T2D, the search for novel anti-diabetic compounds is not over, mainly due to unsatisfactory results at long term and the serious side effects of certain treatments, for example those involving the insulin-sensitizing thiazolidinediones (TZDs) (Fonseca, 2013; Kumar et al., 2017). Plants have been scientifically studied for over half a century for their effects on diabetes and have appeared to be useful sources for the identification of novel bioactive compounds (e.g. metformin predecessors (Bailey and Day, 1989) and acarbose (Shu, 1998)). Moreover, plant extracts have been used as anti-diabetic remedy for even much longer, especially in traditional (herbal) medicine. Plants that have been intensely studied for their anti-diabetic properties include *Allium sativum* (garlic), *Gymnema sylvestre* (gurmar), *Trigonella foenum graecum* (fenugreek), *Momordica charantia* (bitter melon, ampalaya), *Ficus benghalensis* (banyan fig), *Artemisia absinthium* (wormwood) and *Citrullus colocynthis* (colocynth, bitter apple, bitter cucumber) (Bailey and Day, 1989; Li et al., 2015; Patel et al., 2012).

The *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad is a member of the Cucurbitaceae family. Plants of this family are tolerant to drought, but intolerant to wet and poorly drained soil and frost (Hussain et al., 2014). The *C. colocynthis*, of which the appearance resembles that of watermelon, is a perennial herbaceous vine that possesses yellow flowers, producing 15–30 round fruits that are 7–10 cm in size (Shi et al., 2014). It is widely distributed in desert areas around the world, especially in the Sahara desert and the South-West part of Asia, including the Arabian desert, Pakistan, Iran, and India, but also in China (Hussain et al., 2014). In all these places, parts of this plant have been used in traditional medicine, especially for the treatment of constipation. More generally, its seeds, pulp, rind, leaves, and roots have been reported to be used to treat diabetes, intestinal disorders (constipation, indigestion, ulcer, dysentery, gastroenteritis, colic pain), bacterial infections, cancer, hypertension, rheumatism, common cold, cough, toothache, wounds, jaundice, asthma, and bronchitis (Dhakad et al., 2017; Hussain et al., 2014). At present, the plant (especially its fruit) is the topic of pharmacological investigations, mainly concerning its anti-diabetic and (cucurbitacin-related) anti-cancer effects (Hussain et al., 2014). Other current areas of investigation include those concerning its anti-hyperlipidemic (cholesterol- and triglyceride-lowering), anti-inflammatory, analgesic, insecticidal, and anti-microbial activities (Dhakad et al., 2017; Gurudeeban et al., 2010; Hussain et al., 2014). In addition to its medicinal value, the *Citrullus colocynthis* is also well-appreciated for its marked nutritional value, due to its high protein amount and the elevated concentration of essential amino acids (Gurudeeban et al., 2010; Hussain et al., 2014).

In clinical studies, the powder of dried colocynth fruits appeared to reduce fasting blood glucose (FBG) and glycosylated hemoglobin (HbA1c) levels in T2D patients (Barghamdi et al., 2016; Huseini et al., 2009). In accordance, in animal studies, seed, pulp and rind from the colocynth fruit but even the plant roots and leaves have been demonstrated to possess anti-diabetic activity (Abdel-Hassan et al., 2000; Agarwal et al., 2012; Amin et al., 2017; Benariba et al., 2012; Dallak et al., 2009; Ebrahimi et al., 2016; Huseini et al., 2009; Ostovar et al., 2020; Shi et al., 2014). Long-term treatments with colocynth extracts have been demonstrated to improve hyperglycemia through preservation and restoration of β cell mass (Amin et al., 2017; Sebbagh et al., 2009) and stimulation of synthesis and secretion of insulin (Dallak et al., 2009). Interestingly, four animal studies have suggested that extracts of this plant also have acute blood glucose lowering effects. First, in normoglycemic rats, the administration of an aqueous root extract 30 min before an oral glucose tolerance test (OGTT) reduced glycemia already within the first 30 min of the OGTT (Agarwal et al., 2012). Second, seed and rind extracts reduced glycemia in overnight food-starved normal and streptozotocin (STZ)/alloxan-induced diabetic rats and rabbits within 60–90 min of administration (Abdel-Hassan et al., 2000; Azzi et al., 2015; Lahfa et al., 2017). For the moment, these acute effects remain unexplored. Hypothetically, these extracts might acutely affect glycemia via insulinotropic, insulin-mimetic, or insulin-enhancing/sensitizing actions. In favor of an insulinotropic action is the finding that colocynth extracts acutely induce the release of insulin from isolated pancreatic islets (Benariba et al., 2013; Ebrahimi et al., 2016; Nmila et al., 2000). However, their acute effects in STZ/alloxan-treated animals rather provides evidence for an insulin-mimetic action (Abdel-Hassan et al., 2000; Azzi et al., 2015; Lahfa et al., 2017). At present, there are no indications that support the presence of insulin-enhancing or insulin-sensitizing activity in colocynth extracts.

In the current study, the acute anti-diabetic effects of the colocynth were investigated at the cell biological level. Various colocynth extracts were prepared and tested for their acute effects on insulin-induced GLUT4 translocation in adipocytes. The results of the present study highlight two promising non-toxic ethyl acetate extracts from the colocynth fruit, Sna1 from seed and Pna1 from pulp, which enhance the effect of insulin towards both GLUT4 translocation and cellular glucose uptake. The molecular composition of these extracts was determined in order to provide insight into the nature of the compound responsible for this insulin-enhancing activity.

2. Material and methods

2.1. Materials

3T3-L1 preadipocytes were obtained from ATCC/LGC Standards (Molsheim, France). Fetal bovine serum was from D. Dutscher (Brumath, France). Media, Hepes, and Alexa488-conjugated goat-anti-mouse secondary antibody (#A1101) were from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Insulin was from Lilly (Suresnes, France), monoclonal anti-HA (haemagglutinin) antibody (ascites, #MMS-101R) was from Covance (Emeryville, CA), and HRP-conjugated secondary antibodies (#715-035-150 and #711-035-152) were from Jackson ImmunoResearch (Interchim; Montlucon, France). Antibodies against ERK (#9102), phospho-ERK (#9101), PKB (#9272), phospho-PKB (T308, #9275S and S473, #4058S), AMPK (#5831S), phospho-AMPK (#2535S), and anti-ACC (#3662S) were from Cell Signaling Technology (Ozyme; Saint-Cyr-l'École, France), anti-insulin receptor β (C19, (#sc-711) and anti-phospho-insulin receptor (pY1162/1163, #sc-25103) from Santa Cruz (Heidelberg, Germany), anti-tubulin (#T6199) from Sigma-Aldrich (Souffelweyersheim, France), and anti-phospho-ACC (S79, #07–303) from Millipore (Merck; Molsheim, France). Methanol, acetonitrile and formic acid were HPLC grade. These and all other chemicals (including authentic samples of curcubitacins B, E, I, isovitexin, and elaterinide) were obtained from Sigma-Aldrich (Souffelweyersheim, France). Black clear-bottom well plates were from Greiner Bio-One (Courtaboeuf, France).

2.2. Extraction and fractionation of plant material

Fruits from *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad were harvested at maturity in Ain Sefra (Algeria; GPS coordinates 32°44′23.3″N 0°34′43.9″E) and dried for six weeks in a temperate and dark place. The plant was formally identified in the Antibiotics Antifungal Laboratory: Physical-Chemistry, Synthesis and Biological Activity (Department of Biology, Faculty of Sciences, Tlemcen University, Algeria) and its name verified

at http://www.theplantlist.org. The extraction protocol outlined below was repeated twice with fruits from the same harvest (2016) and another time with fruits from another harvest (2017). For degreasing, crushed seed and pulp were treated with petroleum ether in a Soxhlet for 4 h at 60 °C, followed by evaporation in a Buchi R 114 rotavapor at 45 °C. Defatted and untreated seed and pulp were macerated for 2 h at 50 °C and subsequently for 24 h at room temperature in either water or 80% methanol. The 80% methanol extracts (after evaporation of the methanol) and the crude aqueous extracts were partitioned by two successive liquid-liquid extractions involving ethyl acetate and *n*-butanol, respectively, resulting in ethyl acetate, *n*-butanol, and remaining aqueous fractions (fractions 1, 2, and 3 in Fig. 1). Upon lyophilization, crude aqueous extracts and final aqueous fractions were dissolved in cell culture medium DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), crude methanol extracts were dissolved in a mixture of DMEM and DMSO (1:1), and ethyl acetate and *n*-butanol fractions were dissolved in DMSO.

2.3. Cell culture

3T3-L1 preadipocytes were cultured and differentiated as described previously (Talantikite et al., 2016). Briefly, confluent 3T3-L1 preadipocytes, grown in 6 cm dishes (lysates), 12 well plates (2-DOG uptake), or 96 well plates (GLUT4 and resazurin assays), were cultured for 3 days in DMEM/FBS, containing 700 nM insulin, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 250 nM dexamethasone, 0.1 g/l biotin, and 1 μM rosiglitazone. Subsequently, cells were cultured for 6–7 days in DMEM/FBS, with medium renewed every day, and containing 350 nM insulin for the first 2 days. Adipocytes were used for experiments 9–10 days after the onset of differentiation. Efficiency of differentiation was estimated by the presence of fat droplets using a standard cell culture microscope (i.e. determination of amount of lipid droplet-negative cells in arrays of 20 cells). In all experiments, the percentage of adipocytes was estimated to be at least 95% (and the percentage of lipid droplet-negative fibroblasts less than 5%). Cultures of which >5% of cells were without lipid droplets were discarded. The cDNA encoding HA-GLUT4 (human GLUT4 with an HA epitope tag in its first luminal domain (Quon et al., 1994)) inserted into the retroviral pBABE-puro vector has been described previously (Govers et al., 2004). To express HA-GLUT4 in adipocytes, preadipocytes were infected with retrovirus (Zaarour et al., 2012). Briefly, retrovirus was harvested from Plat-E cells transiently transfected with pBABE/HA-GLUT4 using X-tremeGENE (Sigma-Aldrich). Preadipocytes were infected with retrovirus (without purification of the virus) using polybrene and exposed to 2 μg/ml of puromycin to eliminate uninfected cells and to obtain a pool of HA-GLUT4-expressing preadipocytes (without isolation of individual cells). This pool of puromycin-resistant cells was used for cell experiments. Anti-HA immunolabeling of mature adipocytes demonstrated that all adipocytes expressed HA-GLUT4 but that expression levels varied significantly between cells. Cells were starved for 2 h in serum-free DMEM supplemented with 2 g/l BSA before stimulation.

2.4. Fluorescence-based techniques

The fluorescence-based assay for the detection of GLUT4 at the cell surface has been described in detail previously (Govers et al., 2008; Zaarour et al., 2012). Briefly, HA-GLUT4-expressing cells grown in 96 well plates (~22,000 cells/well) were fixed and immunolabelled using an anti-HA antibody and a fluorescent Alexa488-conjugated goat-anti-mouse antibody, after the cells had been incubated for 40 min at 37 °C with or without insulin in the absence or presence of extracts at a concentration of 4, 20, or 100 μg/ml. The final concentration of DMSO in all experiments involving living cells was 0.5% (v/v). At the end of the experiments, the 96 well plates were analyzed using the bottom-reading mode in a fluorescence microtiter plate reader (FLUOstar Optima, BMG Labtechnologies; Offenburg, Germany; excitation 485 nm, emission 520 nm). An epifluorescence microscope was also used to analyze the plates to ensure that changes in fluorescence truly represented changes in cell surface GLUT4 amounts. Non-immune mouse IgG, titrated along with anti-HA antibody on control cells not expressing HA-GLUT4, was used in the GLUT4 assays to determine non-specific signal.

Cell viability assays were performed using Alamar Blue compound resazurin. Adipocytes, cultured in black clear-bottom 96 well plates (~22,000 cells/well), were treated for 1 h (in the absence of serum and preceded by a 2 h serum deprivation) or 24 h (in the presence of 2%

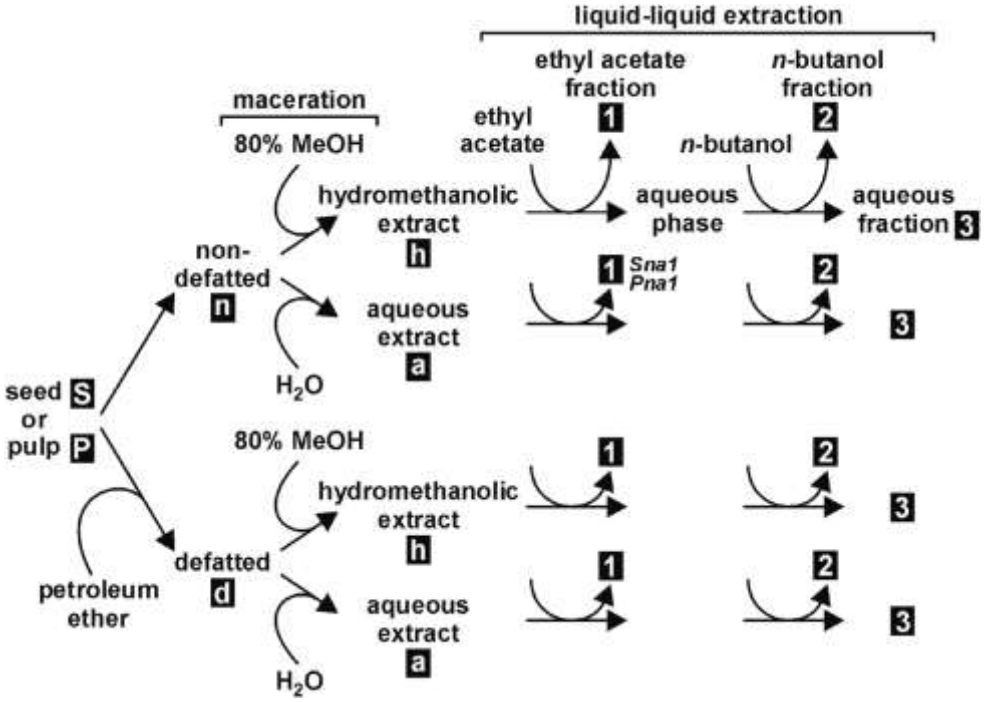
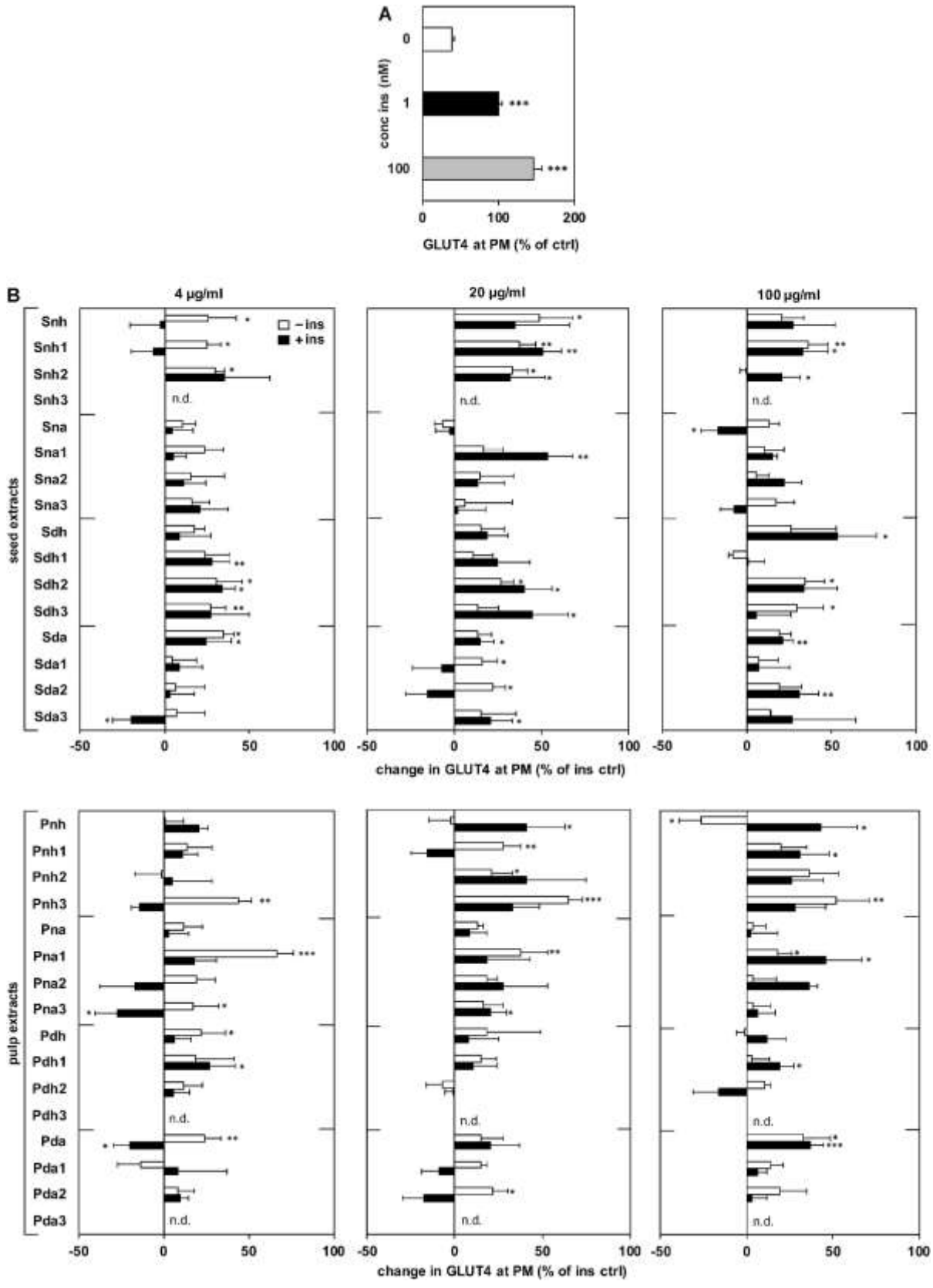


Fig. 1. Schematic outline of the preparation of *C. colocynthis* fruit extracts. Seed and pulp extracts were prepared as indicated. Further details are described in *Materials and Methods*. The two major insulin-enhancing extracts, Sna1 and Pna1, are indicated within the diagram.



(caption on next page)

Fig. 2. Screening of *C. colocynthis* extracts for their effects on cell surface GLUT4 levels. (A) Adipocytes were incubated for 40 min at 37 °C with the indicated concentrations of insulin in the absence of extracts. Relative amounts of GLUT4 at the plasma membrane (PM) were measured and expressed as percentage of cell surface GLUT4 levels in the presence of 1 nM insulin. Relative cell surface GLUT4 levels in 0, 1, and 100 nM insulin-treated cells were 40, 100, and 145%, respectively. (B) Adipocytes were incubated for 40 min in the absence or presence of 1 nM insulin and 4, 20, or 100 μg/ml of extracts. Relative amounts of GLUT4 at the plasma membrane were measured. Extract-induced changes in cell surface GLUT4 levels in the absence or presence of insulin were calculated and expressed as percentage of GLUT4 PM levels in the presence of 1 nM insulin without extract. For example, extract Sna1 at 20 μg/ml induced a +16% change in PM GLUT4 in non-stimulated cells (white bar), increasing cell surface GLUT4 levels from 40% to 56% (1.40-fold increase) and a +53% change in insulin-stimulated cells (black bar), increasing surface GLUT4 levels from 100% to 153% (1.53-fold increase). Extract Pna1, at 100 μg/ml, increased basal cell surface GLUT4 +17% (from 40% to 57%; 1.43-fold increase) and insulin-stimulated cell surface GLUT4 +47% (from 100% to 147%; 1.47-fold increase). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. n.d., not determined. Concentration of DMSO in all incubations was 0.5% (v/v).

serum) with various concentrations of extracts Sna1 and Pna1, followed by a 60 min incubation with 100 μM resazurin in serum- and phenol red-free DMEM, supplemented with 2 g/l BSA. As a control for toxicity, cells were incubated with various concentrations of the hydrogen peroxide-generating enzyme glucose oxidase. For long-term serum-deprivation experiments, cells were washed once with serum-free DMEM supplemented with 2 g/l BSA and incubated for 1–4 days in serum-free DMEM/BSA, with medium renewed every day. Fluorescence (excitation 544 nm, emission 590 nm) was measured using a fluorescence microtiter plate reader (FLUOstar Optima, BMG Labtechnologies; Offenburg, Germany).

2.5. Glucose uptake

Glucose uptake was measured as described previously (Martinez et al., 2010). Briefly, adipocytes grown in 12 well plates (~260, 000 cells/well) were incubated for 2 h in DMEM, supplemented with 2 g/l BSA and for 5 min in Krebs Ringer Phosphate buffer (KRP; 12.5 mM Hepes (pH 7.4), 120 mM NaCl, 6 mM KCl, 1.2 mM $MgSO_4$, 1 mM $CaCl_2$, 0.4 mM NaH_2PO_4, 0.6 mM Na_2HPO_4, 2 g/l BSA). Subsequently, the cells were incubated for 40 min at 37 °C in KRP in the absence or presence of 1 or 100 nM insulin and extracts Sna1 (20 μg/ml) or Pna1 (100 μg/ml). To control cells, 50 μM cytochalasin B was added 1 min before the addition of 0.1 mM 2-[^{3}H]deoxyglucose (2-DOG; 0.28 μCi/well; PerkinElmer; Courtaboeuf, France) to determine assay background. After a 3 min 2-DOG incubation, cells were extensively washed with ice-cold PBS, and lysed in 1% Triton X-100. Radioactivity was measured by scintillation counting.

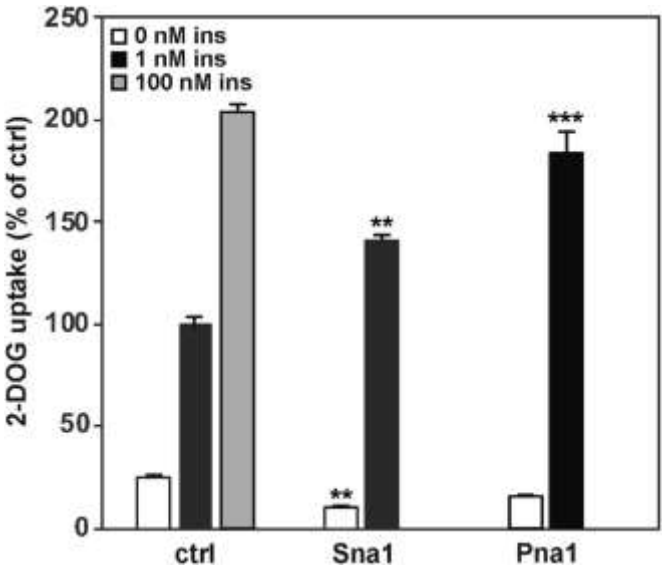


Fig. 3. *C. colocynthis* extracts Sna1 and Pna1 enhance insulin-induced glucose uptake. 3T3-L1 adipocytes were incubated for 40 min at 37 °C in the absence or presence of 1 or 100 nM insulin, 20 μg/ml Sna1, and 100 μg/ml Pna1, followed by a 3 min incubation with radiolabelled 2-DOG. Amounts of cellular 2-DOG were determined and expressed as percentage of 2-DOG uptake at 1 nM insulin in the absence of extracts. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, vs control ('ctrl') incubations without extracts.

2.6. Western blot analyses

Adipocytes were incubated for 2 h in DMEM supplemented with 2 g/l BSA and for 5 or 15 min in the absence or presence of 1 or 100 nM insulin and 100 μg/ml Pna1 or 0.5% DMSO. Cells were lysed in ice-cold buffer containing 20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100, 100 mM sodium fluoride, 2 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium pyrophosphate, and protease inhibitor cocktail Complete (Roche; Meylan, France). Nuclei and insoluble material were removed by centrifuging for 10 min at 20.000 g at 4 °C. Equal amounts of protein (30 μg/well) were subjected to SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane. Membranes were incubated with the indicated antibodies. HRP-conjugated secondary antibodies were visualized using chemiluminescence reagent (PerkinElmer; Courtaboeuf, France) and a CCD camera-based imager (LAS-4000 mini, GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France). Relative intensities were quantified using MultiGauge software (Fujifilm).

2.7. Extract chromatography

Ultra-high-performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS) analyses were performed on a UHPLC-PDA-CAD-LTQ Orbitrap XL instrument (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, Hemel Hempstead, UK). Separations were performed using an Acquity UHPLC® BEH C18 1.7 μm column (150 mm × 2.1 mm, Waters, Milford, MA, USA) preceded by a VanGuardTM BEH C18 1.7 μm (Waters) guard column using an UHPLC Ultimate 3000 system (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) controlled by Chromeleon Xpress 6.8 software (Dionex). The column compartment temperature was set at 40 °C and the injected sample volume was 4 μl. The mobile phase consisted of milliQ water (solvent A) and CH3CN (solvent B) each containing 0.1% formic acid. Flow rate was set at 400 μl/min. The column was equilibrated in 10% B and elution was carried out with the following steps: 10% B to 90% B from 0 to 28 min, followed by a decrease to initial conditions 10% B for 2 min and kept at 10% B for 2.5 min before the next injection. High Resolution MS analyses were carried out under positive and negative modes at 30,000 resolving power (full width at half maximum (FWHM) at 400 m/z) using an ESI probe. The mass scanning range was m/z 100–2000, the capillary temperature was 275 °C and the ionization spray voltage was 4.2 kV (positive mode) and 3.0 kV (negative mode). Mass measurement was externally calibrated just before starting the experiment. Each full MS scan was followed by data dependent MS/MS on the most intense ion using the collision-induced dissociation (CID) fragmentation mode at 35% normalized collision energy, with an isolation width of 2 Da and activation Q set at 0.250. The obtained spectra were compared with those from literature (Chawech et al., 2015; Dhakad et al., 2017; Gurudeeban et al., 2010; Hussain et al., 2014; Nayab et al., 2006; Yoshikawa et al., 2007), in order to determine their identity, based on the molecular formula deduced from Tr, M + $HCOO^-$ and M + NH_4^+ values). The CAD profile was used to quantify the relative presence of the compounds in Pna1 (normalized to 100%).

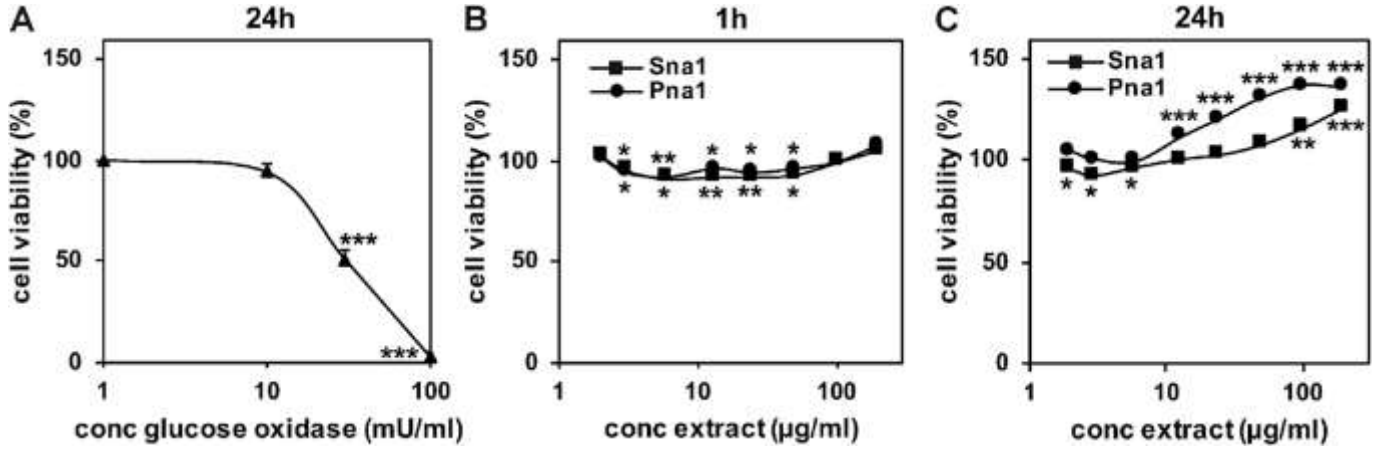


Fig. 4. Extracts Sna1 and Pna1 do not impair cell viability. (A–C) Adipocytes were incubated for 24 h with various concentrations of the hydrogen peroxide-generating enzyme glucose oxidase (A), or for 1 h (B) or 24 h (C) with various concentrations of Sna1 and Pna1. Subsequently, viability was measured using resazurin and expressed as percentage of viability of untreated cells. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, vs untreated cells.

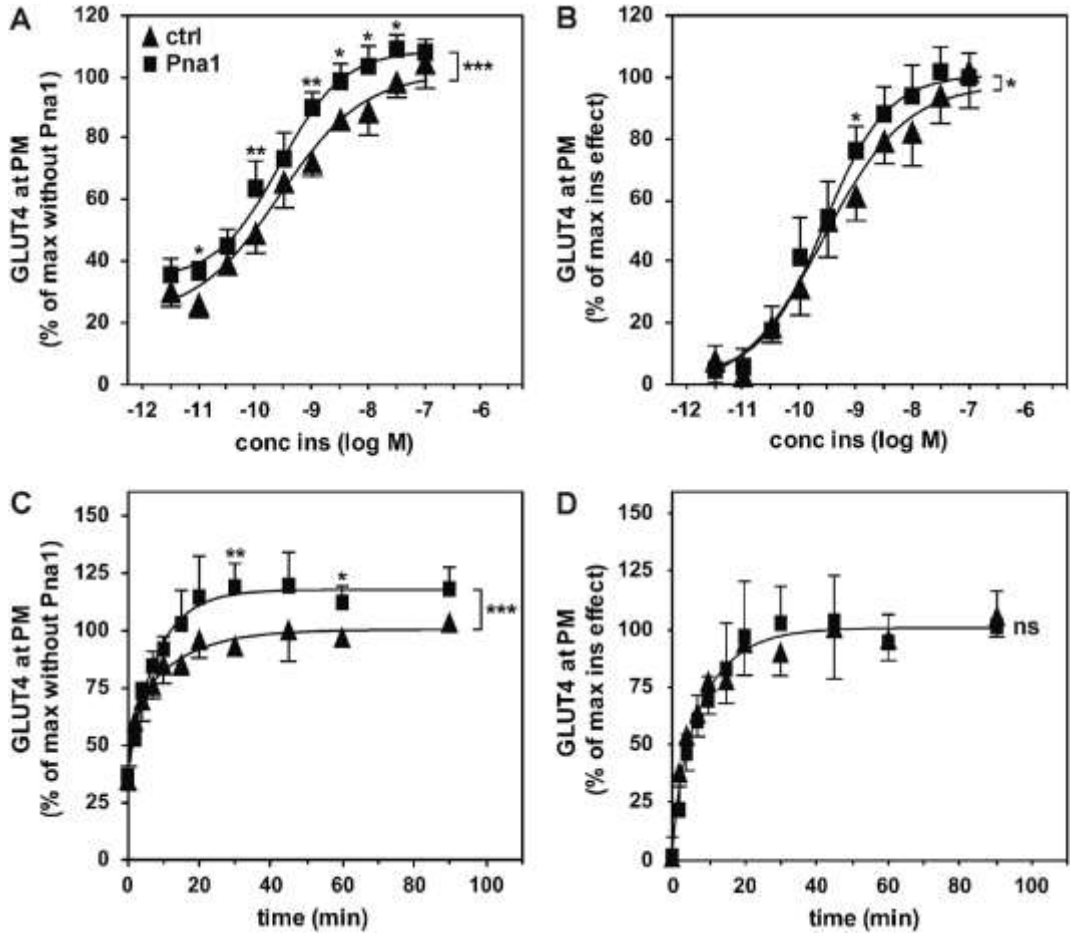


Fig. 5. Extract Pna1 does not alter adipocyte insulin sensitivity nor GLUT4 translocation kinetics. (A) Adipocytes were incubated for 40 min with various concentrations of insulin in the absence or presence of 100 µg/ml Pna1. The amount of GLUT4 at the plasma membrane (PM) was determined and expressed as percentage of maximum GLUT4 PM levels in the absence of Pna1. ED50 of ctrl and Pna1 is 0.383 nM and 0.216 nM, respectively ($P = 0.0538$). (B) Data from (A) were transformed in dose-response curves in which the increases induced by the various insulin concentrations were related to the maximum increases in the absence and presence of Pna1. (C) Adipocytes were treated for up to 90 min with 1 nM insulin in the absence or presence of 100 µg/ml Pna1. Plasma membrane GLUT4 levels were determined and expressed as percentage of maximum PM levels without Pna1. (D) Data from (C) were transformed into increases in cell surface GLUT4 levels above GLUT4 PM levels in non-stimulated adipocytes and expressed as percentage of maximum increases, both in the absence and presence of Pna1. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. n.s., non-significant. Asterisks above symbols indicate point-wise comparisons. Asterisks beside graphs indicate graph-wise comparisons.

2.8. Statistics

All data are presented as means ± S.D. All experiments were repeated at least three times. Representative experiments are shown. For fluorescence measurements in 96 well plates, four wells were used for each condition. For 2-DOG uptake, three wells were used for each condition. For Western blot analysis, the entire experiment (cell incubations, lysate preparations, immunoblots) was repeated four times. Statistical significance between individual data points was analyzed by two-tailed *t*-test. Differences between insulin dose-response curves were analyzed by extra-sum-of-squares *F*-tests (Freedman, 2009) using sigmoidal log (dose)-response curve fitting (GraphPad Prism). Differences between curves of GLUT4 translocation kinetics were analyzed by extra-sum-of-squares *F*-tests (Freedman, 2009) using Two Phase Association curve fitting (GraphPad Prism). Differences between data sets were considered statistically different when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Identification of Citrullus colocynthis fruit extracts that enhance the insulin-induced appearance of GLUT4 at the cell surface of 3T3-L1 adipocytes

Extracts were prepared as outlined in Fig. 1 from defatted ('d') or non-defatted ('n') seed ('S') and pulp ('P') from the *Citrullus colocynthis* fruit by maceration in water ('a') or in 80% methanol ('h'), followed by extractions using ethyl acetate and *n*-butanol, respectively, resulting in ethyl acetate fractions ('1′), *n*-butanol fractions ('2′) and the remaining aqueous fractions ('3′). The resulting extracts were subjected to a cell-based GLUT4 screen in 96 well plates, in which the effects of the extracts on cell surface GLUT4 levels were measured, both in the absence as well as in the presence of insulin (Fig. 2). Treatment of the cells in the absence of extracts revealed an insulin dose-dependent increase in cell surface GLUT4 levels, with a 2.5- and 4-fold increase at 1 and 100 nM insulin, respectively (Fig. 2A). To ascertain that certain extracts would be able to enhance the effect of insulin on GLUT4 translocation, extracts were screened in the absence and presence of the sub-maximal dose of 1 nM insulin. The 3T3-L1 adipocytes, expressing GLUT4 with an HA epitope tag within its first extracellular domain (known to behave identically as endogenous GLUT4 (Quon et al., 1994; Sano et al., 2007; Shewan et al., 2000)), were cultured in 96 well plates and incubated for 40 min at 37 °C with or without insulin in the absence or presence of extracts at a concentration of 4, 20, or 100 μg/ml. Subsequently, cell surface amounts of HA-GLUT4 were measured by quantitative indirect immunofluorescence immunolabeling of the intact adipocytes using an anti-HA antibody.

Screening the *Citrullus colocynthis* seed and pulp extracts revealed that certain concentrations of several extracts, in particular the methanolic extracts of non-defatted and defatted seed (Snh1-2 and Sdh1-3), increased cell surface GLUT4 levels in adipocytes in the absence of insulin. This increase was maintained when the cells were co-stimulated with 1 nM insulin. In sharp contrast, 20 μg/ml of seed extracts Sna1

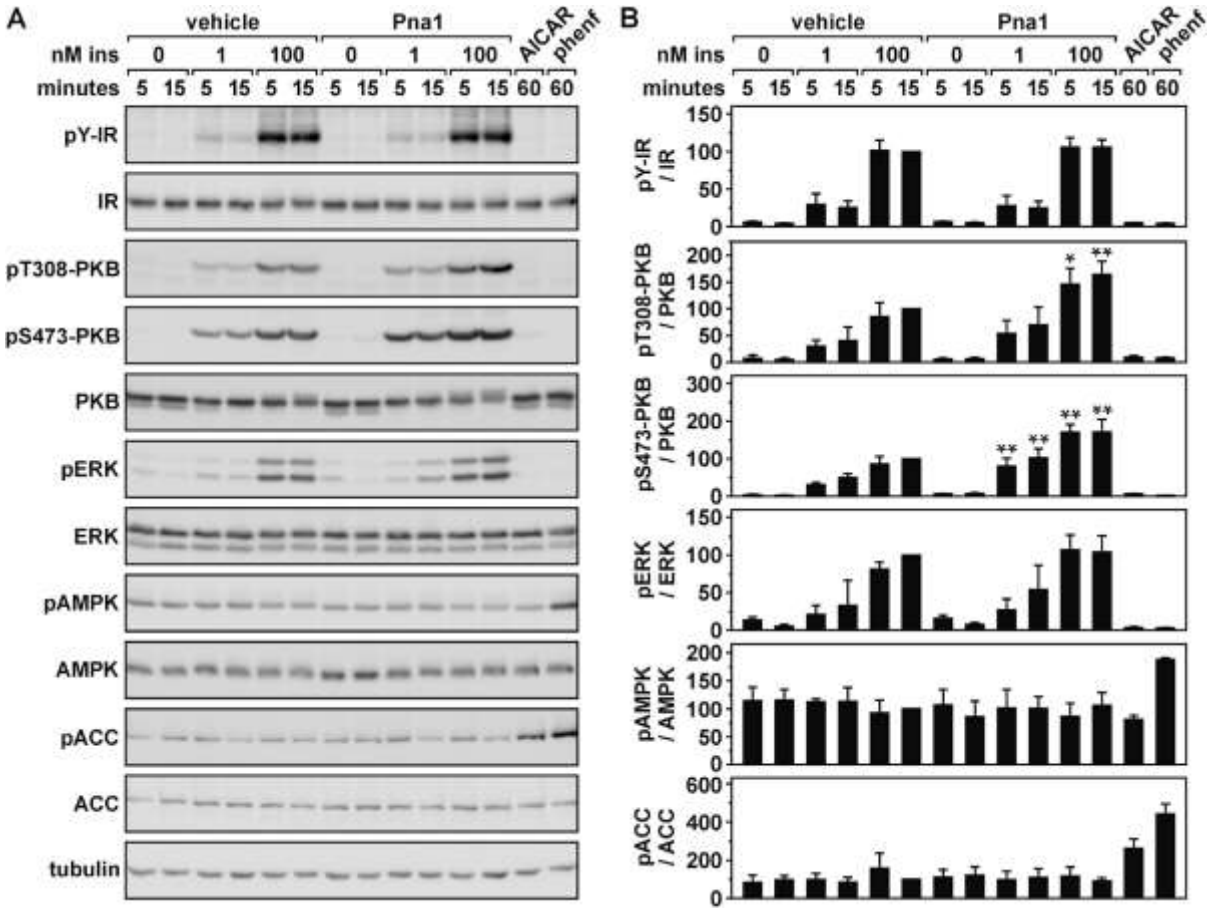


Fig. 6. Extract Pna1 enhances insulin action by increasing PKB activity. (A) Adipocytes were incubated for 5 or 15 min in the absence or presence of 1 or 100 nM insulin and 100 μg/ml Pna1. Vehicle-treated cells were incubated with 0.5% DMSO in the absence of Pna1. As a control for AMPK activation, adipocytes were incubated for 60 min with 2 mM AICAR or 2 mM phenformin. Lysates were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting using the indicated antibodies. In the ERK blots, the upper band is ERK1 and the lower band is ERK2 (B) The results of four independent experiments were quantified and expressed as percentage of the amount of signal of cells that had been incubated for 15 min with 100 nM insulin in the absence of Pna1. *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$, vs identical incubations without Pna1.

and Sdh3 and 100 μg/ml of pulp extract Pna1 increased cell surface GLUT4 considerably more in the presence than in the absence of insulin. Remarkably, degreasing of seed and pulp prior to aqueous maceration abolished the insulin-enhancing activity of these two ethyl acetate fractions (i.e. Sna1 vs Sda1, and Pna1 vs Pda1).

3.2. *Citrullus colocynthis extracts Sna1 and Pna1 increase insulin-induced glucose uptake*

Since the Sna1 ethyl acetate extract of non-defatted water-macerated seed and its pulp homologue Pna1 both enhanced insulin-induced GLUT4 translocation (albeit at different concentrations) while only marginally increasing cell surface GLUT4 levels in non-stimulated adipocytes, these two extracts were tested for their effect on cellular glucose uptake, both in the absence as well as in the presence of 1 nM insulin (Fig. 3). In the absence of extracts, 100 nM insulin doubled the amount of glucose taken up when compared with 1 nM insulin, in accordance with its effects on GLUT4 (Fig. 2A). Interestingly, at the concentrations that enhanced insulin-induced GLUT4 translocation, Sna1 and Pna1 significantly enhanced insulin-stimulated glucose uptake by 55 and 110%, respectively, without increasing basal glucose uptake. Importantly, when these two extracts were prepared again from other fruits from the same harvest and from fruits from the harvest from the next year, similar results were obtained for both glucose uptake and GLUT4 translocation (data not shown).

3.3. *Extracts SnaI and Pna1 do not impair cell viability*

Any compound or extract that enhances insulin action has potential for a possible therapeutic use in insulin-resistance and type 2 diabetes, but only if there are no major toxicity issues. Therefore, these two insulin-enhancing extracts were analyzed for their effect on adipocyte viability using the Alamar Blue compound resazurin (Fig. 4). In control incubations, the hydrogen peroxide-generating enzyme glucose oxidase dose-dependently decreased adipocyte viability (Fig. 4A). In sharp contrast, Sna1 nor Pna1 substantially reduced cellular viability, when present in the extracellular medium for 1 h (Fig. 4B) or 24 h (Fig. 4C). A marginal 10% reduction in cell viability was seen at low/intermediate concentrations, but not at high concentrations (up to 200 μg/ml). Moreover, when present for 24 h, high concentrations of these two extracts enhanced cellular viability (or at least improved the cellular redox balance).

3.4. *Extract Pna1 enhances GLUT4 translocation without altering insulin sensitivity and GLUT4 translocation kinetics*

Since Pna1 increased insulin-induced glucose uptake more than Sna1 without displaying any sign of toxicity, this extract was studied in further detail. In order to determine whether, in addition to its insulin-enhancing action, Pna1 also sensitized the cells for insulin regarding GLUT4 translocation, cells were incubated for 40 min with various concentrations of insulin in the absence or presence of 100 μg/ml Pna1, followed by the analysis of cell surface GLUT4 levels and expression of these levels as percentage of maximum cell surface GLUT4 levels in the absence of Pna1 (Fig. 5A). This revealed that Pna1 increased cell surface GLUT4 at submaximal insulin concentrations. This was accompanied by a non-significant shift in insulin's ED50 from 0.383 nM in the absence to 0.216 nM in the presence of Pna1 (P 0.0538). The absence of insulin-sensitization was also evident when these data were used to calculate the increase in cell surface GLUT4 above background for the various concentrations of insulin and expressed as percentage of the maximum increase in cell surface GLUT4 levels, in the absence or presence of Pna1 (Fig. 5B). In order to investigate whether Pna1 changed the kinetics of insulin-induced GLUT4 translocation, adipocytes were incubated for different time periods with 1 nM insulin in the absence or presence of 100 μg/ml Pna1, followed by the analysis of the amount of GLUT4 at the plasma membrane. While the resulting curves were significantly different (Fig. 5C), expressing the increases as percentage of the maximum insulin effect in the absence and presence of Pna1 demonstrated that Pna1 did not alter relative translocation kinetics (Fig. 5D).

3.5. *Extract Pna1 enhances insulin action by increasing PKB phosphorylation*

To determine how extract Pna1 enhanced insulin action and GLUT4 translocation, the effect of Pna1 on insulin signaling was investigated (Fig. 6). Adipocytes were incubated for 5 or 15 min in the absence or presence of 1 or 100 nM insulin and 100 μg/ml Pna1. Subsequently, cell lysates were subjected to immunoblotting using various antibodies. This demonstrated that insulin dose-dependently induced the phosphorylation of the insulin receptor ('IR'), serine/threonine kinase PKB (Protein Kinase B, also known as Akt), and serine/threonine Extracellular signal-Regulated Kinases ERK1 and ERK2, two mitogen-activated protein kinases (MAPK) that are downstream effectors of the Shc/GRB2/SOS pathway. As expected, insulin treatment did not result in activation of the serine/threonine AMP-activated kinase (AMPK), as measured by phosphorylation of AMPK and its substrate acetyl-CoA carboxylase (ACC), in contrast to AICAR (2 mM) and phenformin (2 mM), two known activators of AMPK. Pna1 by itself did not induce phosphorylation of any of these proteins. However, when co-incubated with insulin for 5 or

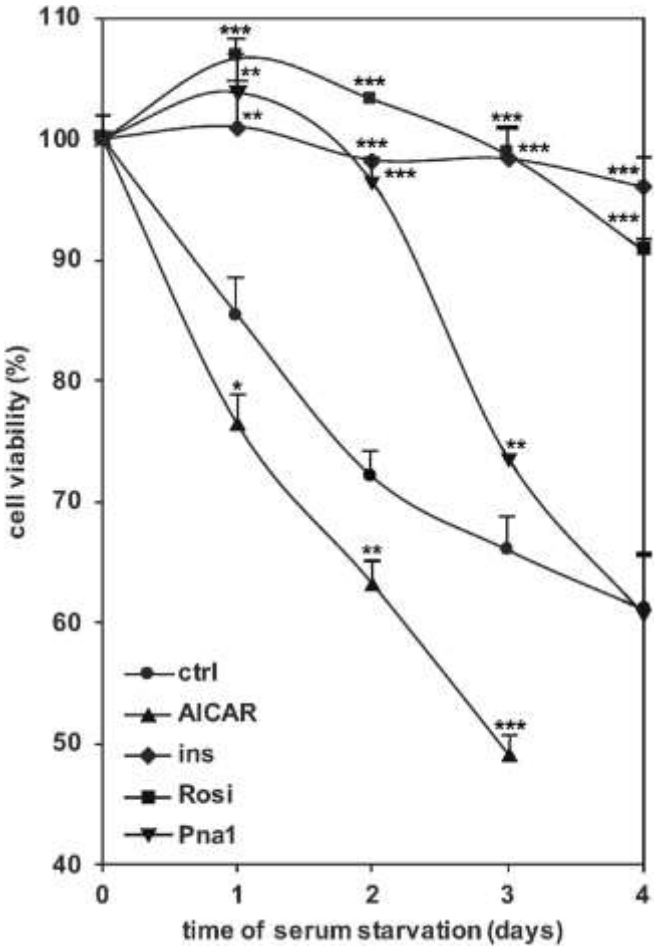


Fig. 7. Extract Pna1 enhances cell viability during serum starvation. Adipocytes were deprived from fetal bovine serum (FBS) for 1–4 days in the absence or presence of 2 mM AICAR, 1 nM insulin, 1 μM rosiglitazone, or 100 μg/ml Pna1. Viability was measured using resazurin and expressed as percentage of the viability of non-deprived cells. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001, vs control ('ctrl') cells.

15 min, Pna1 enhanced the phosphorylation of PKB on residues Thr308 and Ser473 without altering the phosphorylation of the insulin receptor, nor enhancing the insulin-induced phosphorylation of ERK1 and ERK2.

3.6. Extract Pna1 mimics insulin in enhancing cell survival

Given that extract Pna1 enhanced insulin action towards GLUT4 and PKB activity, and that both insulin and PKB are known potentiating factors in cell survival, Pna1 was tested for its effect on serum deprivation-induced cell death (Fig. 7). Mature adipocytes were incubated for up to 4 days without serum in the absence or presence of AMPK activator AICAR (2 mM), insulin (1 nM), PPAR-γ agonist rosiglitazone (1 μM), or extract Pna1 (100 μg/ml). Subsequently, cell viability was measured using Alamar Blue reagent resazurin. This demonstrated that both insulin and rosiglitazone efficiently protected the cells from serum starvation-induced reductions in cell viability, in contrast to AICAR which significantly deteriorated cell viability. Remarkably, Pna1 fully protected the cells from the 15% and 28% reduction in cell viability during the first and second day of starvation, respectively. After four days of starvation, viability of Pna1-treated cells was no longer different from control cells. While the exact underlying mechanism remains to be determined, the effect of Pna1 on cell survival corroborates the other data in that Pna1 positively affects intracellular growth factor signaling.

3.7. Identification of plant metabolites in extract Pna1

To have an idea of which molecules within extract Pna1 could be involved in its insulin-enhancing effect, the secondary metabolites present in this extract were identified by means of LC–PDA-CAD-MS. This revealed that ten compounds were present in Pna1 to a considerable extent (Fig. 8). Almost all compounds were detectable by positive and negative ion ESI MS and UV (Fig. 8A–D, respectively). The CAD trace is the less sensitive of the used detectors but is independent of the structure of the analyte (universal detector) and thus proportional to the amount of detected compound. Therefore, CAD data were used to quantify the relative concentrations of the compounds (Table 1). The CAD response shows that all compounds of Pna1 were detectable by MS and UV. Most of the compounds have previously been isolated from C. *colocynthis* fruits and were identified by comparing the obtained spectra with those from literature (Chawech et al., 2015; Dhakad et al., 2017; Gurudeeban et al., 2010; Hussain et al., 2014; Nayab et al., 2006; Yoshikawa et al., 2007). Two flavonoids were detected, isovitexin (compound 1) and a second flavonoid of which we were not able to firmly determine its identity, but which we believe is a methylated form of either vitexin or isovitexin (compound 2), with molecular weights of 432 and 462 g/mol, respectively (Table 1). Seven cucurbitacins, already reported to be present in C. *colocynthis*, were identified (compounds 3–9), with Tr values reaching from 7.75 to 16 min: the 2-O-β-D-glucopyranosyl forms of cucurbitacins J/K, I, E, and B, and cucurbitacins I, B, and E. The structures of cucurbitacins B, E, I, isovitexin, and elaterinide were confirmed by injection of authentic commercial samples. The structures of the 2-O-β-D-glucopyranosyl forms of cucurbitacins I (compound 4) and B (compound 6) are unambiguous since they have been described previously in C. *colocynthis* without any isomers. Concerning compound 3, Yoshikawa and colleagues have described the presence of the 2-O-glucosides of cucurbitacin J (C-24 α-OH) and cucurbitacin K (C-24 β-OH) in C. *colocynthis* that cannot be distinguished by LC-MS analysis (Yoshikawa et al., 2007). Glucopyranosyl-cucurbitacin E (compound 5), also known as colocynthin and elaterinide, accounted for more than 60% of the extract. A final peak was retrieved at Tr 16.67 min (compound 10). The corresponding metabolite had the molecular configuration of a cucurbitacin but had not been described yet in literature. We speculate that one of these 10 compounds, or possibly a combination of several, displays the insulin-enhancing activity that was discovered in Pna1. Of note, the first two peaks visible in all spectra (at Tr 1.07 and 1.43 in the CAD spectrum) corresponded to a total of 4.5% surface area and represented compounds that were not retained on the column. Analyses of these two peaks demonstrated that pectin (galacturonic acid polymers)

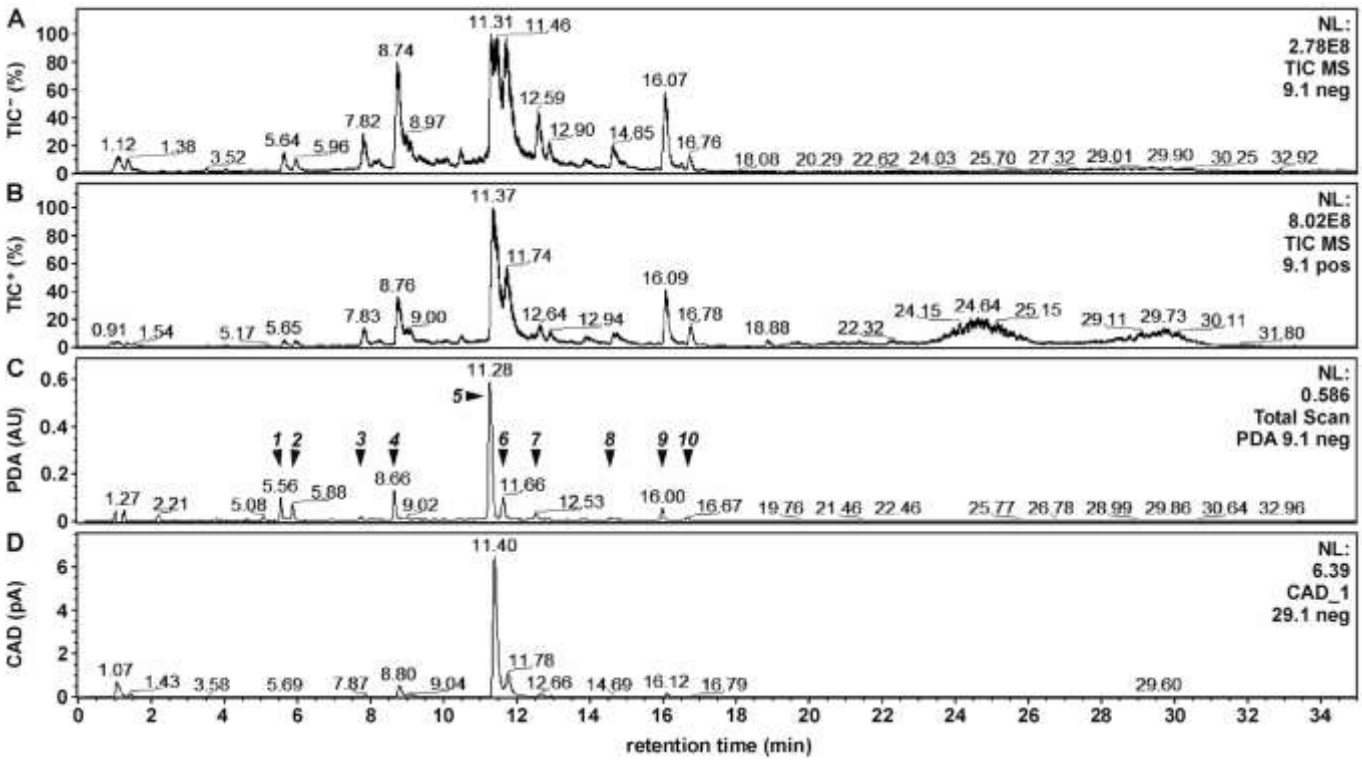
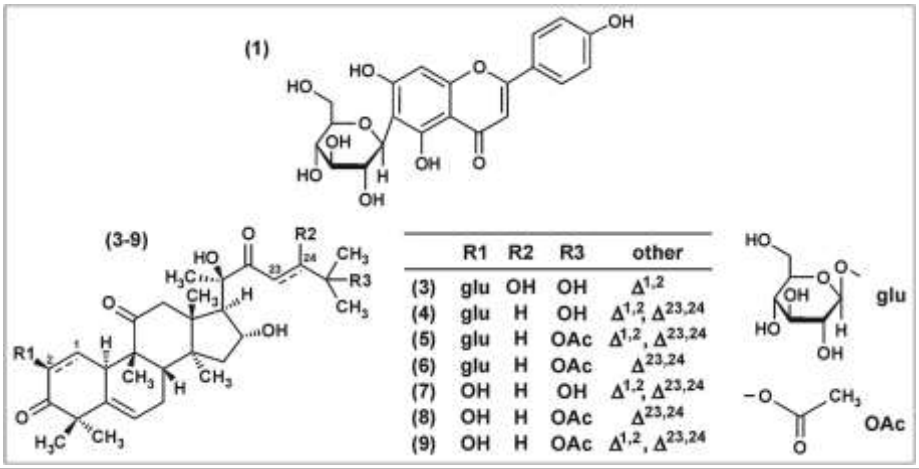


Fig. 8. Liquid Chromatography–PhotoDiode Array-Charged Aerosol Detector-ESI Mass Spectrometry (LC–PDA-CAD-MS) analyses of Pna1. (A) Negative total ion current chromatogram ((−)TIC). (B) (+)TIC. (C) PDA. (D) CAD. Peaks indicated in C are listed and further described in Table 1.

Table 1
LC–PDA-CAD-ESI/High Resolution MS data of *C. colocynthis* extract Pna1. The most abundant compounds are listed, together with their MS data and their relative presence in Pna1 (normalized to 100%). Corresponding peaks are indicated in Fig. 8C. Lower panel displays the molecular structures of the identified compounds. Δ indicates the presence of a double bond. *M + $HCOO^-$ adduct; **M + NH_4^+ adduct; *** tentatively annotated according to HR MS and MS/MS analysis.

N°	Tr (min)	% area	UV λ max (nm)	negative ion *m/z*	positive ion *m/z*	MW (g/mol)	molecular formula	compounds	ref
1	5.56	0.17	218, 270, 332	431.0973	433.1129	432	$C_{21}H_{20}O_{10}$	isovitexin (apigenin-6-C-glucoside)	Yoshikawa et al. (2007)
2	5.88	0.14	218, 270, 348	461.1078	463.1233	462	$C_{22}H_{22}O_{11}$	methoxy-(iso)vitexin***	–
3	7.75	0.97	224, 255	739.3521*	712.3903**	694	$C_{36}H_{54}O_{13}$	2-O-β-D-glucopyranosyl-cucurbitacin J (R2 = α-OH) or K (R2 = β-OH)	Yoshikawa et al. (2007)
4	8.66	4.87	236	721.3421*	694.3798**	676	$C_{36}H_{52}O_{12}$	2-O-β-D-glucopyranosyl-cucurbitacin I	Yoshikawa et al. (2007)
5	11.28	62.68	234	763.3530*	731.3907**	718	$C_{38}H_{54}O_{13}$	2-O-β-D-glucopyranosyl-cucurbitacin E (colocynthin, elaterinide)	Yoshikawa et al. (2007)
6	11.66	14.48	254	765.3685*	738.4065**	720	$C_{38}H_{56}O_{13}$	2-O-β-D-glucopyranosyl-cucurbitacin B (arvenin I)	Nayab et al. (2006)
7	12.53	1.67	230	559.2896*	–	514	$C_{30}H_{42}O_7$	cucurbitacin I (elatericin B, JSI-124)	Hussain et al. (2014)
8	14.75	0.30	223, 285	603.3154*	576.3529**	558	$C_{32}H_{46}O_8$	cucurbitacine B (amarin)	Hussain et al. (2014)
9	16.00	1.53	230, 270	601.3002*	574.3375**	556	$C_{32}H_{44}O_8$	cucurbitacin E (α-elaterin)	Hussain et al. (2014)
10	16.67	0.27	225, 306	631.3104*	604.3481**	586	$C_{33}H_{46}O_9$	unknown	–



and one or several hexoses were the main compounds of the first peak while the second first peak corresponded to citric acid. The LC–PDA-CAD-MS analysis of extract Sna1 (data not shown) demonstrated that these two initial peaks made up 25% of the total CAD surface area of Sna1, with the first larger peak corresponding to hexoses and malic acid and the second smaller peak to citric acid. The molecular composition of the rest of extract Sna1 largely resembled that of Pna1 in that all compounds of Pna1 (except compound 10) were also present in Sna1. Compounds 1 to 4 were respectively 8-, 11-, 1.8-, and 1.8-fold more present in Sna1 than in Pna1. In contrast, compounds 5 to 9 were respectively 15, 60, 40, 90, and 60% less present in Sna1 than in Pna1.

4. Discussion

So far, two of our studies (Azzi et al., 2015; Lahfa et al., 2017), as well as two studies from other laboratories (Abdel-Hassan et al., 2000; Agarwal et al., 2012), have demonstrated acute blood glucose-lowering effects of colocynth extracts in rodents and rabbits. Since in these studies plasma insulin levels have not been determined, it is unclear whether the blood glucose-lowering effect of colocynth extracts was due to a change in either pancreatic insulin secretion or glucose uptake by muscle and adipose tissue. Here, for the first time, the acute effects of colocynth extracts on glucose uptake in adipocytes *in vitro* have been investigated. Two of the extracts, Sna1 and Pna1, enhanced the insulin-induced translocation of GLUT4 from intracellular storage sites towards the plasma membrane and accordingly increased insulin-induced glucose uptake. Several of our findings suggested that pulp extract Pna1, which increased glucose uptake more than its seed homologue Sna1, increased GLUT4 translocation and glucose uptake by acting on the same intracellular signaling cascade as the one employed by insulin. First, Pna1 increased cell surface GLUT4 levels mostly at intermediate insulin concentrations (~1 nM), without augmenting its surface levels at high insulin concentrations (≥100 nM). Second, Pna1 increased GLUT4 translocation without changing translocation kinetics, similarly to the unaltered translocation kinetics when cells are stimulated with different concentrations of insulin (Berenguer et al., 2010). Third, while Pna1 did not enhance signaling via the Shc/GRB2/SOS/ERK and AMPK pathways (Fig. 6) (Taniguchi et al., 2006), it rapidly increased insulin-induced phosphorylation of PKB on both threonine residue 308 and serine residue 473. PKB phosphorylation is known to lead to its activation and to

the translocation of GLUT4 to the plasma membrane (Cong et al., 1997; Hill et al., 1999; Kohn et al., 1996). Therefore, we assume that Pna1 enhanced GLUT4 translocation through its effect on PKB. Remarkably, at 100 nM insulin, Pna1 further increased phosphorylation of PKB on both residues (Fig. 6) without enhancing insulin-induced GLUT4 translocation (Fig. 5), suggesting that at 100 nM insulin, in the absence of Pna1, a sufficient number of PKB molecules was activated to stimulate GLUT4 translocation to a full extent. This is in accordance with other studies that have shown that, while being a crucial node in insulin signaling, only a limited number of PKB molecules need to be phosphorylated for maximal PKB-relayed downstream effects (Ng et al., 2010; Tan et al., 2012). Interestingly, insulin is known to induce phosphorylation of PKB on Thr308 and Ser473 via two distinct kinases. Phosphorylation on Thr308 within PKB's activation loop by PDK1 leads to partial PKB activation, while phosphorylation on Ser473 within PKB's carboxy-terminal hydrophobic motif primarily by mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2), but also by the related kinase DNA-PK, is required for full activation of PKB (Hemmings and Restuccia, 2012; Manning and Toker, 2017). Fully active PKB is known to play an important role in cellular growth, proliferation, and survival (Hemmings and Restuccia, 2012; Manning and Toker, 2017). In accordance, the effect of Pna1 on PKB is likely to be implicated in the Pna1-induced enhancement of cell viability. When present during 24 h in medium containing 2% fetal bovine serum (FBS) instead of the regular 10%, the Pna1-induced increase in cell viability (affected by the 2% FBS) might be mediated via an effect of Pna1 on PKB-dependent signal transduction initiated by growth factors present in FBS (Fig. 4C). Pna1 also enhanced cell viability when cells were cultured for several days in the complete absence of serum, mimicking the effect of insulin (Fig. 7). While Pna1 fully protected the cells from a 28% reduction in cell viability during the first 48 h of deprivation, Pna1 no longer displayed any beneficial effect on viability after 96 h of deprivation, when cell viability was reduced to 60%. This transient effect of Pna1 on cell viability may have been caused by an enhancement of the PKB signaling induced by growth factors from serum that was ongoing when the serum was removed. Alternatively, it cannot be excluded that Pna1 by itself had induced phosphorylation of PKB to a very minor (non-measurable) extent, especially since the cells had been exposed chronically to Pna1, leading to a temporary increase in cell viability. Since adipocyte survival was also enhanced by rosiglitazone, we cannot fully exclude that Pna1 enhanced cell survival via an effect on transcription factor PPAR-γ. In any case, no major toxicity issues were revealed for the two ethyl acetate fractions of aqueous extracts of seed and pulp, Sna1 and Pna1. This is in accordance with previous reports that have demonstrated that, at least *in vivo*, aqueous colocynth extracts are not toxic (Dhakad et al., 2017; Gurudeeban et al., 2010), in contrast to alcoholic extracts that at elevated doses lead to diarrhea, which is most likely related to the laxative effect of the colocynth fruit (Shi et al., 2014).

At present, the mechanism by which Pna1 enhances PKB phosphorylation has not been identified. Pna1 does not appear to act on protein tyrosine phosphatase PTP1B, implicated in the dephosphorylation of the insulin receptor, since PTP1B inhibitors are known to increase insulin receptor tyrosine phosphorylation, in contrast to Pna1 (Erbe et al., 2009; Xie et al., 2003; Zhang et al., 2006). Therefore, Pna1 must have acted (directly or indirectly) on the insulin signaling cascade, anywhere between IRS1 and PKB, on either IRS1, PI 3-kinase, plasma membrane PIP3 levels, PDK1, or PKB (Hemmings and Restuccia, 2012; Taniguchi et al., 2006). Several hypotheses explain how Pna1 may increase PKB phosphorylation. First, Pna1 may increase PKB phosphorylation by inhibiting one of the two phosphatases that dephosphorylate PKB: protein phosphatase 2A (PP2A), dephosphorylating Thr308, or PH-domain leucine-rich-repeat-containing protein phosphatase PHLPP, which dephosphorylates Ser473 (Hemmings and Restuccia, 2012; Manning and Toker, 2017). These phosphatases assure the feedback inhibition of PKB activation, which limits PKB phosphorylation in magnitude and in time. Second, Pna1 might inhibit phosphatase and tensin homologue PTEN, responsible for the dephosphorylation of PIP3 into PIP2, which is a negative feedback mechanism for insulin-activated PI 3-kinase (Chen, C.Y. et al., 2018). This would lead to increased PIP3 concentrations within the plasma membrane and in an enhanced downstream signaling, starting with increases in the amount of PDK1 and PKB at the plasma membrane (Manning and Toker, 2017). Accordingly, a reduction in PTEN activity leads to increased PKB phosphorylation, especially in insulin-stimulated cells (Ma et al., 2018). Third, Pna1 may inhibit the insulin-activated inositol hexakisphosphate (IP6) kinase IP6K1 and thus the formation of IP7 out of IP6. IP7 competes with PIP3 for binding to the pleckstrin homology (PH) domain of PKB (Mackenzie and Elliott, 2014; Zhang et al., 2019). Therefore, if Pna1 inhibits IP6K1, this would lead to a reduction in the IP7-dependent limitation of PKB activation, allowing more PKB molecules to dock onto PIP3 at the plasma membrane and to be phosphorylated by PDK1. Interestingly, IP6K1 ablation enhances hormone-induced PKB phosphorylation on Thr308 and Ser473 without augmenting basal PKB phosphorylation (Chakraborty et al., 2010). Finally, the Pna1-induced enhancement of PKB phosphorylation may involve the nutrient-sensing kinase mTORC1 or mTORC1-regulated S6 kinase 1 (S6K1) (Dann et al., 2007; Fenton and Gout, 2011; Yoon, 2017). Both kinases phosphorylate IRS1 on serine residues, especially under conditions of insulin resistance, which disrupts its interaction with either PI 3-kinase or the insulin receptor, dependent on the serine residue that is phosphorylated, leading to submaximal PKB activation upon insulin stimulation (Boura-Halfon and Zick, 2009; Copps and White, 2012; Fenton and Gout, 2011; Yoon, 2017; Zhang et al., 2019). Hence, both mTORC1 and S6K1 may be targets of Pna1. Interestingly, as in Pna1-treated cells, inhibition of S6K1 increases PKB phosphorylation in the presence but not in the absence of insulin (Chen, J. et al., 2018). Of note, S6K1 also phosphorylates mTORC2, which leads to its inhibition, resulting in a decrease in the mTORC2-mediated phosphorylation of PKB on Ser473 (Copps and White, 2012; Manning and Toker, 2017) and probably also in a reduction in Thr308 phosphorylation, since Ser473 phosphorylation stabilizes phosphorylation at Thr308 (Manning and Toker, 2017). Thus, if Pna1 inhibits S6K1, this would not only result in a reduction in IRS1 serine phosphorylation but also in an independent increase in mTORC2 activity, both contributing to increases in insulin-induced PKB phosphorylation and glucose uptake (Shum et al., 2016; Um et al., 2004). In summary, several direct and indirect feedback mechanisms exist that limit the phosphorylation and activation of PKB and of which one may be the target of Pna1. These include phosphatases PP2A, PHLPP, and PTEN, and kinases IP6K1, mTORC1, and S6K1. Whether and which of these enzymes are implicated in the Pna1-induced increase in PKB phosphorylation and GLUT4 translocation remains to be determined.

While colocynth extracts have been widely studied for their antidiabetic effects *in vivo*, the active components responsible for these actions have not been identified so far (Hussain et al., 2014). The metabolites that were identified in extract Pna1 are cucurbitacins B (corresponding concentration in 100 μg/ml of extract: 0.54 μM), E (2.8 μM), and I (3.2 μM), their 2-O-β-D-glucopyranosyl forms (20.1 μM, 87.3 μM, and 7.2 μM, respectively), 2-O-β-D-glucopyranosyl-cucurbitacin J/K (1.4 μM), the flavone isovitexin (0.39 μM), and a methylated form of either vitexin or isovitexin (0.30 μM). Together, these nine molecules accounted for 87% of the composition of Pna1 and were also detected in extract Sna1. At present it is not known which of these molecules are responsible for the insulin-enhancing effects of Pna1. Remarkably, *Sna*I increased insulin-induced GLUT4 translocation at a concentration of 20 μg/ml, but not at 4 μg/ml nor at 100 μg/ml. In addition, while 4 μg/ml of Pna1 increased cell surface GLUT4 levels in non-stimulated cells but not in insulin-treated cells, 100 μg/ml of Pna1 resulted in the opposite effects. We hypothesize that this is due to the presence of stimulating as well as inhibitory molecules in these extracts (concerning both insulin-mimicking and insulin-enhancing activity), each of which displays maximum effects at a distinct concentration. The nine molecules that were identified in extracts Pna1 and Sna1 have been

reported to display a wide range of biological activities. Flavonoid glycoside isovitexin is known for its antioxidant and anti-inflammatory effects, via activation and inhibition of the Nrf2 and NFκB pathways, respectively (He et al., 2016; Lv et al., 2016). It also displays anti-cancer (Ganesan and Xu, 2017; He et al., 2016), insulinotropic (Folador et al., 2010) and α-glucosidase-inhibiting activity (Choo et al., 2012). Cucurbitacins B, E, I, at prolonged treatment, are all cytotoxic, inhibit STAT3 (Chan et al., 2010; Liu et al., 2020; Oi et al., 2016; Seo et al., 2014), disrupt cytoskeleton organization (Knecht et al., 2010; Sari-Hassoun et al., 2016; Yin et al., 2008), inhibit PKB phosphorylation (Si et al., 2019; Zhou et al., 2017; Zhu et al., 2018), and are particularly studied for their anti-microbial (Hussain et al., 2014) and anti-cancer effects (Garg et al., 2018; Li et al., 2018; Si et al., 2019). Cucurbitacin B was also found to display insulinotropic activity (Kim et al., 2018). Anti- but also pro-oxidant effects, likely dependent on experimental conditions, have been reported for cucurbitacins B and I (Lin et al., 2019; Lopez-Haber and Kazanietz, 2013; Ren et al., 2015; Yang and Kim, 2018). Cucurbitacin E was reported to increase AMPK activity (Wu et al., 2016; Zha et al., 2015) and to display anti-inflammatory (Qiao et al., 2013; Shang et al.) and anti-obesity effects (Murtaza et al., 2017). Much less is known about the biological activity of the 2-O-β-D-glucopyranosyl forms of cucurbitacins B, E, and I, nor of 2-O-β-D-glucopyranosyl-cucurbitacin J/K. Cytotoxicity has been reported for glucopyranosyl-cucurbitacin B (Minh et al., 2015). Antioxidant and proliferation-inhibitory activity was found for the glucopyranosyl forms of cucurbitacins B and E (Tannin-Spitz et al., 2007a, 2007b) and anti-allergic activity has been demonstrated for glucopyranosyl-cucurbitacin E (Yoshikawa et al., 2007). Since the glucopyranosyl forms of cucurbitacins B, E, and I were the three major constituents of extracts Pna1 and Sna1, it seems likely that one or several of these three molecules display insulin-enhancing activity.

Various plant metabolites have been shown to display beneficial effects on GLUT4 or on cellular glucose uptake, either in adipocytes or in myocytes. Some of these metabolites acutely increase cell surface GLUT4 levels, but, unlike Pna1, always display insulin-mimicking activity. These include the sesquiterpenic phytohormone abscisic acid (Bruzzone et al., 2012; Lanzerstorfer et al., 2014), alkaloids berberine (Lee et al., 2006; Zhou et al., 2007) and mahanine (Nooron et al., 2017), phenolic compounds such as caffeic acid (Huang et al., 2009), cinnamic acid (Huang et al., 2009), cyanidin-3-rutinoside (Choi et al., 2017), daidzein (Cheong et al., 2014), epigallocatechin gallate (Takagaki et al., 2019; Ueda et al., 2008), gallic acid (Lanzerstorfer et al., 2014; Prasad et al., 2010), isorhamnetin (Jiang et al., 2019), piceatannol (Minakawa et al., 2012), quercetin (Jiang et al., 2019), scopoletin (Jang et al., 2020), and tannic acid (Lanzerstorfer et al., 2014), amino acid 4-hydroxyisoleucine (Jaiswal et al., 2012) and the iridoid oleuropein (Fujiwara et al., 2017). The molecular mechanisms by which these phytochemicals act on GLUT4 most often remain to be determined. Exceptions are abscisic acid (Bruzzone et al., 2012), mahanine (Nooron et al., 2017), and quercetin (Jiang et al., 2019), which were shown to act on GLUT4 by inducing phosphorylation of PKB, and berberine, which appeared to affect GLUT4 through AMPK and PTP1B (Chen et al., 2010; Lee et al., 2006; Zhou et al., 2007). Our study has indicated that also the colocynth contains insulin-mimicking activity, at least regarding GLUT4, for instance in the 80% methanolic extracts of the colocynth seed (Snh1-2 and Sdh1-3), though this was not further investigated.

5. Conclusion

The current study has demonstrated that the cucurbitacin glycoside-rich ethyl acetate fraction of the colocynth non-defatted aqueous pulp extract displays insulin-enhancing but not insulin-mimicking activity towards PKB phosphorylation, cell surface GLUT4 levels, and cellular glucose uptake. To the best of our knowledge, this is the first time that such an activity is described for a plant extract or a plant compound. The insulin-enhancing activity of the colocynth fruit described here is likely to contribute to its anti-diabetic effects in traditional medicine. Since this extract appeared not to be toxic to cells, not even during prolonged treatments, it likely contains a compound that may have potential for the development of a novel therapeutic strategy for the treatment of T2D. It is important to note that Pna1 by itself did not activate PKB, since, at least in mice, a life-long enhancement of hormone-induced PKB activation has been demonstrated not to lead to an increase in tumor incidence (Chakraborty et al., 2010), in contrast to unconditional increases in PKB activity, that are detrimental with respect to tumor development (Manning and Toker, 2017).

While this is a first step in the identification and characterization of a novel insulin-enhancer, further investigations are required to warrant the potential of this insulin-enhancer for the treatment of T2D. First, the molecular identity of the insulin-enhancer is unknown at present and needs to be revealed. Second, it would be interesting to study the effect of the insulin-enhancing extracts (or purified insulin-enhancer) on insulin-resistant cells. Third, the effects of the insulin-enhancer on other insulin-sensitive tissues need to be investigated, in particular those involving the insulin-regulated uptake of glucose in skeletal muscle and the insulin-regulated gluconeogenesis in liver. Fourth, it would be interesting to demonstrate by which mechanism the insulin-enhancer increases insulin-induced PKB phosphorylation. Finally, it needs to be investigated whether the insulin-enhancer ameliorates glucose homeostasis in T2D animal models *in vivo*.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interests.

Author contributions

RG, FD, NF, and FL conceived the study. RG, NF, and FD coordinated the study. TG, FD, and RG performed the experiments. TG, NF, RG, FP, JFT, FD, and MH analyzed the data. RG and FD wrote the manuscript, with contributions from NF, JFT, FP, FL, TG, MH. The final version of the manuscript was reviewed and approved by all authors.

Acknowledgements

This work was supported by the Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), the University of Aix-Marseille (AMU), the Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE), the faculty of SNV of the University of Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen, and by a Franco-Algerian PROFAS B+ scholarship.

References

Abdel-Hassan, I.A., Abdel-Barry, J.A., Tariq Mohammeda, S., 2000. The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of citrullus colocynthis fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. J. Ethnopharmacol. 71, 325–330.

Agarwal, V., Sharma, A.K., Upadhyay, A., Singh, G., Gupta, R., 2012. Hypoglycemic effects of Citrullus colocynthis roots. Acta Pol. Pharm. Times 69, 75–79.

Amin, A., Tahir, M., Lone, K.P., 2017. Effect of Citrullus colocynthis aqueous seed extract on beta cell regeneration and intra-islet vasculature in alloxan induced diabetic male albino rats. J. Pakistan Med. Assoc. 67, 715–721.

Azzi, R., Lahfa, F.B., Mezouar, D., Benmehdi, H., Djaziri, R., 2015. Acute toxicity, hypoglycemic and antihyperglycemic effects of ethanolic extract of Citrullus Colocynthis L seeds in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. In: 2nd International Conference on Advances in Environment, Agriculture & Medical Sciences. ICAEAM, pp. 42–46.

Bailey, C.J., Day, C., 1989. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. Diabetes Care 12, 553–564.

Barghamdi, B., Ghorat, F., Asadollahi, K., Sayehmiri, K., Peyghambari, R., Abangah, G., 2016. Therapeutic effects of Citrullus colocynthis fruit in patients with type II diabetes: a clinical trial study. J. Pharm. BioAllied Sci. 8, 130–134.

Benariba, N., Djaziri, R., Hupkens, E., Louchami, K., Malaisse, W.J., Sener, A., 2013. Insulinotropic action of Citrullus colocynthis seed extracts in rat pancreatic islets. Mol. Med. Rep. 7, 233–236.

Benariba, N., Djaziri, R., Zerriouh, B.H., Bellakhdar, W., Hupkens, E., Boucherit, Z., Malaisse, W.J., 2012. Short- and long-term effects of various Citrullus colocynthis

seed extracts in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. Int. J. Mol. Med. 30, 1528–1536.
Berenguer, M., Le Marchand-Brustel, Y., Govers, R., 2010. GLUT4 molecules are recruited at random for insertion within the plasma membrane upon insulin stimulation. FEBS Lett. 584, 537–542.
Bogan, J.S., 2012. Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes. Annu. Rev. Biochem. 81, 507–532.
Boura-Halfon, S., Zick, Y., 2009. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 296, E581–E591.
Bruzzone, S., Ameri, P., Briatore, L., Mannino, E., Basile, G., Andraghetti, G., Grozio, A., Magnone, M., Guida, L., Scarfì, S., Salis, A., Damonte, G., Sturla, L., Nencioni, A., Fenoglio, D., Fiory, F., Miele, C., Beguinot, F., Ruvolo, V., Bormioli, M., Colombo, G., Maggi, D., Murialdo, G., Cordera, R., De Flora, A., Zocchi, E., 2012. The plant hormone abscisic acid increases in human plasma after hyperglycemia and stimulates glucose consumption by adipocytes and myoblasts. Faseb. J. 26, 1251–1260.
Chakraborty, A., Koldobskiy, M.A., Bello, N.T., Maxwell, M., Potter, J.J., Juluri, K.R., Maag, D., Kim, S., Huang, A.S., Dailey, M.J., Saleh, M., Snowman, A.M., Moran, T.H., Mezey, E., Snyder, S.H., 2010. Inositol pyrophosphates inhibit Akt signaling, thereby regulating insulin sensitivity and weight gain. Cell 143, 897–910.
Chan, K.T., Li, K., Liu, S.L., Chu, K.H., Toh, M., Xie, W.D., 2010. Cucurbitacin B inhibits STAT3 and the Raf/MEK/ERK pathway in leukemia cell line K562. Canc. Lett. 289, 46–52.
Chawech, R., Jarraya, R., Girardi, C., Vansteelandt, M., Marti, G., Nasri, I., Racaud-Sultan, C., Fabre, N., 2015. Cucurbitacins from the leaves of Citrullus colocynthis (L.) schrad. Molecules 20, 18001–18015.
Chen, C., Zhang, Y., Huang, C., 2010. Berberine inhibits PTP1B activity and mimics insulin action. Biochem. Biophys. Res. Commun. 397, 543–547.
Chen, C.Y., Chen, J., He, L., Stiles, B.L., 2018a. PTEN: tumor suppressor and metabolic regulator. Front. Endocrinology 9, 338.
Chen, J., Sun, J., Prinz, R.A., Li, Y., Xu, X., 2018b. Gingerenone A sensitizes the insulin receptor and increases glucose uptake by inhibiting the activity of p70 S6 kinase. Mol. Nutr. Food Res. 62 e1800709.
Cheong, S.H., Furuhashi, K., Ito, K., Nagaoka, M., Yonezawa, T., Miura, Y., Yagasaki, K., 2014. Daidzein promotes glucose uptake through glucose transporter 4 translocation to plasma membrane in L6 myocytes and improves glucose homeostasis in Type 2 diabetic model mice. J. Nutr. Biochem. 25, 136–143.
Choi, K.H., Lee, H.A., Park, M.H., Han, J.S., 2017. Cyanidin-3-rutinoside increases glucose uptake by activating the PI3K/Akt pathway in 3T3-L1 adipocytes. Environ. Toxicol. Pharmacol. 54, 1–6.
Choo, C.Y., Sulong, N.Y., Man, F., Wong, T.W., 2012. Vitexin and isovitexin from the Leaves of Ficus deltoidea with in-vivo alpha-glucosidase inhibition. J. Ethnopharmacol. 142, 776–781.
Cong, L.N., Chen, H., Li, Y., Zhou, L., McGibbon, M.A., Taylor, S.I., Quon, M.J., 1997. Physiological role of Akt in insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. Mol. Endocrinol. 11, 1881–1890.
Copps, K.D., White, M.F., 2012. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. Diabetologia 55, 2565–2582.
Dallak, M., Bashir, N., Abbas, M., Elessa, R., Haidara, M., Khalil, M.I., Al-Khateeb, M.A., 2009. Concomitant down regulation of glycolytic enzymes, upregulation of gluconeogenic enzymes and potential hepato-nephro-protective effects following the chronic administration of the hypoglycemic, insulinotropic Citrullus colocynthis pulp extract. Am. J. Biochem. Biotechnol. 5, 153–161.
Dann, S.G., Selvaraj, A., Thomas, G., 2007. mTOR Complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. Trends Mol. Med. 13, 252–259.
Dhakad, P.K., Sharma, P.K., Kumar, S., 2017. A review on phytochemical studies and biological potential of Citrullus colocynthis (L.) Schrad (Cucurbitaceae). Bioeng. Biosci 5, 55–64.
Ebrahimi, E., Bahramzadeh, S., Hashemitabar, M., Mohammadzadeh, G., Shirali, S., Jodat, J., 2016. Effect of hydroalcoholic leaves extract of Citrullus colocynthis on induction of insulin secretion from isolated islets of Langerhans. Asian Pac. J. Trop. Dis 6, 638–641.
Erbe, D.V., Klaman, L.D., Wilson, D.P., Wan, Z.K., Kirincich, S.J., Will, S., Xu, X., Kung, L., Wang, S., Tam, S., Lee, J., Tobin, J.F., 2009. Prodrug delivery of novel PTP1B inhibitors to enhance insulin signalling. Diabetes Obes. Metabol. 11, 579–588.
Fenton, T.R., Gout, I.T., 2011. Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. Int. J. Biochem. Cell Biol. 43, 47–59.
Folador, P., Cazarolli, L.H., Gazola, A.C., Reginatto, F.H., Schenkel, E.P., Silva, F.R., 2010. Potential insulin secretagogue effects of isovitexin and swertisin isolated from Wilbrandia ebracteata roots in non-diabetic rats. Fitoterapia 81, 1180–1187.
Fonseca, V., 2013. Diabetes mellitus in the next decade: novel pipeline medications to treat hyperglycemia. Clin. Therapeut. 35, 714–723.
Freedman, D.A., 2009. Statistical Models - Theory and Practice. Cambridge University Press 2nd.
Fujimoto, W.Y., 2000. The importance of insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Am. J. Med. (108 Suppl. 6a) 9S-14S.
Fujiwara, Y., Tsukahara, C., Ikeda, N., Sone, Y., Ishikawa, T., Ichi, I., Koike, T., Aoki, Y., 2017. Oleuropein improves insulin resistance in skeletal muscle by promoting the translocation of GLUT4. J. Clin. Biochem. Nutr. 61, 196–202.
Fukumoto, H., Kayano, T., Buse, J.B., Edwards, Y., Pilch, P.F., Bell, G.I., Seino, S., 1989. Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. J. Biol. Chem. 264, 7776–7779.
Ganesan, K., Xu, B., 2017. Molecular targets of vitexin and isovitexin in cancer therapy: a critical review. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1401, 102–113.
Garg, S., Kaul, S.C., Wadhwa, R., 2018. Cucurbitacin B and cancer intervention: chemistry, biology and mechanisms. Int. J. Oncol. 52, 19–37 (Review).
Govers, R., 2014. Cellular regulation of glucose uptake by glucose transporter GLUT4. Adv. Clin. Chem. 66, 173–239.
Govers, R., Coster, A.C., James, D.E., 2004. Insulin increases cell surface GLUT4 levels by dose dependently discharging GLUT4 into a cell surface recycling pathway. Mol. Cell Biol. 24, 6456–6466.
Govers, R., James, D.E., Coster, A.C., 2008. High-throughput analysis of the dynamics of recycling cell surface proteins. Methods Mol. Biol. 440, 129–146.
Gurudeeban, S., Satyavani, K., Ramanathan, T., 2010. Bitter apple (Citrullis colocynthis): an overview of chemical compostion and biomedical effects. As. J. Plant Sci. 9, 394–401.
He, M., Min, J.W., Kong, W.L., He, X.H., Li, J.X., Peng, B.W., 2016. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. Fitoterapia 115, 74–85.
Hemmings, B.A., Restuccia, D.F., 2012. PI3K-PKB/Akt pathway. Cold Spring Harb Perspect Biol 4 a011189.
Hill, M.M., Clark, S.F., Tucker, D.F., Birnbaum, M.J., James, D.E., Macaulay, S.L., 1999. A role for protein kinase Bbeta/Akt2 in insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes. Mol. Cell Biol. 19, 7771–7781.
Huang, D.W., Shen, S.C., Wu, J.S., 2009. Effects of caffeic acid and cinnamic acid on glucose uptake in insulin-resistant mouse hepatocytes. J. Agric. Food Chem. 57, 7687–7692.
Huseini, H.F., Darvishzadeh, F., Heshmat, R., Jafariazar, Z., Raza, M., Larijani, B., 2009. The clinical investigation of Citrullus colocynthis (L.) schrad fruit in treatment of Type II diabetic patients: a randomized, double blind, placebo-controlled clinical trial. Phytother Res. 23, 1186–1189.
Hussain, A.I., Rathore, H.A., Sattar, M.Z., Chatha, S.A., Sarker, S.D., Gilani, A.H., 2014. Citrullus colocynthis (L.) Schrad (bitter apple fruit): a review of its phytochemistry, pharmacology, traditional uses and nutritional potential. J. Ethnopharmacol. 155, 54–66.
Jaiswal, N., Maurya, C.K., Venkateswarlu, K., Sukanya, P., Srivastava, A.K., Narender, T., Tamrakar, A.K., 2012. 4-Hydroxyisoleucine stimulates glucose uptake by increasing surface GLUT4 level in skeletal muscle cells via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway. Eur. J. Nutr. 51, 893–898.
James, D.E., Brown, R., Navarro, J., Pilch, P.F., 1988. Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. Nature 333, 183–185.
James, D.E., Strube, M., Mueckler, M., 1989. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. Nature 338, 83–87.
Jang, J.H., Park, J.E., Han, J.S., 2020. Scopoletin increases glucose uptake through activation of PI3K and AMPK signaling pathway and improves insulin sensitivity in 3T3-L1 cells. Nutr. Res. 74, 52–61.
Jiang, H., Yamashita, Y., Nakamura, A., Croft, K., Ashida, H., 2019. Quercetin and its metabolite isorhamnetin promote glucose uptake through different signalling pathways in myotubes. Sci. Rep. 9, 2690.
Kim, K.H., Lee, I.S., Park, J.Y., Kim, Y., An, E.J., Jang, H.J., 2018. Cucurbitacin B induces hypoglycemic effect in diabetic mice by regulation of AMP-activated protein kinase alpha and glucagon-like peptide-1 via bitter taste receptor signaling. Front. Pharmacol. 9, 1071.
Knecht, D.A., LaFleur, R.A., Kahsai, A.W., Argueta, C.E., Beshir, A.B., Fenteany, G., 2010. Cucurbitacin I inhibits cell motility by indirectly interfering with actin dynamics. PloS One 5, e14039.
Kohn, A.D., Summers, S.A., Birnbaum, M.J., Roth, R.A., 1996. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. J. Biol. Chem. 271, 31372–31378.
Kumar, A., Bharti, S.K., Kumar, A., 2017. Therapeutic molecules against type 2 diabetes: what we have and what are we expecting? Pharmacol. Rep. 69, 959–970.
Lahfa, F.B., Azzi, R., Mezouar, D., Djaziri, R., 2017. Hypoglycemic effect of Citrullus colocynthis extracts. Phytothérapie 15, 50–56.
Lam, D.W., LeRoith, D., 2012. The worldwide diabetes epidemic. Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes 19, 93–96.
Lanzerstorfer, P., Stadlbauer, V., Chtcheglova, L.A., Haselgrubler, R., Borgmann, D., Wruss, J., Hinterdorfer, P., Schroder, K., Winkler, S.M., Hoglinger, O., Weghuber, J., 2014. Identification of novel insulin mimetic drugs by quantitative total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. Br. J. Pharmacol. 171, 5237–5251.
Lee, Y.S., Kim, W.S., Kim, K.H., Yoon, M.J., Cho, H.J., Shen, Y., Ye, J.M., Lee, C.H., Oh, W.K., Kim, C.T., Hohnen-Behrens, C., Gosby, A., Kraegen, E.W., James, D.E., Kim, J.B., 2006. Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states. Diabetes 55, 2256–2264.
Li, H., Chen, H., Li, R., Xin, J., Wu, S., Lan, J., Xue, K., Li, X., Zuo, C., Jiang, W., Zhu, L., 2018. Cucurbitacin I induces cancer cell death through the endoplasmic reticulum stress pathway. J. Cell. Biochem. 120, 2391–2403.
Li, Y., Zheng, M., Zhai, X., Huang, Y., Khalid, A., Malik, A., Shah, P., Karim, S., Azhar, S., Hou, X., 2015. Effect of-gymnema sylvestre, Citrullus colocynthis and Artemisia absinthium on blood glucose and lipid profile in diabetic human. Acta pol. Pharm. Times 72, 981–985.
Lin, Y., Kotakeyama, Y., Li, J., Pan, Y., Matsuura, A., Ohya, Y., Yoshida, M., Xiang, L., Qi, J., 2019. Cucurbitacin B exerts antiaging effects in yeast by regulating autophagy and oxidative stress. Oxid. Med. Cell. Longev 2019, 4517091.
Liu, Y., Yang, H., Guo, Q., Liu, T., Jiang, Y., Zhao, M., Zeng, K., Tu, P., 2020. Cucurbitacin E inhibits Huh7 hepatoma carcinoma cell proliferation and metastasis via suppressing MAPKs and JAK/STAT3 pathways. Molecules 25, 560.

Lopez-Haber, C., Kazanietz, M.G., 2013. Cucurbitacin I inhibits Rac1 activation in breast cancer cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism and independently of Janus tyrosine kinase 2 and P-Rex1. Mol. Pharmacol. 83, 1141–1154.
Lv, H., Yu, Z., Zheng, Y., Wang, L., Qin, X., Cheng, G., Ci, X., 2016. Isovitexin exerts anti-inflammatory and anti-oxidant activities on lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting MAPK and NF-kappaB and activating HO-1/Nrf2 pathways. Int. J. Biol. Sci. 12, 72–86.
Ma, M., Quan, Y., Li, Y., He, X., Xiao, J., Zhan, M., Zhao, W., Xin, Y., Lu, L., Luo, L., 2018. Bidirectional modulation of insulin action by reactive oxygen species in 3T3L1 adipocytes. Mol. Med. Rep. 18, 807–814.
Mackenzie, R.W., Elliott, B.T., 2014. Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. Diabetes Metab. Syndr. Obesity 7, 55–64.
Manning, B.D., Toker, A., 2017. AKT/PKB signaling: navigating the network. Cell 169, 381–405.
Martinez, L., Berenguer, M., Bruce, M.C., Le Marchand-Brustel, Y., Govers, R., 2010. Rosiglitazone increases cell surface GLUT4 levels in 3T3-L1 adipocytes through an enhancement of endosomal recycling. Biochem. Pharmacol. 79, 1300–1309.
Minakawa, M., Miura, Y., Yagasaki, K., 2012. Piceatannol, a resveratrol derivative, promotes glucose uptake through glucose transporter 4 translocation to plasma membrane in L6 myocytes and suppresses blood glucose levels in type 2 diabetic model db/db mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 422, 469–475.
Minh, C.V., Nhiem, N.X., Yen, H.T., Kiem, P.V., Tai, B.H., Le Tuan Anh, H., Hien, T.T., Park, S., Kim, N., Kim, S.H., 2015. Chemical constituents of Trichosanthes kirilowii and their cytotoxic activities. Arch Pharm. Res. (Seoul) 38, 1443–1448.
Murtaza, M., Khan, G., Aftab, M.F., Afridi, S.K., Ghaffar, S., Ahmed, A., Hafizur, R.M., Waraich, R.S., 2017. Cucurbitacin E reduces obesity and related metabolic dysfunction in mice by targeting JAK-STAT5 signaling pathway. PloS One 12, e0178910.
Nayab, D., Ali, D., Arshad, N., Malik, A., Choudhary, M.I., Ahmed, Z., 2006. Cucurbitacin glucosides from Citrullus colocynthis. Nat. Prod. Res. 20, 409–413.
Ng, Y., Ramm, G., Burchfield, J.G., Coster, A.C., Stockli, J., James, D.E., 2010. Cluster analysis of insulin action in adipocytes reveals a key role for Akt at the plasma membrane. J. Biol. Chem. 285, 2245–2257.
Nmila, R., Gross, R., Rchid, H., Roye, M., Manteghetti, M., Petit, P., Tijane, M., Ribes, G., Sauvaire, Y., 2000. Insulinotropic effect of Citrullus colocynthis fruit extracts. Planta Med. 66, 418–423.
Nooron, N., Athipornchai, A., Suksamrarn, A., Chiabchalard, A., 2017. Mahanine enhances the glucose-lowering mechanisms in skeletal muscle and adipocyte cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 494, 101–106.
Oi, T., Asanuma, K., Matsumine, A., Matsubara, T., Nakamura, T., Iino, T., Asanuma, Y., Goto, M., Okuno, K., Kakimoto, T., Yada, Y., Sudo, A., 2016. STAT3 inhibitor, cucurbitacin I, is a novel therapeutic agent for osteosarcoma. Int. J. Oncol. 49, 2275–2284.
Ostovar, M., Akbari, A., Anbardar, M.H., Iraji, A., Salmanpour, M., Hafez Ghoran, S., Heydari, M., Shams, M., 2020. Effects of Citrullus colocynthis L. in a rat model of diabetic neuropathy. J. Integr. Med 18, 59–67.
Patel, D.K., Prasad, S.K., Kumar, R., Hemalatha, S., 2012. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. Asian Pac. J. Trop. Biomed 2, 320–330.
Prasad, C.N., Anjana, T., Banerji, A., Gopalakrishnapillai, A., 2010. Gallic acid induces GLUT4 translocation and glucose uptake activity in 3T3-L1 cells. FEBS Lett. 584, 531–536.
Qiao, J., Xu, L.H., He, J., Ouyang, D.Y., He, X.H., 2013. Cucurbitacin E exhibits anti-inflammatory effect in RAW 264.7 cells via suppression of NF-kappaB nuclear translocation. Inflamm. Res. 62, 461–469.
Quon, M.J., Guerre-Millo, M., Zarnowski, M.J., Butte, A.J., Em, M., Cushman, S.W., Taylor, S.I., 1994. Tyrosine kinase-deficient mutant human insulin receptors (Met1153–>Ile) overexpressed in transfected rat adipose cells fail to mediate translocation of epitope-tagged GLUT4. In: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, vol. 91, pp. 5587–5591.
Ren, G., Sha, T., Guo, J., Li, W., Lu, J., Chen, X., 2015. Cucurbitacin B induces DNA damage and autophagy mediated by reactive oxygen species (ROS) in MCF-7 breast cancer cells. J. Nat. Med. 69, 522–530.
Sano, H., Eguez, L., Teruel, M.N., Fukuda, M., Chuang, T.D., Chavez, J.A., Lienhard, G.E., McGraw, T.E., 2007. Rab10, a target of the AS160 Rab GAP, is required for insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the adipocyte plasma membrane. Cell Metabol. 5, 293–303.
Sari-Hassoun, M., Clement, M.J., Hamdi, I., Bollot, G., Bauvais, C., Joshi, V., Toma, F., Burgo, A., Cailleret, M., Rosales-Hernandez, M.C., Macias Perez, M.E., Chabane-Sari, D., Curmi, P.A., 2016. Cucurbitacin I elicits the formation of actin/phospho-myosin II co-aggregates by stimulation of the RhoA/ROCK pathway and inhibition of LIM-kinase. Biochem. Pharmacology 102, 45–63.
Sebbagh, N., Cruciani-Guglielmacci, C., Ouali, F., Berthault, M.F., Rouch, C., Sari, D.C., Magnan, C., 2009. Comparative effects of Citrullus colocynthis, sunflower and olive oil-enriched diet in streptozotocin-induced diabetes in rats. Diabetes Metab. 35, 178–184.
Seo, C.R., Yang, D.K., Song, N.J., Yun, U.J., Gwon, A.R., Jo, D.G., Cho, J.Y., Yoon, K., Ahn, J.Y., Nho, C.W., Park, W.J., Yang, S.Y., Park, K.W., 2014. Cucurbitacin B and cucurbitacin I suppress adipocyte differentiation through inhibition of STAT3 signaling. Food Chem. Toxicol. 64, 217–224.
Shang, J., Liu, W., Yin, C., Chu, H., Zhang, M., 2019. Cucurbitacin E ameliorates lipopolysaccharide-evoked injury, inflammation and MUC5AC expression in bronchial epithelial cells by restraining the HMGB1-TLR4-NF-kappaB signaling. Mol. Immunol. 114, 571–577.
Shewan, A.M., Marsh, B.J., Melvin, D.R., Martin, S., Gould, G.W., James, D.E., 2000. The cytosolic C-terminus of the glucose transporter GLUT4 contains an acidic cluster endosomal targeting motif distal to the dileucine signal. Biochem. J. 350, 99–107.
Shi, C., Karim, S., Wang, C., Zhao, M., Murtaza, G., 2014. A review on antidiabetic activity of Citrullus colocynthis Schrad. Acta Pol. Pharm. Times 71, 363–367.
Shu, Y.Z., 1998. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. J. Nat. Prod. 61, 1053–1071.
Shum, M., Bellmann, K., St-Pierre, P., Marette, A., 2016. Pharmacological inhibition of S6K1 increases glucose metabolism and Akt signalling in vitro and in diet-induced obese mice. Diabetologia 59, 592–603.
Si, W., Lyu, J., Liu, Z., Wang, C., Huang, J., Jiang, L., Ma, T., 2019. Cucurbitacin E inhibits cellular proliferation and enhances the chemo-response in gastric cancer by suppressing AKt activation. J. Canc. 10, 5843–5851.
Takagaki, A., Yoshioka, Y., Yamashita, Y., Nagano, T., Ikeda, M., Hara-Terawaki, A., Seto, R., Ashida, H., 2019. Effects of microbial metabolites of (-)-Epigallocatechin gallate on glucose uptake in L6 skeletal muscle cell and glucose tolerance in ICR mice. Biol. Pharm. Bull. 42, 212–221.
Talantikite, M., Berenguer, M., Gonzalez, T., Alessi, M.C., Poggi, M., Peiretti, F., Govers, R., 2016. The first intracellular loop of GLUT4 contains a retention motif. J. Cell Sci. 129, 2273–2284.
Tan, S.X., Ng, Y., Meoli, C.C., Kumar, A., Khoo, P.S., Fazakerley, D.J., Junutula, J.R., Vali, S., James, D.E., Stockli, J., 2012. Amplification and demultiplexing in insulin-regulated Akt protein kinase pathway in adipocytes. J. Biol. Chem. 287, 6128–6138.
Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., Kahn, C.R., 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7, 85–96.
Tannin-Spitz, T., Bergman, M., Grossman, S., 2007a. Cucurbitacin glucosides: antioxidant and free-radical scavenging activities. Biochem. Biophys. Res. Commun. 364, 181–186.
Tannin-Spitz, T., Grossman, S., Dovrat, S., Gottlieb, H.E., Bergman, M., 2007b. Growth inhibitory activity of cucurbitacin glucosides isolated from Citrullus colocynthis on human breast cancer cells. Biochem. Pharmacol. 73, 56–67.
Thule, P.M., 2012. Mechanisms of current therapies for diabetes mellitus type 2. Adv. Physiol. Educ. 36, 275–283.
Ueda, M., Nishiumi, S., Nagayasu, H., Fukuda, I., Yoshida, K., Ashida, H., 2008. Epigallocatechin gallate promotes GLUT4 translocation in skeletal muscle. Biochem. Biophys. Res. Commun. 377, 286–290.
Um, S.H., Frigerio, F., Watanabe, M., Picard, F., Joaquin, M., Sticker, M., Fumagalli, S., Allegrini, P.R., Kozma, S.C., Auwerx, J., Thomas, G., 2004. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. Nature 431, 200–205.
Wu, Y.L., Zhang, Y.J., Yao, Y.L., Li, Z.M., Han, X., Lian, L.H., Zhao, Y.Q., Nan, J.X., 2016. Cucurbitacin E ameliorates hepatic fibrosis in vivo and in vitro through activation of AMPK and blocking mTOR-dependent signaling pathway. Toxicol. Lett. 258, 147–158.
Xie, L., Lee, S.Y., Andersen, J.N., Waters, S., Shen, K., Guo, X.L., Moller, N.P., Olefsky, J. M., Lawrence, D.S., Zhang, Z.Y., 2003. Cellular effects of small molecule PTP1B inhibitors on insulin signaling. Biochemistry 42, 12792–12804.
Yang, D.K., Kim, S.J., 2018. Cucurbitacin I protects H9c2 cardiomyoblasts against H2O2-induced oxidative stress via protection of mitochondrial dysfunction. Oxid. Med. Cell. Longev 2018, 3016382.
Yin, D., Wakimoto, N., Xing, H., Lu, D., Huynh, T., Wang, X., Black, K.L., Koeffler, H.P., 2008. Cucurbitacin B markedly inhibits growth and rapidly affects the cytoskeleton in glioblastoma multiforme. Int. J. Canc. 123, 1364–1375.
Yoon, M.S., 2017. The role of mammalian target of rapamycin (mTOR) in insulin signaling. Nutrients 9, 1176.
Yoshikawa, M., Morikawa, T., Kobayashi, H., Nakamura, A., Matsuhira, K., Nakamura, S., Matsuda, H., 2007. Bioactive saponins and glycosides. XXVII.1) Structures of new cucurbitane-type triterpene glycosides and antiallergic constituents from Citrullus colocynthis. Chem. Pharm. Bull. 55, 428–434.
Zaarour, N., Berenguer, M., Le Marchand-Brustel, Y., Govers, R., 2012. Deciphering the role of GLUT4 N-glycosylation in adipocyte and muscle cell models. Biochem. J. 445, 265–273.
Zha, Q.B., Zhang, X.Y., Lin, Q.R., Xu, L.H., Zhao, G.X., Pan, H., Zhou, D., Ouyang, D.Y., Liu, Z.H., He, X.H., 2015. Cucurbitacin E induces autophagy via downregulating mTORC1 signaling and upregulating AMPK activity. PloS One 10, e0124355.
Zhang, W., Hong, D., Zhou, Y., Zhang, Y., Shen, Q., Li, J.Y., Hu, L.H., Li, J., 2006. Ursolic acid and its derivative inhibit protein tyrosine phosphatase 1B, enhancing insulin receptor phosphorylation and stimulating glucose uptake. Biochim. Biophys. Acta 1760, 1505–1512.
Zhang, Z., Liu, H., Liu, J., 2019. Akt activation: a potential strategy to ameliorate insulin resistance. Diabetes Res. Clin. Pract. 156, 107092.
Zhou, J., Zhao, T., Ma, L., Liang, M., Guo, Y.J., Zhao, L.M., 2017. Cucurbitacin B and SCH 7 72984 exhibit synergistic anti-pancreatic cancer activities by suppressing EGFR, PI3K/Akt/mTOR, STAT3 and ERK signaling. Oncotarget 8, 103167–103181.
Zhou, L., Yang, Y., Wang, X., Liu, S., Shang, W., Yuan, G., Li, F., Tang, J., Chen, M., Chen, J., 2007. Berberine stimulates glucose transport through a mechanism distinct from insulin. Metabolism 56, 405–412.
Zhu, X., Huang, H., Zhang, J., Liu, H., Ao, R., Xiao, M., Wu, Y., 2018. The anticancer effects of Cucurbitacin I inhibited cell growth of human nonsmall cell lung cancer through PI3K/AKT/p70S6K pathway. Mol. Med. Rep. 17, 2750–2756.

Chapitre 4 Effet inhibiteur des extraits de Citrullus colocynthis sur l'activité de l'alpha-amylase

I. Introduction

Parmi de nombreuses enzymes du tube digestif, l'α-amylase pancréatique (E.C. 3.2.1.1) digère les oligosaccharides provenant de la dégradation des hydrates de carbone en formant le maltose, le maltotriose et les oligodéxtrans. Les α-amylases constituent une famille d'endoamylases qui catalysent les clivages des liaisons glycosidiques α-D- (1-4) (Kuriki and Imanaka 1999). Les glucides sont les principaux constituants de l'alimentation humaine et jouent principalement un rôle dans l'approvisionnement énergétique. Les composants complexes des glucides alimentaires doivent être décomposés en monosaccharides par l'α-amylase et les glucosidases, car seuls les monosaccharides peuvent être absorbés par la lumière intestinale et transportés dans la circulation sanguine (Haseltine, Rolfsmeier, and Blum 1996).

L'une des cibles thérapeutiques actuellement introduites dans la gestion du diabète de type 2 est l'inhibition de l'α-glucosidase et de l'α-amylase pour diminuer la réabsorption intestinale du glucose dans l'intestin(Kajaria et al. 2013). Un retard de la réabsorption des glucides par l'inhibition d'enzymes telles que l'α-amylase entraînerait une réduction du taux de glucose dans le sang et est considéré comme une stratégie thérapeutique pour le traitement du diabète. Les inhibiteurs d'α -amylase ont donc un rôle thérapeutique et un groupe de médicaments introduits dans la gestion du diabète sont les inhibiteurs d'alpha-amylase. Les inhibiteurs actuels de l' α -amylase et de la glucosidase en usage clinique tels que l'acarbose, le voglibose et le miglitol sont largement utilisés, isolément ou en combinaison avec des sécrétagogues d'insuline, pour les patients atteints de diabète de type II, cependant ils sont tous associés à des effets secondaires tels que l'hypoglycémie, la diarrhée, les flatulences et les ballonnements intestinaux qui limitent leur utilisation dans le traitement du diabète et de ses complications (Bashary et al. 2020). En outre, certains d'entre eux peuvent augmenter l'incidence des tumeurs rénales, des lésions hépatiques et de l'hépatite aiguë (Shanmugam, Sreerama, and Malleshi 2009).

Il y a donc un besoin urgent de rechercher des thérapies complémentaires et alternatives avec des effets secondaires minimaux, par conséquent, les extraits naturels de plantes médicinales traditionnelles disponibles sont un domaine d'investigation important avec un grand potentiel pour la découverte de nouveaux médicaments antidiabétiques. Il a été rapporté que différentes plantes présentent une activité inhibitrice de l'α-amylase et peuvent donc être pertinentes pour le traitement du diabète, plus de 400 plantes traditionnelles ont été enregistrées avec des effets antidiabétiques, mais très peu de ces plantes traditionnelles ont fait l'objet d'une enquête scientifique ou médicale appropriée(Rahimzadeh et al. 2014)

L'analyse des inhibiteurs de l'α-amylase est effectuée par la quantification du sucre réducteur libéré dans le milieu (maltose). L'activité inhibitrice de l'enzyme est exprimée par la diminution des unités du maltose libéré dans le milieu réactionnel.

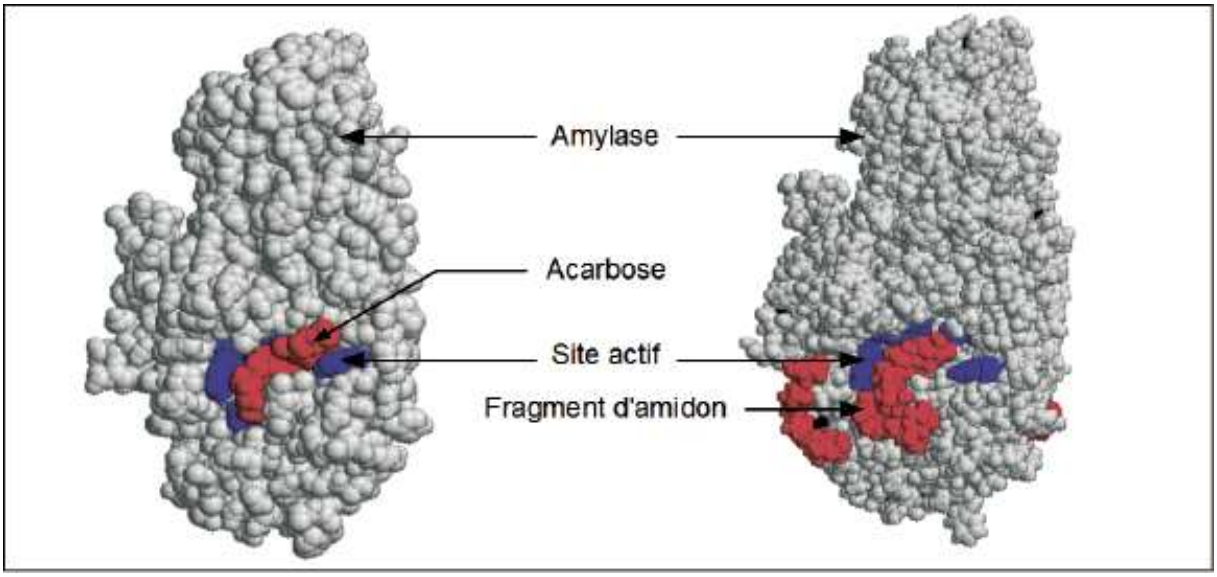


***Figure 11**. Structure et fonction inhibitrice de l' α-amylase par l'Acarbose.*

II. Matériel et méthode

La méthode utilisée est celle de Bernfeld (Bernfeld 1955), elle est basée sur la quantification du substrat (le sucre), le dinitrosalicylique DNS qui stoppe la réaction enzymatique (changement de pH) et forme un complexe avec le maltose dormant une coloration rouge dont l'absorbance est mesurée à 540 nm. Tout d'abord le DNS est préparé, 1 g dilué dans 40 ml d'eau distillée. À cette solution 30 g de tartrate double de sodium et de potassium sont ajoutés sous agitation. La solution obtenue est de couleur jaune opaque. L'addition de 20 ml d'une solution de NaOH 2N rend le réactif limpide avec une couleur orange. Le volume obtenu est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée. Le réactif obtenu est conservé à l'abri de la lumière et à 4 C˚.

L'enzyme utilisée est (α-amylase (E.C.3.2.1.1) du pancréas du porc (PPA) sous forme lyophilisée (Fluka), son poids moléculaire est de 13000 Da avec une activité spécifique de 13 UI/mg, conservée à +4C˚. Nous préparons une suspension enzymatique dans du PBS (0,02 M, pH 6,9) dont l'activité α -amylasique est de 3,9 UI/ml. L'optimum de l'activité α-amylasique d'origine porcine est à pH 6,9 pour une température de 37 C˚. L'amidon soluble a été choisi comme substrat. La solution d'amidon est préparée dans la solution tampon phosphate (0,02 M, pH 6,9) à une concentration de 1% afin de réaliser les tests sur l' α-amylase. Pour optimiser l'activité enzymatique, on ajoute Na Cl à 6 mM.

Comme témoin positif nous avons utilisé l'acarbose « LARIMEL®50 » qui est un pseudo-tétra-saccharide d'origine microbienne vendu comme traitement antidiabétique et ce grâce à son action inhibitrice envers l' α-amylase. Pour ce fait, 1 comprimé de 50 mg est solubilisé dans 50 ml de tampon phosphate.

Une gamme de concentration des extraits de pulpe et de graine (Sna, Sna1, Pna, Pna1) est préparée dans du PBS à des concentrations allant de 0,05 à 5 mg/ml afin d'évaluer leur effet sur l'activité enzymatique de l' α-amylase.

Un total de 250 µL d'extrait a été placé dans un tube et 250 µL de tampon de phosphate de sodium 0,02 M (pH 6,9) contenant une solution d' α-amylase (0,5 mg / mL) ont été

ajoutés. Cette solution a été préincubée à 37 ° C pendant 10 min, par la suite 250 µl de solution d'amidon à 1% dans du tampon phosphate de sodium 0,02 M (pH 6,9) ont été ajoutés, puis incubés à 37 ° C pendant 10 min. La réaction est terminée par addition de 500 µL de réactif acide dinitrosalicylique (DNS). Les tubes ont ensuite été incubés dans de l'eau bouillante pendant 5 min et refroidis à température ambiante. Le mélange réactionnel a été dilué avec 5 ml d'eau distillée et l'absorbance a été mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Un témoin a été préparé en utilisant la même procédure en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée. L'activité inhibitrice de l'α-amylase a été calculée en pourcentage d'inhibition :

Inhibition d' α-amylase = (($DOcontrole$ - $DOechantillon$) / $DOcontrole$ positif) × 100

III. Résultats et discussion

Traditionnellement, différentes parties des plantes étaient utilisées directement comme produits pharmaceutiques. Des produits chimiques cliniquement utiles sont désormais obtenus à partir de plantes. Plusieurs plantes présentent une activité inhibitrice d' α-amylase tels que: Juglans regia, Urtica (Rahimzadeh et al. 2014),Rubus idaeus (Grussu, Stewart, and McDougall 2011),Ocimum basilicum, Ocimum tenuiflorum (El-Beshbishy and Bahashwan 2012), Olea europaea (KOMAKI et al. 2003), Castanea sativa (Tsujita 2016).

L'inhibition de l'α-glucosidase et de l'α-amylase, enzymes impliquées dans la digestion des hydrates de carbone, peut réduire de façon significative l'augmentation postprandiale de la glycémie et peut donc être une stratégie importante dans la gestion de la glycémie chez les diabétiques de type 2. Malheureusement les traitements actuels ne se limitent qu'à un faible contrôle de l'exacerbation, et ont divers effets secondaires. Cependant, les inhibiteurs naturels de l' α -glucosidase et de l' α -amylase ont plus ou moins d'effets secondaires (Tundis, Loizzo, and Menichini 2010).

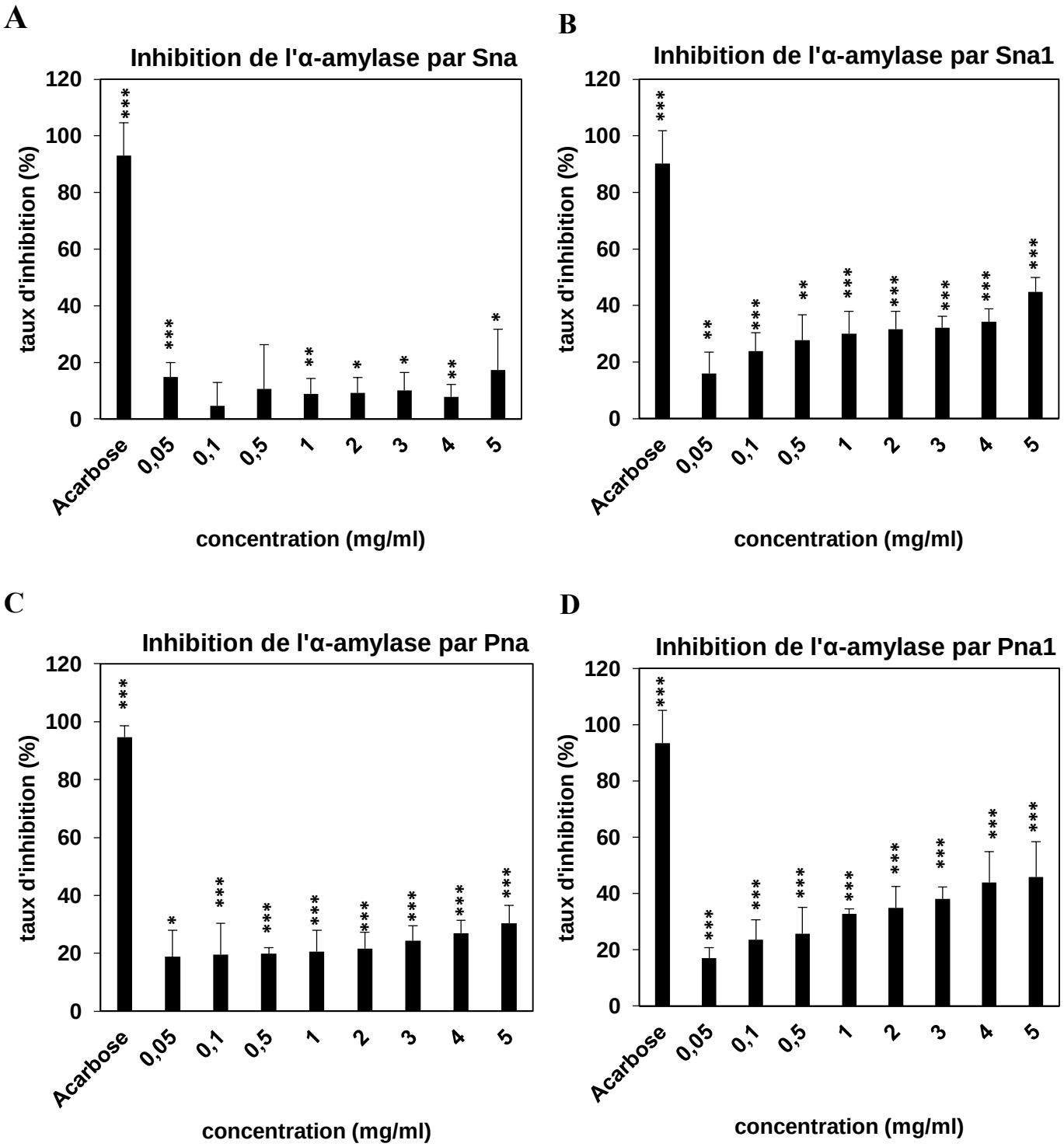


Figure 12. *Évolution du taux d'inhibition de l'* α*-amylase en fonction des concentrations croissantes de différents extraits comparé à un traitement à 1mg/ml d'Acarbose. (A) effet inhibiteur de Sna, (B) Sna1, (C) Pna et (D) Pna1. ;* p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,005*

Pour évaluer le pouvoir inhibiteur de l'α-amylase, les extraits de graine et de pulpe sont obtenus par des solvants organiques ou aqueux. Un extrait aqueux a été préparé suivi d'une série d'extraction liquide-liquide par l'acétate d'éthyle.

Les études d'inhibition de l'α-amylase ont démontré que les extraits de pulpe et de graine de *Citrullus colocynthis* avaient une activité inhibitrice. Pour chaque manipulation, des échantillons témoins négatifs ont été préparés en conséquence sans aucun extrait de plante et ont été comparés aux échantillons de test contenant diverses concentrations de l'extrait de plante. L'acarbose a été utilisé comme témoin positif. La figure 12 montre le pourcentage d'inhibition du PPA en présence d'extrait de plante et d'acarbose en fonction de la concentration d'extrait et ce durant un temps d'incubation de 10 min.

Nos résultats montrent que l'extrait aqueux brut Sna possède une plus faible action inhibitrice en comparaison avec les autres extraits étudiés avec un taux d'inhibition à 5mg/ml ne dépassant pas les 18% (17,2% ± 14,51). Malgré les similarités dans la composition de Sna et Pna, l'extrait brut de pulpe Pna à 5mg/ml présente un meilleur taux d'inhibition qui s'élève à 30,4% ±6,09 après 10 min d'incubation et déjà 19% d'inhibition à 0,05 mg/ml, néanmoins l'inhibition reste faible en comparaison avec l'action de l'acarbose qui à 0,4 mg/ml induit une inhibition de plus de 90%.

Les données de la figure 12 nous démontrent que l'effet inhibiteur des fractions acétate d'éthyle d'extraits bruts de pulpe et de graine Pna1 et Sna1 est similaire, ce qui est dû à leur composition chimique qui comme décrit dans le chapitre précédent est identique. À 0,05 mg/ml Sna1 et Pna1 induisent une inhibition de 16 et 17% respectivement ; ce taux augmente pour Pna1 de 33% à 1mg/ml et atteint les 46% à 5 mg/ml ce qui démontre un effet dose dépendant qui est commun à l'effet des 4 extraits étudiés dans cette expérimentation.

Les deux observations que nous retenons suite à notre étude de l'activité inhibitrice de l'α-amylase par des extraits bruts et des fractions de pulpe et de graine sont :

- Les fractions acétate d'éthyle présentent un pouvoir inhibiteur meilleur par rapport aux extraits bruts, de ce fait Pna1 et Sna1 sont deux extraits très prometteurs dans la recherche de nouvelles molécules d'origine naturelle à but thérapeutique.
- La comparaison des effets des extraits de pulpe et de graine démontre qu'ils sont identiques, ce qui confirme les résultats du screening de la composition chimique de ces extraits par LC-MS qui a dévoilé une similitude dans la composition des extraits Pna1 et Sna1 ainsi que les CCM ont montré le même profil phytochimique pour Pna et Sna.

Comme témoin positif nous avons choisi l'acarbose qui est un puissant inhibiteur compétitif de l'α-amylase. Ce composé a un cycle pseudosucre et la liaison azotée glycosidique qui imite l'état de transition pour le clivage enzymatique de la liaison glycosidique et inhibe donc de façon competitive l'α-amylase (Etxeberria et al. 2012). Probablement, il y avait un composé dans l'extrait Pna1 et Sna1 qui pouvait rivaliser avec le substrat pour se lier au site actif de l'enzyme. Ce mécanisme est généralement observé pour les inhibiteurs compétitifs.

Dans la littérature (Ramzi and Sahragard 2013; Zibaee, Valizadeh, and Jalali sendi 2013) nous retrouvons plusieurs études faites sur le pouvoir inhibiteur de différents extraits de *Citrullus colocynthis* (fruit, racine et feuille) faites sur des rats, des insectes ou encore *in vitro* sur des enzymes isolées. Cette variation dans l'inhibition de l'α-amylase pourrait être attribuée à différentes raisons; le mécanisme d'inhibition, principalement, la présence d'isoformes enzymatiques, la proportion de protéines inhibitrices et d'autres alcaloïdes, et la condition du pH dans les différentes conditions. Les réactions biochimiques sont affectées par des facteurs environnementaux principalement le pH et la température des milieux.

Zibaee et ses collaborateurs (Zibaee, Valizadeh, and Jalali sendi 2013) ont étudié l'effet d'un extrait protéique de *Citrullus colocynthis* et démontré divers degrés d'inhibition des α-amylases digestives de C. suppressalis. À 2 mg/ml Les α-amylases digestives des larves ont été inhibées environ à 50% par l'extrait protéique de *Citrullus colocynthis*.

Dans une autre étude de S. Kalva (Kalva and Fatima, 2018.), ils ont mis en évidence l'activité inhibitrice de l'α-amylase des racines de *Citrullus colocynthis* sur des rats Wistar mâles dont le diabète a été induit en administrant de la streptozotocine (STZ). La metformine (45 mg / kg) a été administrée comme agent hypoglycémiant oral standard. Les extraits aqueux et éthanoliques de *Citrullus colocynthis* à 100 mg / kg, 200 mg / kg et 300 mg / kg ont été administrés aux rats normaux et diabétiques. Les résultats ont révélé que *Citrullus colocynthis* possède un très fort potentiel anti-hyperglycémique justifiant l'utilisation du médicament pour le traitement du diabète sucré. Les deux extraits ont montré une inhibition significative de l'enzyme α-amylase d'une manière dépendante de la concentration. Le pourcentage d'inhibition de l'a-amylase par les extraits de *Citrullus colocynthis* a été étudié dans une gamme de concentration de 10 à 100 ug / ml. La IC50 était de 45 ug / ml.

De nombreux troubles métaboliques et maladies sont associés à l'activité enzymatique de l' α-glucosidase. Selvaraj et ses collaborateurs (Selvaraj and Kaliamurthi 2012) ont étudié l'effet inhibiteur de la coloquinte sur l' α-glucosidase. Les extraits de n-hexane de *Citrullus colocynthis*, présentent une puissante activité inhibitrice de l'α-glucosidase, 85,9 ± 0,10. D'après le test de cinétique enzymatique, l'extrait de *Citrullus colocynthis* a un ou des inhibiteurs non compétitifs de l' α -glucosidase et une réduction de la Vmax de 1,21 mM / min-1 à 0,843 mM / min-1 et du Km de 1,56 mM à 0,886 mM.

IV. Conclusion

À la lumière des résultats obtenus, les extraits de graine et de pulpe de *Citrullus colocynthis* présentent une activité inhibitrice de l' α -amylase avec une activité intéressante de la fraction acétate d'éthyle de l'extrait aqueux brut de pulpe : Pna1 et Sna1. Malgré le fait qu'ils présentent une activité relativement élevée elle reste néanmoins faible en comparaison à l'acarbose qui est l'inhibiteur de référence de l' α -amylase. Une purification et un fractionnement bio-guidée de Pna1 seraient nécessaires dans un futur proche afin d'isoler la molécule responsable de cette activité.

Par conséquent, la graine et la pulpe de coloquinte peuvent être utilisées comme source riche en molécules à haut potentiel bioactif dans le traitement du diabète de type 2. De plus, cette étude permet d'entrevoir des opportunités pour de futurs travaux dans la recherche de nouveaux médicaments efficaces contre le diabète de type 2, la

coloquinte semble présenter différents principes actifs qui sont susceptibles d’agir sur plusieurs cibles.

Chapitre 5 Évaluation de l'effet hémolytique des extraits de Citrullus colocynthis

I. Introduction

L'hémolyse (hémo : sang ; lyse : perturbation) est un phénomène physiologique irréversible qui aboutit à la rupture de la membrane des hématies provoquant la libération des éléments intra-érythrocytaires dans le plasma notamment l'hémoglobine. Si la destruction des érythrocytes est un phénomène normal qui a lieu dans la rate lorsque les globules rouges sont en fin de vie, l'hémolyse anormale du sang peut avoir différentes causes (Holmberg, Jakobson, and Malmfors 1974).

L'hémolyse est manifestée par une augmentation des taux sériques en hémoglobine associée à une augmentation du lactate déshydrogénase (LDH), de phosphate et de la créatine kinase(CK) (Ozcan, Karakas, and Yucel 2012), et aussi par une diminution du taux d'haptoglobine et d'hémoglobine glyquée. L'hémoglobine libérée lors de l'hémolyse est dégradée en bilirubine non conjuguée, ou bien sous forme d'un complexe avec l'haptoglobine qui est éliminée rapidement par le foie (Marchand, Galen, and Van Lente 1980).

Des parasites sanguins, des infections bactériennes et virales, des agents chimiques, des plantes toxiques peuvent entrainer une hémolyse. De plus, l'anémie hémolytique peut être due à des phénomènes auto-immuns.

L'hémolyse pathologique peut être due à deux principaux mécanismes :
Une anomalie des globules rouges conduisant à une hémolyse corpusculaires c'est-à-dire la destruction des hématies provenant de sa fragilité et qui correspond à :
- Une anomalie constitutionnelle de l'hémoglobine comme les anomalies de structure (hémoglobinopathies), anomalies quantitative de la synthèse des chaines de globine (thalassémies), drépanocytose (en faucille) caractérisée par la présence d' Hb.
- Une anomalie constitutionnelle de la membrane du GR. C'est le cas des micro-sphérocytose causés par une augmentation de la perméabilité au Na+ et a l'eau.
- Un déficit enzymatique du GR comme le déficit en G6P, déficit en pyruvate kinase ou un défaut de régénération de l'ATP.
Une agression extrinsèque des hématies correspondant à une hémolyse extra-corpusculaires(Aguilar Martinez n.d.) qui est caractérisé par :
- Une agression directe de l'hématie par une toxine bactérienne, animale, chimique ou par un parasite.
- Une rigidité anormale acquise de la membrane du globule rouge: anémies hémolytiques auto-immunes.
- Rupture des hématies normales sur un obstacle: prothèses valvulaires, (microangiopathie thrombotique) (Marc 2003).

La réceptivité des globules rouges au stress oxydatif fait d'eux un marqueur in vitro adéquat pour l'évaluation des défenses oxydatives de différents individus. L'exposition des cellules à un système produisant des radicaux libres de manière prolongée nous permet de mesurer le taux d'hémolyse. Ce phénomène est détecté visuellement en montrant une teinte rose à rouge dans l'échantillon après centrifugation ou en mesurant la densité optique de surnageant (hémoglobine) par spectrophotométrie (Mezzou et *al*., 2006). Pour notre étude nous avons eu recours à l'utilisation de globule rouge dans le but d'évaluer l'effet cytotoxique probable des extraits de *Citrullus colocynthis*.

II. Matériel et méthode

Du sang fraichement prélevé à l'aide d'une seringue graduée auprès des personnes saines n'ayant pas pris d'anti-inflammatoires a été mis dans des tubes héparinés puis centrifugé à 4000rpm à 4°c pendant 5 minutes pour séparer les globules rouges des autres éléments constitutifs du sang La suspension érythrocytaire a été préparée comme décrit par(Hebbani, Reddy, and Nallanchakravarthula 2014) (Li and Liu 2008)

Après l'élimination du surnageant, le culot est lavé trois fois par une solution tampon phosphate salin PBS (125 mM NaCl ,10mM de diphosphate de sodium, pH 7.4), la dernière centrifugation dure 10 min. Le culot cellulaire obtenu est dilué avec la solution PBS pour obtenir un hématocrite de 1/200.

Pour l'étalonnage et le calcul du taux d'hémolyse, un tube témoins négatif a été préparé en ajourant un volume équivalent (v/v) de PBS à la solution érythrocytaire ; ainsi qu'une solution d'hémolyse (témoins positif) composé de la suspension érythrocytaire et d'eau distilée (v/v).
Les différents extraits de *Citrullus colocynthis* (Sna, Sna1, Pna, Pna1) sont dilués dans du tampon phosphate salin pour obtenir les différentes concentrations 1000 µg/ml,100µg/ml et 20 µg/ml.

Dans chaque tube (10ml de volume final) différentes concentrations d'extraits sont ajoutés à la solution érythrocytaire. Les tubes sont délicatement mélangés ensuite incubés dans un incubateur agitateur à 37°C durant 60 min. Des lectures sont effectuées à T0, T15, T30, T45 et T60 en prélevant à chaque temps 500 µl du mix auquel est ajouté 1,5 ml de PBS, avant chaque lecture les tubes sont centrifugés à 4000 rpm 5 min à 4°c.

La lecture de l'absorbance de chaque tube est effectuée à 548nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV contre un blanc contenant du PBS.

Le taux d'hémolyse des différents extraits est calculé́ en pourcentage (%) par rapport à l'hémolyse totale selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'hémolyse } (\%) = \frac{\text{Abs de l'extrait} - \text{Abs de témoin négatif}}{\text{Abs de l'hémolyse totale}} X100$$

III. Résultats et discussion

Les globules rouges sont choisis comme modèle pour l'étude de la cytotoxicité en biologie cellulaire et moléculaire et ce, grâce à leur facilité d'isolement. Les propriétés hémolytiques sont attribuables à leur interaction avec les stérols de la membrane érythrocytaire ; l'interaction induit une augmentation de la perméabilité́ membranaire et un mouvement des ions : entrée de Na+ et H_20, sortie de K+, qui conduit à l'éclatement de la membrane, permettant ainsi la sortie de l'hémoglobine, qui peut être mesurée expérimentalement par une lecture de l'absorbance à 540 nm (Van Buren, Arwatz, and Smits 2020).

Afin d'étudier la cytotoxicité des extraits de *Citrullus colocynthis* sur les globules rouges, nous avons mis en contact une suspension érythrocytaires avec les extraits aqueux bruts de graine et de pulpe ainsi que leur fraction acétate d'éthyle (Sna, Sna1, Pna, Pna1) à différentes concentrations (1000, 100 et 20 µg/ml), les données obtenues sont comparés un contrôle positif (H+) dans lequel nous avons provoqué une

hémolyse totale induite par l'eau distillée qui provoque l'éclatement des globules rouges ; ainsi qu'un contrôle négatif (H-) dans lequel la suspension érythrocytaire est maintenu stable dans un milieu isotonique (Nacl 0,9%).

Après l'incubation in vitro des hématies avec des concentrations variables d'extraits de coloquinte durant 1h, l'absorbance a été mesurée toutes les 15 min afin d'apporter une étude cinétique de l'effet hémolytique de chaque extrait ainsi qu'une étude comparative entre l'effet de la pulpe et de la graine, cette étude nous a également permis de comparer l'activité des extraits aqueux bruts et de leur fraction acétate d'éthyle.

Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure 12, et montrent la variation du pourcentage d'hémolyse mesuré par la densité optique à 548 nm en fonction de différentes concentrations. Nous observons tout d'abord qu'il y a une différence significative ($P<0,05$) entre l'effet des extraits de graine (Sna, Sna1) et le contrôle positif (H+), jusqu'à 1 mg/ml les extraits de graine n'ont pas un d'effet cytotoxique sévère sur les globules rouges. L'étude de l'activité cytotoxique de la pulpe nous a également montré qu'il n'y n'avait pas de différence avec la graine, et ceux malgré la cytotoxicité bien connue de notre plante.

Tableau 5. *Effet hémolytiques des extraits Sna, Sna1, Pna et Pna1 à 60min*

	Sna	**Sna1**	**Pna**	**Pna1**
1000 µg/ml	17,2 ± 0,058	9,3 ± 0,005	15,2 ± 0,015	18,2 ± 0,036
100 µg/ml	13,6 ± 0462	3,5 ± 0,01	8,8 ± 0,005	2,4 ± 0,01
20 µg/ml	8,6 ± 0,01	0 ± 0,01	8,8 ± 0	2,4 ± 0,005

L'évolution de l'effet hémolytique est évaluée par rapport à un témoin négatif et un autre positif qui contiennent respectivement de (globules rouge+ H2O) (PBS + globules rouge), les résultats obtenus sont présentés dans la figures 13, les courbes représentent le pourcentage des cellules restantes en fonction de la concentration des extraits de coloquinte.

D’après les résultats obtenus, nous avons enregistré des augmentations des absorbances (taux d’hémolyse) durant les 60 min d’incubation des érythrocytes isolées en présence des différentes concentrations des extraits testés. Les résultats de l’effet hémolytique des différents extraits de coloquinte, ont montré que la coloquinte présente une toxicité relativement faible en comparaison à l’hémolyse totale (figure 13). Nous observons qu’à des concentrations de 0,02 mg/ml jusqu'à 1 mg/ml l’hémolyse augmente proportionnellement avec les concentrations des extraits. Ces résultats montrent que l’hémolyse des globules rouges augmente de manière effet dose dépendant (figure 14) mais nous observons également un effet temps dépendant représenté sur les courbes de la figure 14, le temps d’exposition des hématies aux extraits augmente le risque de cytotoxicité.

À la concentration de 1mg/ml, les extraits de pulpe et de graine présentent un taux d’hémolyse qui ne dépassent pas les 18% après 60 min d’incubation. Des résultats antérieurs effectués au sein du laboratoire Lapsaab ont démontré que des extraits bruts de graine de coloquinte induisent une hémolyse de 26,61% à une concentration de 20mg/ml.(Bourek 2013)

En augmentant la concentration à 1mg/ml, on remarque que le pourcentage de cellules

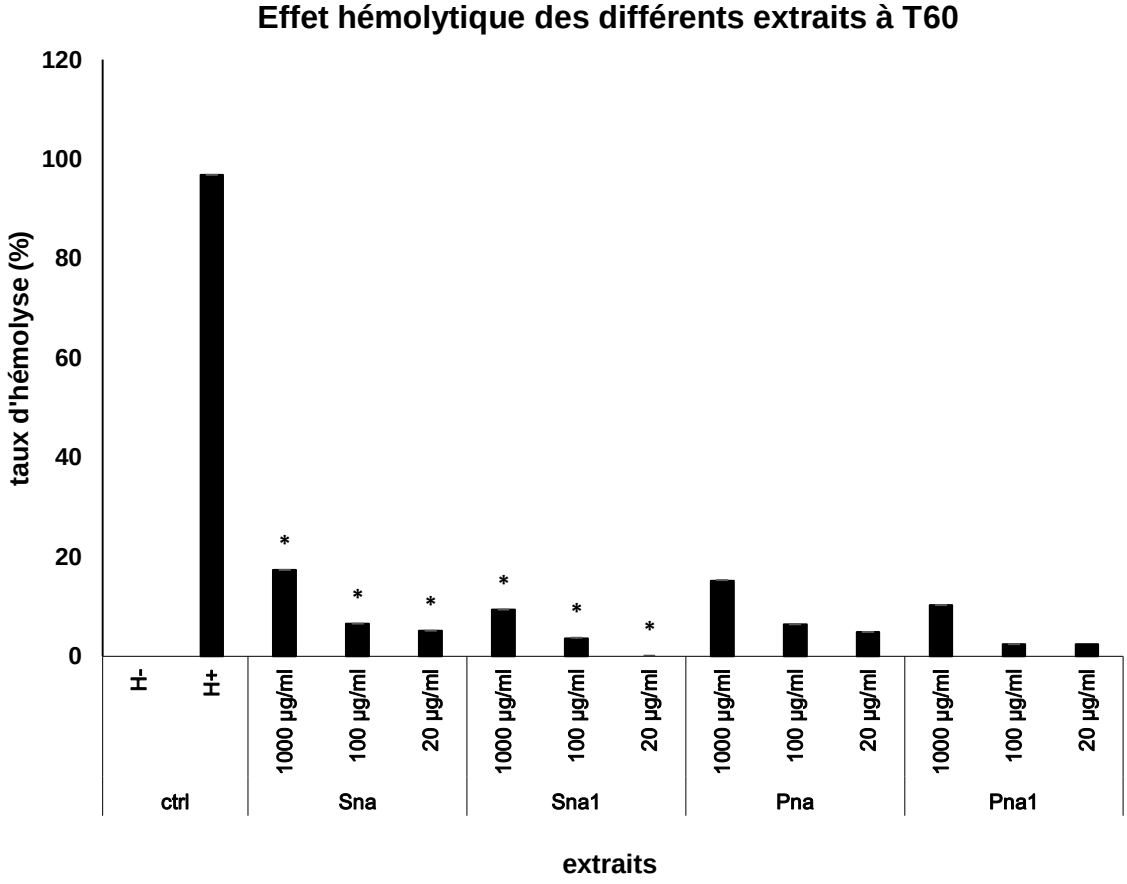


Figure 13. *Étude de l'effet hémolytique de Sna, Sna1, Pna et Pna1;* p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,005*

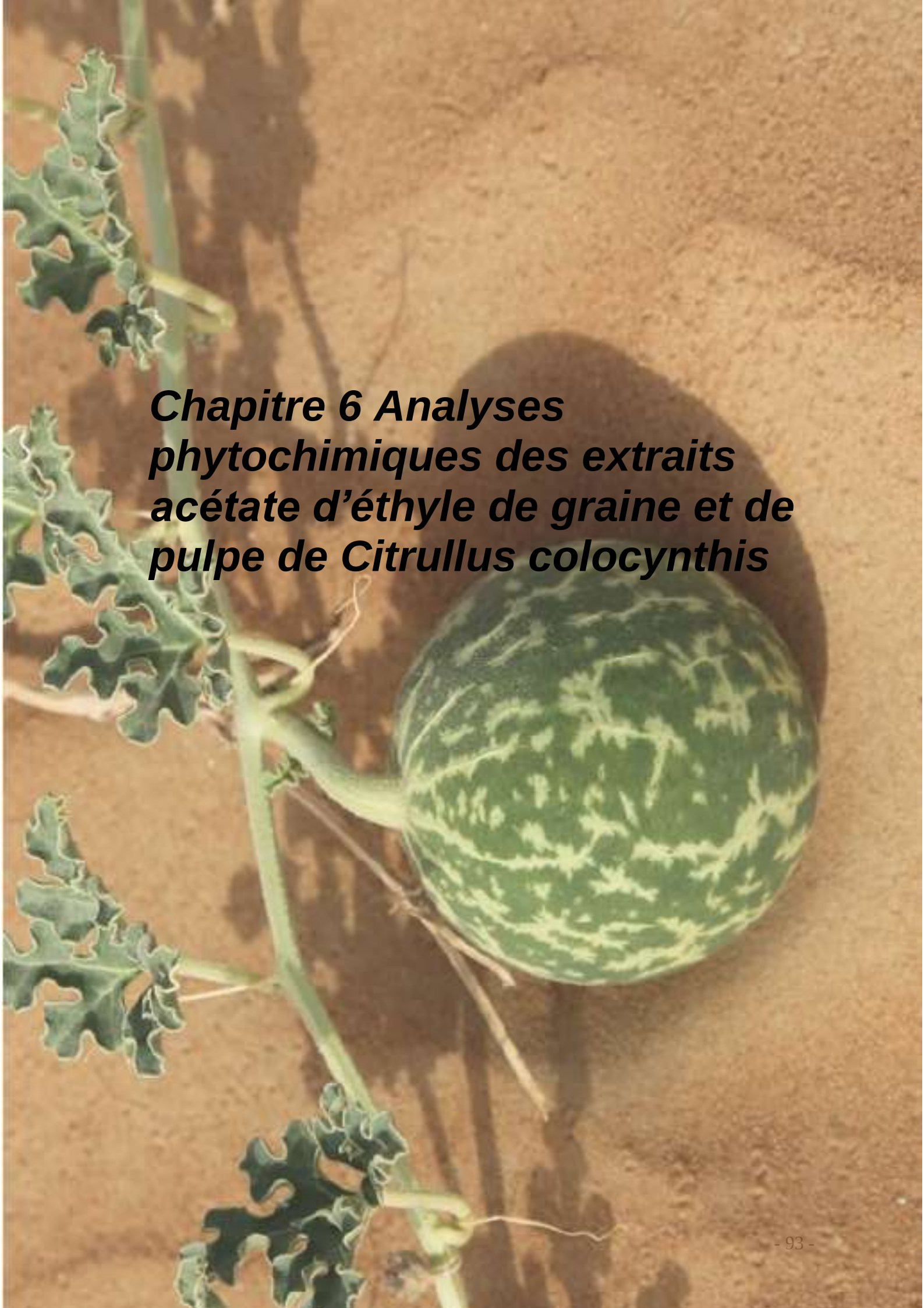
hémolysées en présence de l’extrait aqueux de graine et de pulpe atteint les 17,2% et 15,2% respectivement ; tandis que les fractions acétate d’éthyle atteignent un taux de

9,3% pour la graine et 18,2% pour la pulpe. À 100 et 20 µg/ml les fractions Sna1 et Pna1 présentent un effet toxique inférieur à celui des extraits bruts avec un taux d'hémolyse à 20 µg/ml qui s'élève à 0 ± 0,01% et 2,4 ± 0,005% respectivement, à cette concentration nous pouvons conclure que l'action hémolytique de nos extraits est négligeable. *Citrullus colocynthis* est une espèce connue pour ses propriétés toxiques qui sont dues à sa composition chimique riche en cucurbitacines, des stéroïdes dérivés d'un hydrocarburetriterpène qui à forte dose présente une toxicité sévère. De ce fait la détermination du pouvoir hémolytique de notre plante est indispensable pour une meilleure connaissance et une adaptation rationnelle de la phytothérapie traditionnelle surtout pour les doses, les modes d'administration et les précautions à prendre lors de son utilisation afin d'éviter toute réaction cytotoxique lors des différents tests biologiques que nous effectuerons le long de nos travaux de recherche. Les résultats montrent un pouvoir hémolytique quasiment absent à des concentrations égales ou inférieures à 100 µg/ml.

IV. Conclusion

L'activité hémolytique des extraits de coloquinte a été testée sur les érythrocytes humains normaux. Tous les échantillons ont présenté un faible effet hémolytique envers les érythrocytes humains, et ceux malgré la cytotoxicité bien connue de notre plante. Cependant, ces extraits ont montré une augmentation dose-dépendante de l'activité hémolytique.

Pour les perspectives, notons que le simple résultat de l'effet hémolytique ne permet pas de valider une administration de la plante par voie orale ou injectable, mais nécessite certaines études complémentaires in vitro et surtout in vivo sur des modèles animaux et ce, dans de conditions d'administration prolongée des extraits en escalade de dose.



Chapitre 6 Analyses phytochimiques des extraits acétate d'éthyle de graine et de pulpe de Citrullus colocynthis

I. Matériel et méthodes

1. Méthodes de séparation et d'identification des métabolites

1.1. Méthodes chromatographiques d'analyse et de séparation

1.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les chromatographies sur couche mince ont été réalisées, afin de vérifier la composition et la pureté des extraits et de vérifier les différentes étapes de fractionnement. Les supports chromatographiques utilisés ont consisté en des plaques de CCM présentant une phase stationnaire normale, de type Silicagel 60 F254 (Merck). Il s'agit de plaques d'aluminium de dimensions 20 x 20 cm, recouvertes d'une fine couche de 0,20 mm d'épaisseur de gel de silice, greffée par un fluorochrome absorbant à une longueur d'onde de 254 nm. Les échantillons ont été spottés et concentrés sur les plaques de CCM manuellement grâce à des capillaires de verre de 10 µL de volume. Dans certains cas où une excellente résolution est nécessaire (notamment pour certaines chromatographies récapitulatives), un système de déposeur automatique d'échantillons CCMHP (Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance) de modèle ATS 4 (CAMAG), piloté par le logiciel WinCATS 1.3.3 (CAMAG), a été utilisé. Le développement des plaques chromatographiques a été réalisé dans des cuves de migration en verre saturées par différentes phases mobiles (principalement CH_2Cl_2/MeOH en différentes proportions).

Dans notre cas, les deux systèmes de solvants pour les différentes classes de composés ont été les suivants :

- CH2Cl2/MeOH (88/12, v/v)
- CH2Cl2/MeOH (90/10, v/v)

Les plaques ont été observées dans le visible, dans l'UV à deux longueurs d'onde (254 et 365 nm) et après pulvérisation d'un révélateur chimique : la vanilline.

Réactif à la Vanilline sulfurique:

Pour 100 mL de solution, 1 g de vanilline est introduit dans 90 mL d'éthanol à 96%. 10 mL d'acide sulfurique concentré sont ensuite ajoutés avec précaution à la solution, car il se produit une réaction exothermique. Le révélateur à la vanilline sulfurique est conservé à l'abri de la lumière, ce dernier permet de révéler les composés organiques avec des couleurs variables en fonction du type de noyau structural.

1.1.2. Chromatographie SPE sur cartouches de silice C18

La chromatographie en phase inverse a été réalisée sur gel de silice greffée de chaînes carbonées à 18 atomes de carbone, contenu dans des cartouches d'extraction en phase solide pré-conditionnées de type VarianC18 Bond Elut SPE. Ces cartouches ont été éluées grâce à un système de mise sous vide constitué d'un collecteur de fractions Varian Vac Elut SPS 24 Manifold et d'une pompe Diaphragm Pump Chem. Resistant MPC 101 Z ILMVAC. La cartouche a été éluée par un système de phase mobile (Eau/Méthanol), en mode gradient, afin d'optimiser la séparation des échantillons.

1.1.3. Chromatographie sur Colonne ouverte (CC)

La chromatographie sur colonne (CC) a été réalisée en utilisant des colonnes ouvertes rodées à l'extrémité supérieure, remplies par la phase stationnaire constituée de gel de silice (15-40 µm, Kieselgel 60, MerckKGaA, Düren, Allemangne), activé quelques

heures à 110°C dans l'étuve avant l'utilisation. La taille et le diamètre de la colonne ont été choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier et de la résolution souhaitée. La quantité de phase stationnaire a été calculée de façon à être 50 fois supérieure à celle de l'échantillon à fractionner. L'échantillon a été déposé sous forme de dépôt liquide (solubilisé) ou solide (sous forme de poudre). Une couche de coton de verre a ensuite été ajouté après la première absorption du dépôt, afin d'éviter toute perturbation de surface lors de l'ajout de la phase mobile. L'élution a ensuite été réalisée par différents système de phase mobile (Dichlorométhane /Méthanol), en mode gradient afin d'optimiser la séparation de l'échantillon.

1.1.4. Chromatographie Liquide sous Moyenne Pression (MPLC)

La chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC) a été effectuée en utilisant des colonnes en verre borosilicaté de marque BÜCHI conditionnées en phase normale par un gel de silice (Kieselgel 60) de granulométrie 15-40 µm (MerckKGaA, Düren, Allemangne), activé à 110°c dans l'étuve avant l'utilisation. Cette colonne est liée à une pompe BÜCHI Module C-615 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Suisse) qui génère la pression à l'entrée de la colonne et assure un débit de 20 mL/min et une pression moyenne de 2 Bar. De même les échantillons ont été introduits dans la colonne sous forme de dépôt liquide puis élués par un gradient de phase mobile (Dichlorométhane /Méthanol), en mode gradient afin d'optimiser la séparation de l'échantillon.

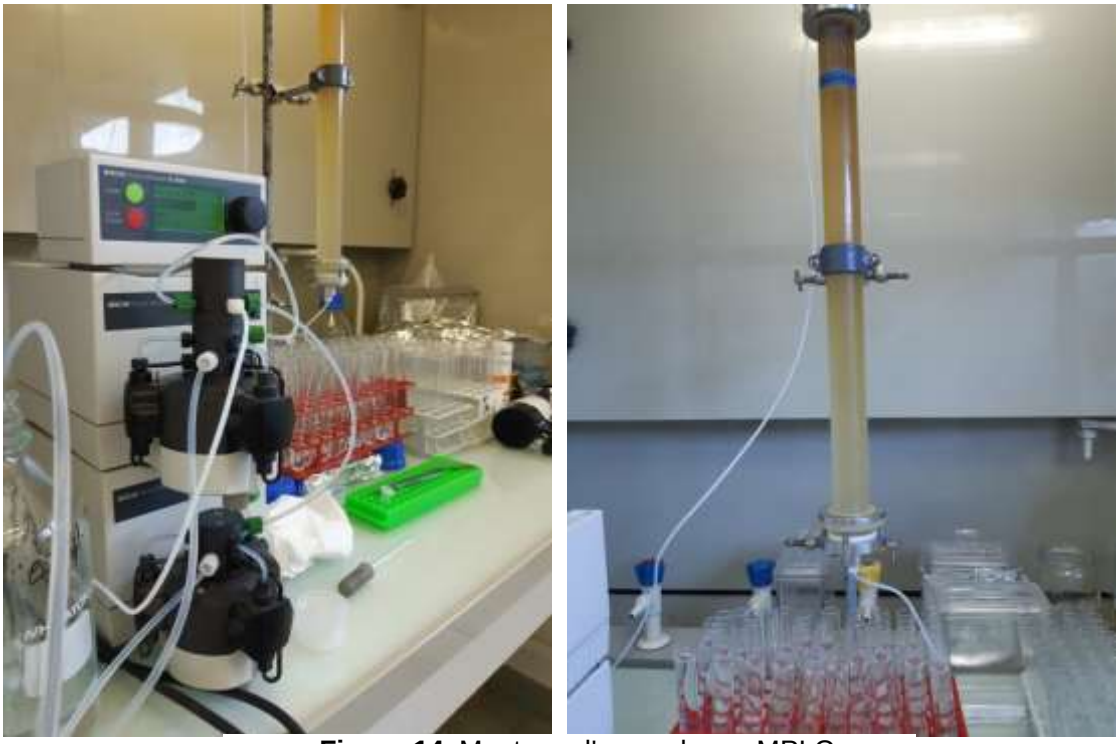


Figure 14. Montage d'une colonne MPLC

1.1.5. HPLC semi-préparative

La HPLC semi-préparatives est une méthode de séparation qui a été utilisée lors des dernières étapes de purification. Les analyses par HPLC semi-préparative ont été réalisées grâce à un système HPLC HITACHI Merck composé d'une pompe quaternaire Lachrom L-7100, d'un détecteur à barrette de diode LaChrom L- 7455, d'une interface D-7000, le tout piloté par le logiciel D-7000 HSM. La boucle d'injection utilisée en mode préparatif permet une charge de 500 µL. Les échantillons ont été

dissous à froid dans du MeOH à la concentration de 10 mg/mL, filtrés sur filtre nylon 0,45 µm puis injectés et séparés sur une colonne Phenomenex EVO C18, 250 x 10 mm, 5 µm, 100 Å éluées par la phase mobile à un débit de 3 mL/min. La phase mobile a consisté en un mélange d'acétonitrile qualité HPLC (Fisher Chemical) et d'eau purifiée et désionisée (système Millipore Simplicity 185) et acidifiée avec 0.1% d'acide formique, en proportions variables. La séparation des composés a été réalisée en mode gradient, permettant d'augmenter le pouvoir d'élution de la phase mobile au cours de l'analyse.

Tableau 6. *Gradient de la méthode de séparation en HPLC semi préparative*

Temps (min)	Eau+ HCCOH0.1%	ACN %	Débit (ml)
0	80	20	3
28	10	90	3
30	80	20	3

1.2. Méthodes analytiques ou physico-chimiques

1.2.1. Système UHPLC-DAD HITACHI

L'UHPLC analytique est utilisée en premier lieu pour identifier les pics d'intérêts qui se trouvent dans l'extrait et dans les fractions ainsi que pour vérifier la pureté des composés isolés en se basant sur leur absorbance UV. Elle est réalisée sur un système UHPLC HITACHI VWR équipé de deux pompes LaChrom ULTRA L-2160 U, d'un détecteur à barrette de diode (DAD) LaChrom ULTRA L-2455 U, d'une seringue d'injection de 100 µL, d'un passeur d'échantillons L-2200 U, et d'un four thermostaté LaChrom ULTRA L-2300 U. La phase stationnaire a consisté en une une colonne Phenomenex Kinatex 2.6 EVO C18 (100 x 2.1 mm, 2.6 µm, 100 Å). La phase mobile a consisté en un gradient d'eau et d'acétonitrile acidifiés avec 0.1% d'acide formique à un débit de 0.4 mL/min. L'eau utilisée est purifiée et désionisée par un système Millipore Simplicity® 185. Les données ont été acquises et traitées à l'aide du logiciel EZchrom Elite.

1.2.2. Couplage UHPLC-DAD-CAD-LTQ Orbitrap XL

Les extraits bruts et les différentes fractions ont été analysés par une méthode de couplage alliant la HPLC à 3 détecteurs. Les analyses ont été réalisées sur une chaîne équipée d'une pompe quaternaire (Ultimate 3000), d'un dégazeur, d'un four thermostaté à l'intérieur duquel se trouve une colonne Acquity UPLC® BEH C18 (100 x 2,1 mm i.d, 1,7 µm, Waters, USA), et d'un passeur d'échantillon thermostaté (Ultimate 3000), couplée à 3 détecteurs : un détecteur DAD (Diode Array Detector, Ultimate 3000 de 210 à 400 nm, un CAD (ChargedAerosol Detector, Corona Veo) qui permet de quantifier les composés présents dans un extrait. Le couplage au CAD a été réalisé à l'aide d'un split 1:1 en sortie du détecteur DAD pour moitié au spectromètre de masse et moitié en CAD et un spectromètre de masse haute résolution de type LTQ Orbitrap XL (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, Royaume-Uni). Le système est piloté par le logiciel LCQ Xcalibur (Thermo Fisher

Scientific). Les phases mobiles employées ont été les suivantes : solvant A (H_2O, 0.1% de HCOOH) et B (Acétonitrile, 0.1% de HCOOH) avec une élution en gradient présenté dans le tableau 7.

Les données du tableau 7représentent la méthode optimisée pour analyser toutes les fractions obtenues. Les analyses ont été réalisées en mode d'ionisation positive (IP) et négative (IN). Le mode HCD (High EnergyCollisional Dissociation) utilisée énergies de collision de 40 eV a permis d'avoir la masse Haute Résolution des fragments obtenus. Le mode CID (Collision Induced Dissociation) « *data dependant scan* » utilisé a permis la fragmentation des ions majoritaires de chaque scan avec des énergies de collision de 35 eV.

Tableau 7. *Gradient de la méthode d'analyse UHPLC-HRMS et UHPLC*

Temps (min)	**Eau+ HCCOH0.1%**	**ACN+HCOOH 0.1%**	**Débit (ml)**
0	90	10	0,4
28	10	90	0,4
30	90	10	0,4

1.2.3. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés à l'Université Paul Sabatier de Toulouse sur des appareils de type Brüker Avance 300 (fréquences de 300 (1H) et 75 MHz (13C)). Les échantillons ont été solubilisés dans des solvants deutérés CDCl3 et CD3OD dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) ; les constantes de couplage sont exprimées en Hz. Le logiciel utilisé pour traiter les spectres de RMN est MestreNovaTM 9.0 (Mestrelab Research).

II. Résultats et discussion

1. Analyse de la composition phytochimique de Pna1

1.1. CCM fractions acétate d'éthyle

Au terme du criblage biologique, les deux extraits les plus actifs sont retenus pour une étude photochimique approfondie afin de mettre en évidence les molécules potentiellement responsables de ces activités hypoglycémiantes. Un fractionnement bio-guidé a été réalisé à partir des fractions acétate d'éthyle de graine et pulpe (Sna1 et Pna1), ces dernières présentant les activités biologiques les plus élevées. L'analyse chromatographique sur couche mince de la phase est effectuée sur des plaques de silica gel sur feuille d'aluminium (Merck).

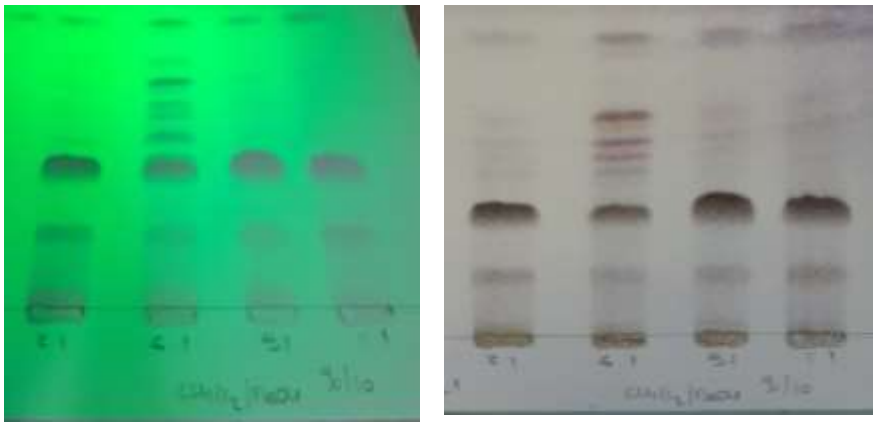


Figure 15. CCM (CH2Cl2/MeOH (90/10, v/v))fractions Sna1 Sda1 Pna1 et Pda1 (de gauche à droite). Révélation sous UV plaque de gauche, et révélation par vanilline sulfurique plaque de droite

Après développement dans des cuves en verre avec deux systèmes d'éluant : CH_2Cl_2/MeOH (90/10, v/v) ainsi que $CHCl_3$/MeOH/H_2O (65/24/04). Les plaques ont été observées à la lumière du jour, et sous lampe UV à 254 et 365 nm, indiquant la présence de 2 spots correspondant à 2 molécules majoritaires ainsi qu'une partie polaire et apolaire.

Les CCM (figure 16) de Sna1 Sda1 Pna1 et Pda1 nous permettent d'avoir à la fois une première visualisation du profil chimique des extraits et nous permet 'de réaliser une étude comparative entre les extraits de pulpe et de graine.

À la révélation des plaques CCM nous observons une similarité dans la composition chimique des extraits acétate d'éthyle de pulpe et de graine de coloquinte, de plus il semblerait qu'il y aurait une molécule majoritaire qui selon sa position et son temps de rétention pourrait être la même dans les 4 extraits.

La forte ressemblance des profils chimiques de Pna1 et Sna1 pourrait expliquer le fait qu'ils possèdent des actions biologiques similaires sur des cibles identiques.

1.2. Étude et comparaison par LC-MS de Pna1 et Sna1

La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse est une méthode d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances. Le tandem LC/MS se différencie de la MS par une fragmentation des ions pour permettre une meilleure identification. Les ions séparés

lors d'un simple MS sont sélectionnés dans un collecteur et sont fragmentés. Les fragments sont analysés dans un deuxième analyseur (fragments MS). L'identification obtenue est plus fine et plus exacte. La spectrométrie de masse permet une analyse qualitative et quantitative.

Afin d'identifier et de comparer les composés présents dans Pna1 et Sna1, nous avons utilisé la technique LC-DAD-ESI (+)-MS n en se basant sur les critères d'identification à savoir leurs spectres UV, leurs spectres MS et MS 2 . Les conditions chromatographiques et spectrométriques utilisées dans cette étude sont détaillées dans la partie matériel et méthode (chap VI).

La figure 17 montre les chromatogrammes de l'extrait Pna1 et Sna1 obtenus après détection par spectroscopie de masse (TIC : Total Ion Current) et par UV à 235 nm (fixé suite à un balayage entre 200 et 400 nm).

La trace UV ci-dessous (figure 17) de l'extrait Pna1 et Sna1 montre un pic majoritaire (Tr 11,29 min et 11,32 min respectivement) commun aux deux extraits. On remarque également que ce pic est d'intensité égale dans Pna1 et dans Sna1. On observe quelques pics en plus dans les extraits mais toujours avec une répartition et une intensité équivalente. Le détecteur CAD est universel (un peu comme un détecteur à diffusion de lumière) et détecte tout ce qui est organique. Il nous permet d'obtenir des proportions relatives de pics de l'échantillon.

Un léger décalage des temps de rétention est observé (d'environ 0,10 min,) du fait que détecteurs CAD et MD sont placés après le détecteur UV dans la chaine analytique. Ces traces confirment que le composé de Tr 11,29 min, est le composé majoritaire pour les deux fractions.

Les traces ci-dessous représentent les courant ioniques de chacun des échantillons. Nous pouvons en déduire la présence de composés très minoritaires (car absents des traces PDA) dans certaines zones, comme entre les RF 12 et 16 min s'ionisant particulièrement bien en ESI positif.

Nous retenons néanmoins de l'observation des chromatogrammes de pulpe (en vert) et de graine (en rouge) la forte ressemblance des profils chimiques en ESI positif ainsi qu'en UV, ce qui corrèle avec nos résultats de CCM obtenus précédemment.

Néanmoins, une déréplication des pics est nécessaire à notre étude ; d'une part pour identifier les molécules potentiellement correspondantes aux pics et d'autre part pour confirmer notre observation qui démontre une similitude dans la composition chimique de Pna1 et Sna1. Cette expérience a été répétée plus de 3 fois (n>3).

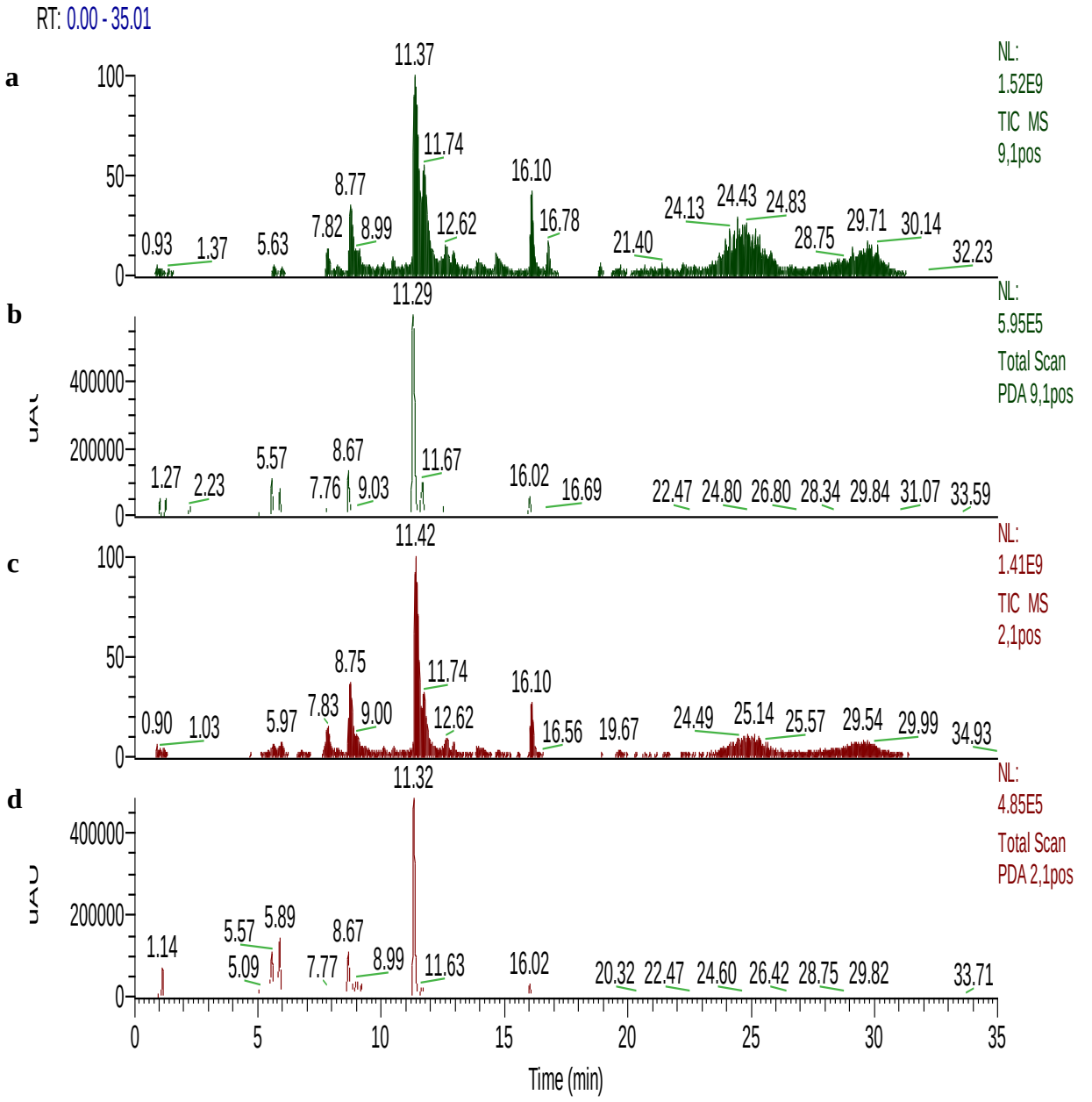


Figure 16. (a) Chromatogramme (TIC) de l'extrait Pna1 avec détection ESI positif (b) Chromatogramme de l'extrait Pna1 avec détection UV. (c) Chromatogramme (TIC) de l'extrait Sna1 avec détection ESI positif (d) Chromatogramme de l'extrait Sna1 avec détection UV.

L'analyse détaillée de ces pics en HPLC-ESI-MS/MS avec une ionisation en mode positif (mode le plus sensible et le plus informatif) et négatif, nous a permis de caractériser une vingtaine de composés dont 18 cucurbitacines (Tableau 8) et ce en comparant nos données (analysées avec le logiciel X-calibur) avec les données trouvées dans la littérature (Chawech, Jarraya, et al. 2015; Sahidul Ali et al. 2019; Kaushik, Aeri, and Mir 2015) Le tableau 8 recense les molécules identifiées à partir des deux extraits Pna1 et Sna1, ainsi qu'une analyse quantitative de la répartition des molécules dans les échantillons d'extraits.

Pour rechercher des molécules de Pna1 qui pourraient éventuellement être responsable de son effet d'activateur sur la translocation GLUT4, nous avons cherché à identifier les métabolites secondaires présents dans cet extrait au moyen de LC – PDA-CAD-MS. Cela a révélé que plus d'une dizaine de composés étaient présents dans Pna1 dans une large mesure. Presque tous les composés étaient détectables par ESI MS et UV à ions positifs et négatifs.

La trace CAD est la moins sensible des détecteurs utilisés mais est indépendante de la structure du composé (détecteur universel) et donc proportionnelle à la quantité du composé détecté. Par conséquent, les données CAD ont été utilisées pour quantifier les concentrations relatives des composés. La réponse CAD montre que tous les composés de Pna1 étaient détectables par MS et UV.

La comparaison des spectres obtenus avec ceux de la littérature (Chawech, Jarraya, et al. 2015; Jayaprakasam, Seeram, and Nair 2003) nous a permis d'identifier la plupart des composés. Deux flavonoïdes ont été détectés, l'isovitexine (composé 2) et un deuxième flavonoïde dont nous n'avons pas pu déterminer fermement son identité, mais qui, selon nous, est une forme méthylée de la vitexine ou de l'isovitexine (composé 3), avec des poids moléculaires de 432 et 462 g / mol, respectivement (tableau 8).

19 cucurbitacines connues ont été identifiées (composés 4-22), avec des valeurs de Tr atteignant 7,82 à 16,8 min: entre autres les formes 2-O-β-D-glucopyranosyl des cucurbitacines J, I, E et B et les cucurbitacines I, B, et E. La glucopyranosyl-cucurbitacine E (composé 13), également connue sous le nom de colocynthine et d'élatérinide, représentait plus de 50% de l'extrait. Un pic final a été récupéré à Tr 16,8 min (composé 22). Le métabolite correspondant avait la configuration moléculaire d'une cucurbitacine mais n'avait pas encore été décrit dans la littérature. Nous supposons que l'un de ces 20 composés, ou peut-être une combinaison de plusieurs, est responsable de l'activité stimulant l'insuline que nous avons découverte dans Pna1 ou encore responsable de l'effet inhibiteur de l' α amylase.

Notre comparaison des pics LC – PDA-CAD-MS de Pna1 et Sna1 a démontré que l'extrait Sna1 ressemblait largement à celle de Pna1 en ce que tous les composés de Pna1 (à l'exception du composé 10) étaient également présents dans Sna1.

Tableau 8. *Analyse LC- MS et comparaison de la composition phytochimique de Pna1 et Sna1*

						Pna1		Sna1	
pic	**Composé**	**Formule**	**MM**	**ion négative m/z**	**UV λ max (nm)**	**Tr (min)**	**%**	**Tr (min)**	**%**
1	4 Hydroxybenzaldehyde	$C_7H_6O_2$	122	121	218, 274, 286	4,54	0,9	4,5	1,1
2	Isovitexine	$C_{21}H_{20}O_{10}$	432	431	218, 270, 332,	5,56	3,52	5,64	3,22
3	Méthoxy (iso) vitexine	$C_{22}H_{22}O_{11}$	462	461	218, 270, 348,	5,88	2,82	5,97	3,99
4	2-O-β-D- glucopyranosyl-cucurbitacine J	$C_{36}H_{54}O_{13}$	694	739	220, 305, 369	7,82	4,18	7,83	4,28
5	colosynthoside B	$C_{42}H_{62}O_{15}$	806	851	224	8'19	1,08	8,19	0,18
6	2-O-β-D- glucopyranosyl-cucurbitacine I	$C_{36}H_{52}O_{12}$	676	721	236	8,77	6,47	8,75	10
7	2-O-β-D- glucopyranosyl-cucurbitacine L	$C_{36}H_{54}O_{12}$	678	723	221	9,35	0,8	9,46	0,8
8	Colocynthine C	$C_{37}H_{54}O_{11}$	674	719	221	9,64	0,5	9,62	0,8
9	Colocynthine B	$C_{36}H_{50}O_{11}$	658	703	222	9,66	0,39	9,66	0,5
10	Colosynthoside A	C37H54O12	690	735	222	9,68	0,5	9,68	0,4
11	Dihydrocucurbitacine E	C32H46O8	558	603	224	10,4	0,32	10,3	0,93
12	Khekadaengoside K	C30H42O10	562	607	223	11,1	0,5	9,13	0,61
13	2-O-β-D- glucopyranosyl-cucurbitacine E	$C_{38}H_{54}O_{13}$	718	763	234	11,4	50	11,4	50,8
14	2-O-β-D-glucopyranose-cucurbitacine B (arveninl)	$C_{38}H_{56}O_{13}$	720	765	254	11,7	6,9	11,7	6,4
15	Cucurbitacine S	$C_{30}H_{42}O_6$	498	543	223, 292,	12,4	1,4		0
16	Cucurbitaine I	$C_{30}H_{42}O_7$	514	559	230	12,6	4,12	12,6	2,51
17	Cucurbitacine A	$C_{32}H_{46}O_9$	574	619	224	12,8	1,45		0
18	Bacobitacine	$C_{32}H_{44}O_9$	572	617	223, 301	13,9	0,7	13,9	0,9
19	Cucurbitacine B	$C_{32}H_{46}O_8$	558	603	223, 285,	14,8	4,15	14,8	0,71
20	Cucurbitacine Q	C32H48O8	560	605	223, 270, 280	15,1	0,32	15,1	0,54
21	Cucurbitacine E	$C_{32}H_{44}O_8$	556	601	230, 270,	16,1	5,01	16,1	7,39
22	nd	nd	586	631	225, 306,	16,8	3,27	16,5	0,3

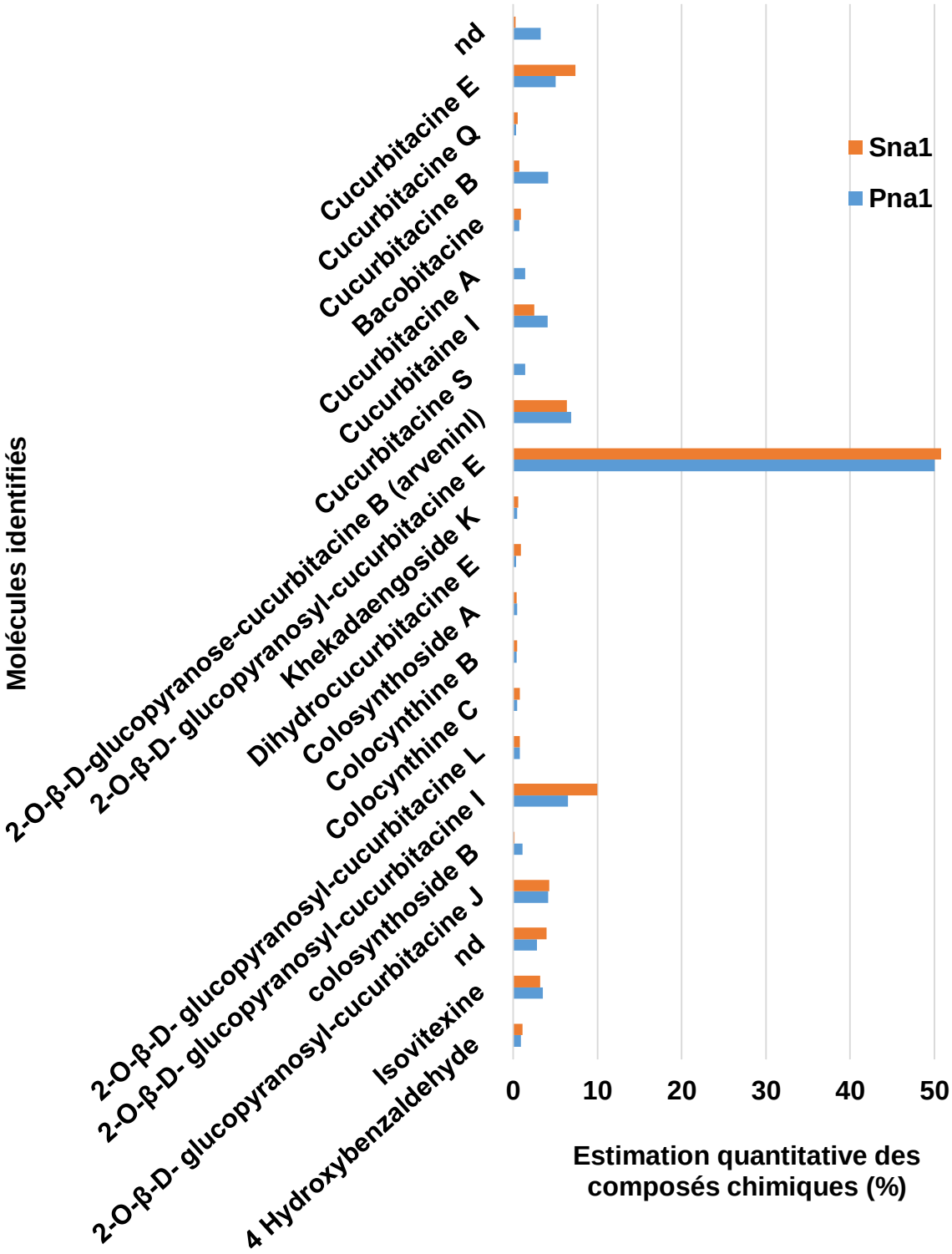


Figure 17. Comparaison entre la composition phytochimique de Pna1 et Sna1

La déréplication et les analyses quantitatives obtenus par LC-MS réalisées aucours de nos travaux de thèse ont contribué à la compréhension du large spectre de la

recherche phytochimique autour de *Citrullus colocynthis*, l'histogramme (figure 18) met en évidence la répartition semblable des molécules dans les extraits acétate d'éthyle de pulpe et de graine, à l'exception de la cucurbitacine A et S que nous retrouvons seulement dans l'extrait de pulpe Pna1.

2. Déréplication des molécules majoritaires

2.1. Fragmentation de la glucocucurbitacine I

Le profil du spectre UV du composé à Tr 8,77 min montre un maxima d'absorption à 236nm, ce qui nous permet d'envisager une structure de type triterpène appartenant à la famille des cucurbitacines (Ministerrådet 2006). Les spectres de masse MS et MS 2 sont présentés dans la figure 19 suivante.

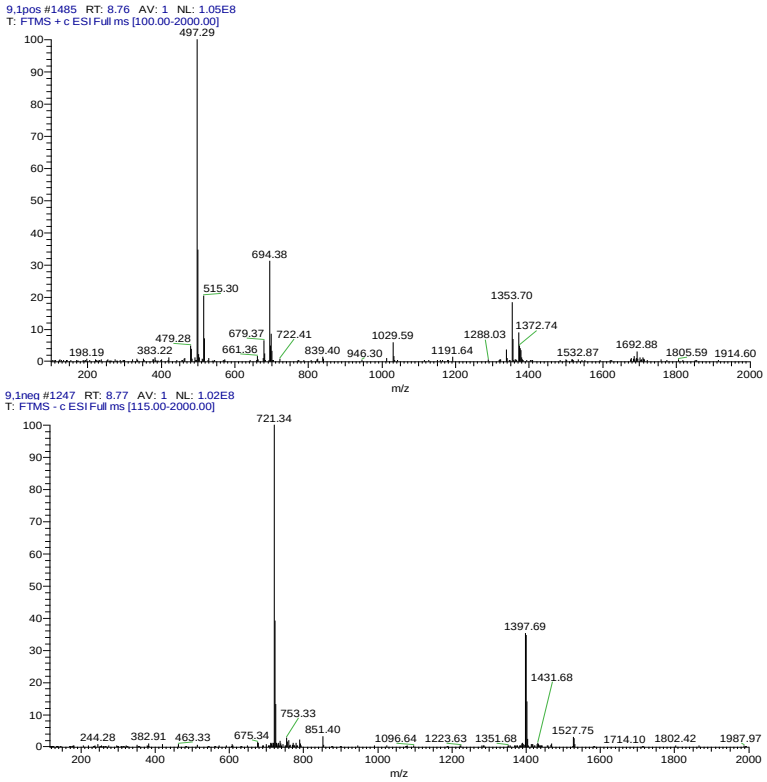


Figure 18. De haut en bas : Spectres MS2 (+) MS2 (-) de la glucocucurbitacine I

Pour ce composé, on peut relever une masse de 676 g/mol à partir de m/z 721 [M+HCOOH-H]− . Le spectre MS montre deux ions fils à m/z 497 uma et 515 uma correspondant respectivement à des pertes de 160 uma et 162 uma. Ces ions fragment correspondent à la perte d'un hexose. Par comparaison à la littérature (Hatam, Whiting, and Yousif 1989; Kanchanapoom, Kasai, and Yamasaki 2002), ce composé a été identifié à la gluco-cucurbitacine I.

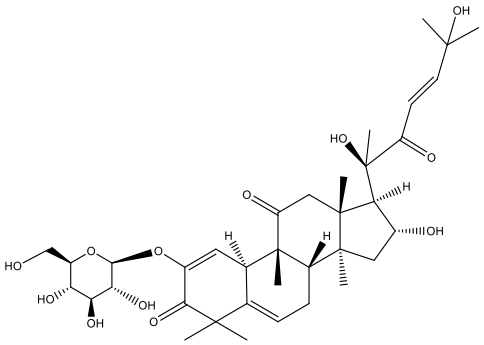


Figure 19. Schéma de la structure de la gluco-cucurbitacine I

2.2. Fragmentation de la glucocucurbitacine E

Ce composé à Tr 11,4 min montre un maxima d'absorption à 234 nm à partir de son profil du spectre UV. Son spectre MS 2 sont présentés dans la figure 21 suivante.

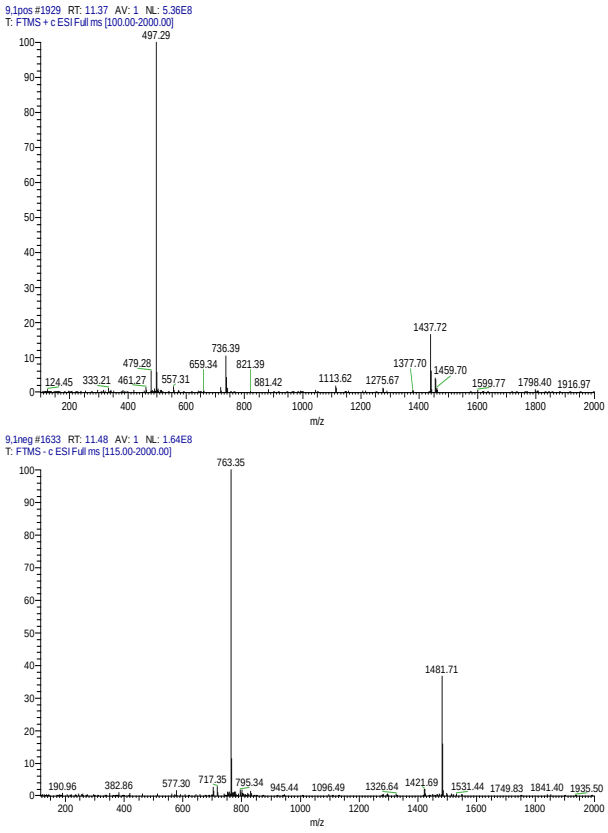


Figure 20. De haut en bas : Spectres MS2 (+) MS2 (-) de la glucocucurbitacine E

Le spectre de masse donne un ion quasi-moléculaire m/z 763 [M+HCOOH-H]−en accord avec une masse de 718 g/mol.

Le spectre MS 2 présente un ion majoritaire à m/z 497 qui pourrait correspondre au noyau cucurbitane tetracyclique qui aurait perdu 222 uma qui correspondent à un d'acide acétique (CH 3 COOH) 60 uma ainsi qu'à un hexose à 162 uma. Par comparaison à la littérature (Seger et al. 2005; Delazar et al. 2006), ce composé a été identifié à la glucocucurbitacine E.

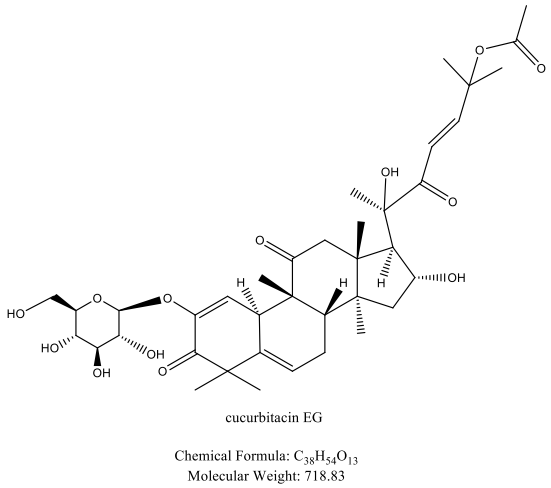


Figure 21. Schéma de la structure de la gluco-cucurbitacine E

2.3. Fragmentation de la cucurbitacine I

Le profil du spectre UV du composé à Tr 12,6 min montre un maxima d'absorption à 230 nm, ce qui nous permet d'envisager une structure de type triterpène appartenant à la famille des cucurbitacines (Ul Haq et al. 2019) . Les spectres de masse MS 2 sont présentés dans la figure 23.

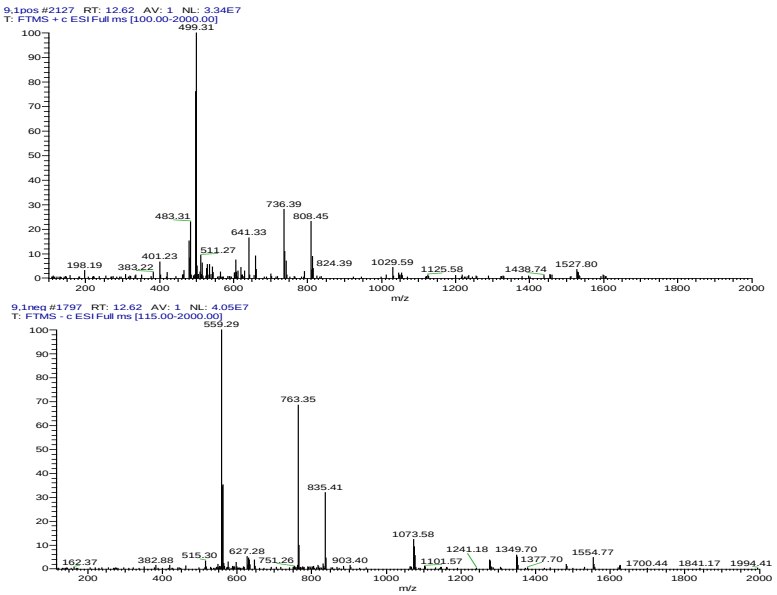


Figure 22. De haut en bas : Spectres MS2 (+) MS2 (-) de la cucurbitacine I

La masse moléculaire de ce composé est de 514 g/mol déduite à partir de l'ion quasimoléculaire m/z 559 [M+HCOOH-H]−. Le spectre MS 2 présente un ion majoritaire à m/z 499, qui pourrait correspondre au noyau cucurbitane tetracyclique qui aurait perdu 16 uma qui correspondent à la perte d'un oxygène. Par comparaison à la littérature (Hatam, Whiting, and Yousif 1989; Kanchanapoom, Kasai, and Yamasaki 2002)ce composé a été identifié à la cucurbitacine I.

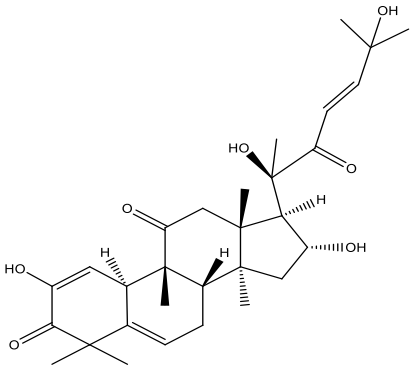


Figure 23. Schéma de la structure de la cucurbitacine I

2.4. Fragmentation de la cucurbitacine E

Le profil du spectre UV du composé à Tr 16,1 min montre deux maxima d'absorption à 230 et 270 nm, ce qui nous permet d'envisager une structure de type triterpène appartenant à la famille des cucurbitacines(Ul Haq et al. 2019). Les spectres de masse MS 2 sont présentés dans la figure 25 suivante.

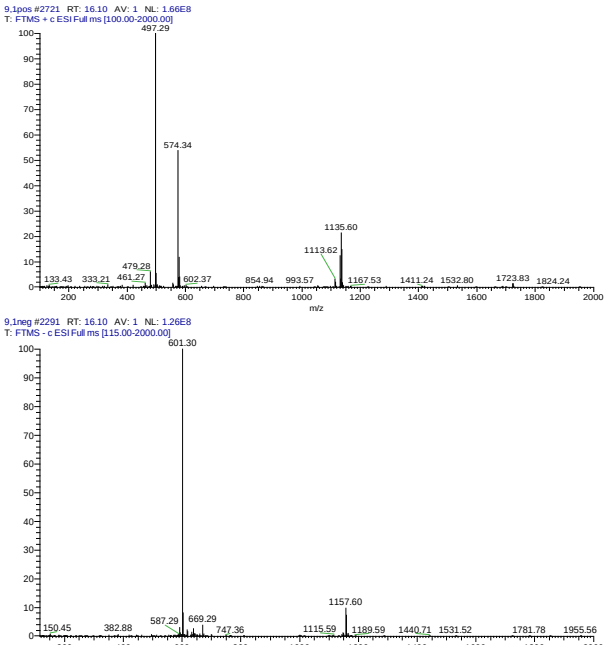


Figure 24. De haut en bas : Spectres MS2 (+) MS2 (-) de la cucurbitacine E

La masse moléculaire de ce composé est de 556 g/mol déduite à partir de l'ion quasimoléculaire m/z 601 [M+HCOOH-H]−. Le spectre MS 2 présente un ion majoritaire à m/z 497, qui pourrait correspondre au noyau cucurbitane tetracyclique qui aurait perdu 60 uma qui correspondent à la perte d'un acide acétique (CH3COOH). Par comparaison à la littérature (Nayab et al. 2010), ce composé a été identifié à la cucurbitacine E.

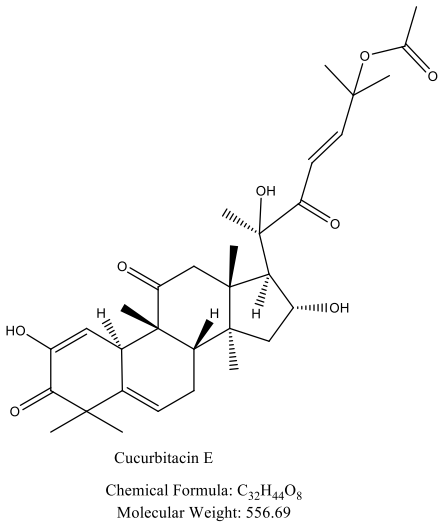


Figure 25. Schéma de la structure de la cucurbitacine E

3. Fractionnement de Pna1 et Sna1

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés au fractionnement des fractions Pna1 et Sna1 (fraction acétate d'éthyle de la pulpe et de graine de *Citrullus colocynthis)* qui se sont révélées comme étant responsables des activités biologiques identifiées. L'analyse en LCMS a montré que Pna1 et Sna1 ont la même composition chimique en plus du fait qu'ils soient riches en triterpènes (Cucurbitacines) et dont certains restent non décrites dans la littérature.

3.1. Fractionnement de Pna1 par VacElut

Ce fractionnement a été effectué en utilisant le système Vac Elut (Analytichem International Lab Vacuum VACELUT SPS 24 AI 6500 Lab Science) en utilisant une colonne C18 inverse (Chromabond C18 ec, phase inverse).

Dans un premier essai, nous avons fractionné Pna1, Cette colonne a été éluée par 2 solvants : Eau et méthanol dans un gradient de polarité croissante allant de 100% eau jusqu'à 100% de méthanol. Ainsi, 3 fractions ont été collectées selon leurs similitudes en CCM.

200mg de Pna1 ont été dilué dans 5ml H2O + 1ml MeOh, Après filtration de ce mélange, nous avons déposé la suspension dans la colonne. Les CCM montrent 3 principales fractions :

- Une première fraction : correspondant à la fraction la plus polaire avec un rendu de 30 mg.
- Une deuxième fraction : tache correspond au composé majoritaire C1 à 95 mg de rendu.
- Une troisième fraction : Fraction apolaire avec un rendu de 18 mg.

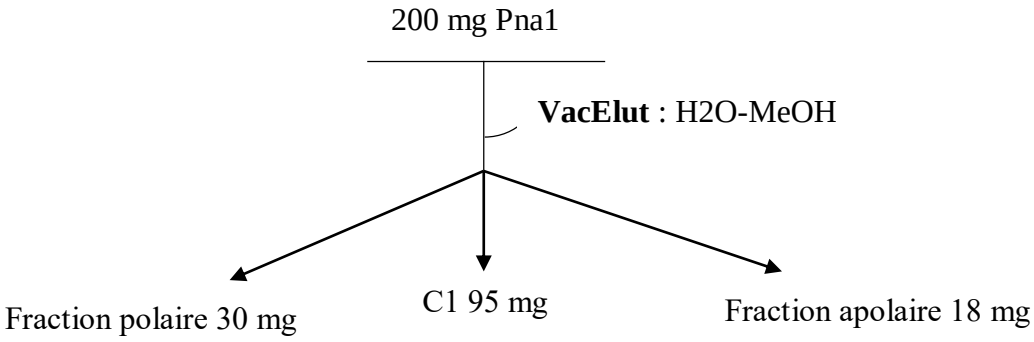


Figure 26. Diagramme de purification de Pna1 par VacElut

La déréplication des résultats LCMS de C1 par la comparaison nos données (analysées avec le logiciel X-calibur) avec les données trouvées dans la littérature nous indique que le composé C1 correspond à la 2-O-β-D- glucopyranosyl-cucurbitacine E.

3.2. Fractionnement de Pna1 par MPLC

Le fractionnement a été fait sur une colonne MPLC de gel de silice (15-40 µm), utilisant un gradient de solvants de polarités croissantes allant de 100% dichlorométhane jusqu'à 100% méthanol.

Ceci a permis d'obtenir 4 fractions (figure 28 CCM bilan):

- F1: mélange de composés apolaire ==> 0.1416g
- C1: composé majoritaire, semblant être le même composé récupéré en amont par Vac Elut (comparaison des composés par CCM) ==> 0.8415g
- C2: ==> 0.1127g
- F2: fraction la plus polaire ==> 0.3256g

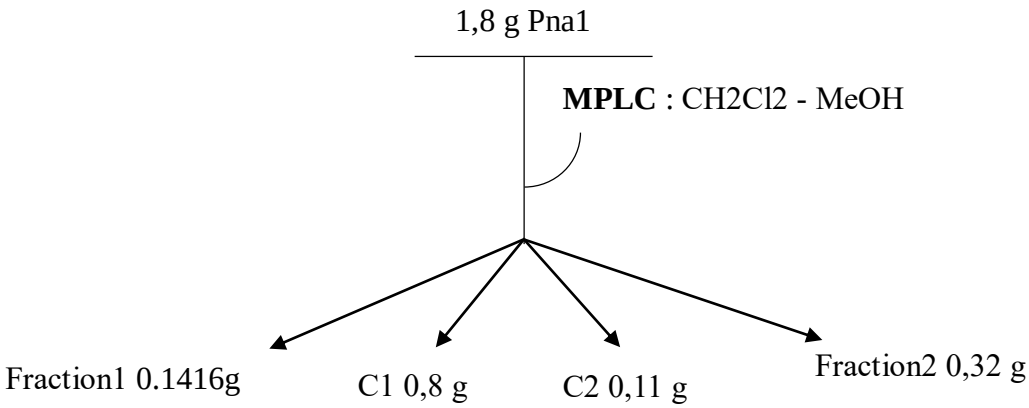


Figure 27. Diagramme de purification de Pna1 par MPLC

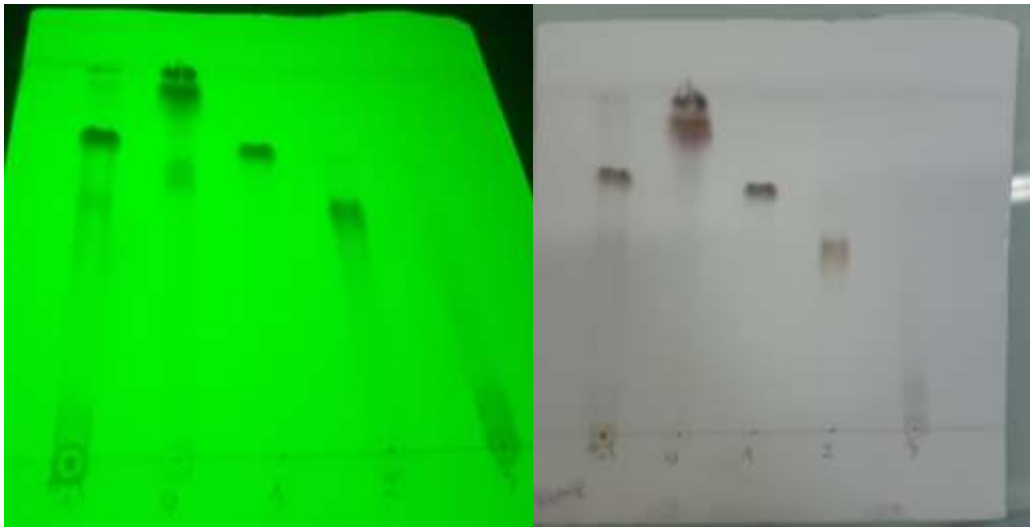


Figure 28. CCM bilan du fractionnement de Pna1 par MPLC

La déréplication des résultats LCMS de C2 par la comparaison nos données (analysées avec le logiciel X-calibur) avec les données trouvées dans la littérature nous indique que le composé C2 correspond à la 2-O-β-D- glucopyranosyl-cucurbitacine I.(Seger et al. 2005; Delazar et al. 2006)

3.3. Purification de F1 par HPLC semi préparative

L'analyse de la fraction F1 par UHPLC (Figure 29) à une concentration de 1 mg/ml a montré la présence d'un pic majoritaire.

La purification de la fraction F1 (3mg/ml solubilisé dans de l'isopropanol) a été réalisée par une HPLC semi-préparative (C18, 250 x 10 mm, 5 µm) sur C 18. Ainsi, nous avons pu isoler deux produits nommés C3 (4 mg) et C4 (1,5 mg) en injectant plusieurs fois la fraction concentrée (3 mg/ml). La séparation a été effectuée selon le gradient d'élution de la phase mobile décrit dans le Tableau 8.

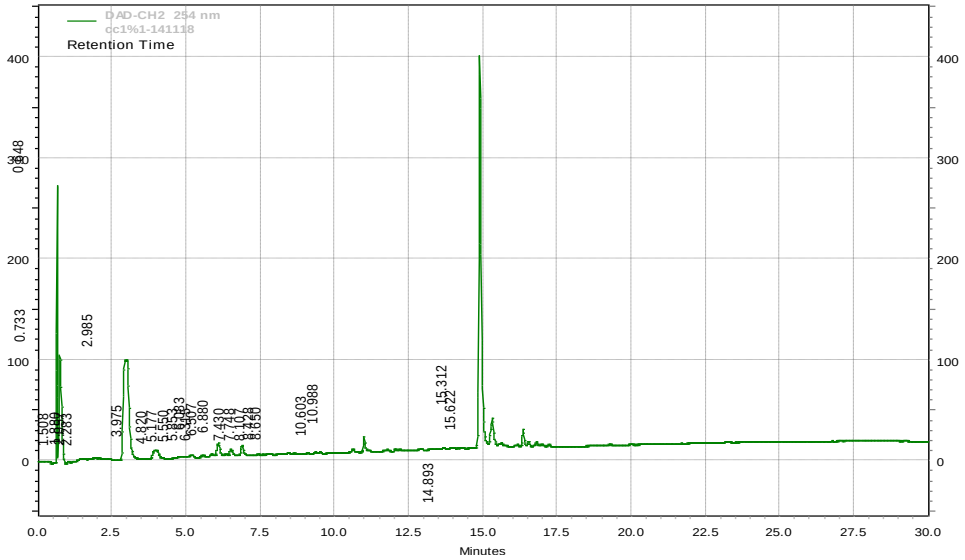


Figure 29. Profil UHPLC de la fraction F1

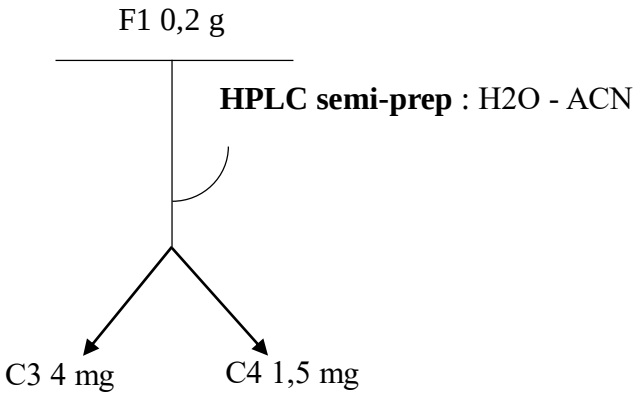


Figure 30. Diagramme du fractionnement de F1 par HPLC semi-préparative

La déréplication des résultats LCMS de C3 et C4 par la comparaison nos données (analysées avec le logiciel X-calibur) avec les données trouvées dans la littérature nous indique que le composé C3 et C4 correspondent respectivement à la cucurbitacine E(Ul Haq et al. 2019) (composé majoritaire Tr 15,31 min) et à une cucurbitacine non identifiée encore dans la littérature (composé 22 de la déréplication de Pna1) .

3.4. Bilan

Après les différents procédés de fractionnement et de purification de Pna1, nous obtenons les fractions et molécules suivantes (de la plus polaire à l'apolaire):

- Fraction polaire F3
- C1 : Glucocucurbitacine I
- C2 : Glucocucurbitacine E
- Fraction1 - non identifiée
- Fraction2 - non identifiée
- C3 : Cucurbitacine E
- C4 : Cucurbitacine non identifiée

4. Identification des composés isolées

4.1. RMN proton et carbone du composé C1

Le spectre de RMN 13 C (Figure 31) du composé C1 révèle la présence de six signaux qui résonnent entre 61,5 et 100,1 ppm dont

- Cinq méthines résonnant à δ C = 100,1 ; 76,8 ; 72,3 ; 75,9 et 69,47 ppm attribués respectivement aux carbones C 1' , C 2' , C 3' , C 4' et C 5' .
- un méthylène résonnant à δ C = 61,71 ppm attribué au carbone C 6' portant deux protons non équivalents H 6'a et H 6'b résonnant à δ H = 3,93 ppm (H 6'a ; dd J= 2,5 ; 11,5 Hz) et à δ H = 4,09 ppm (H 6'b ; d, J= 11,5 Hz).

Nous avons évalué la correspondance des données RMN proton et carbone de C1 avec des données référencées (Hatam, Whiting, and Yousif 1989; Chawech, Jarraya, et al. 2015) (Tableau 10).

L'ensemble de ces résultats et la comparaison des données spectroscopiques de C1 avec celles de la littérature (Hatam, Whiting, and Yousif 1989; Chawech, Jarraya, et al. 2015), nous ont permis d'identifier ce composé à la 2-O-β-D-Glucopyranosyl-cucurbitacine E (Figure 21).

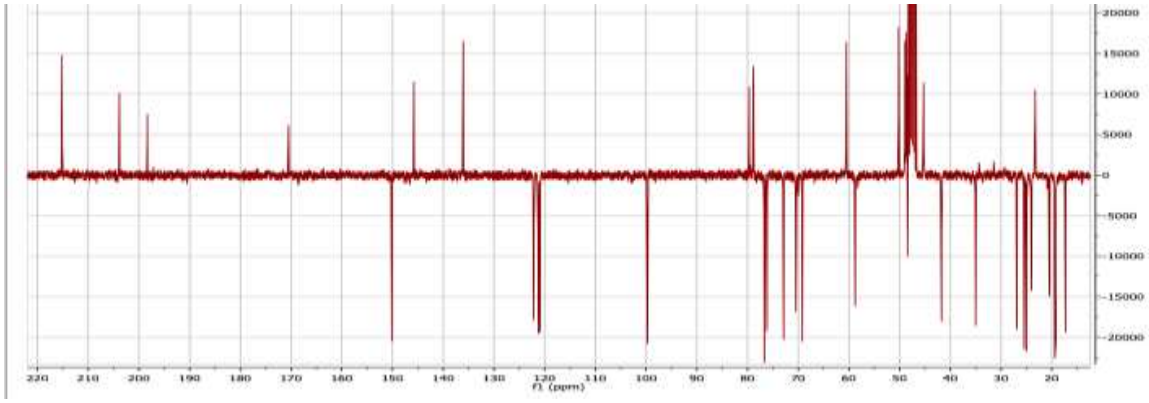


Figure 31. Spectre RMN ^{13}C de C1

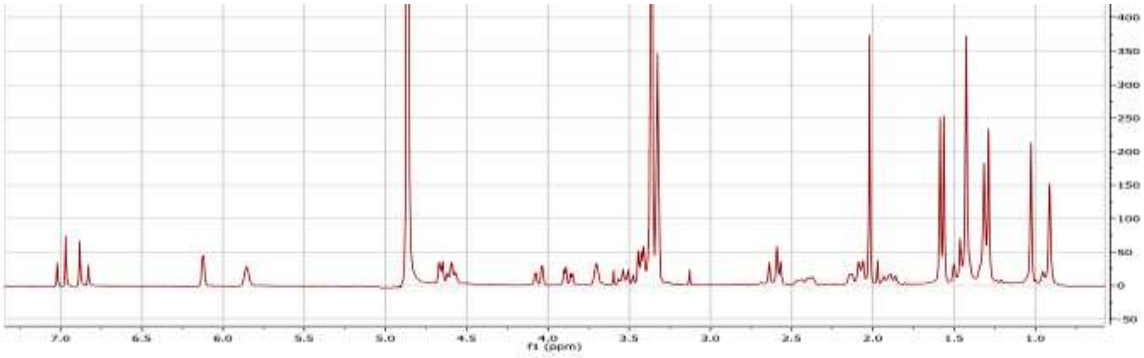


Figure 32. Spectre RMN ^{1}H de C1

Tableau 9. *Correspondance des données spectroscopiques proton et carbone de C1 avec des données référencées* (Hatam, Whiting, and Yousif 1989)

N°	^{13}C, δ (ppm)	Correspondance C1	N°	^{1}H δ (ppm)	Correspondance C1
1	123.82	122.14 (1)	1	6.10 d (2)	6.12 d (1)
2	146.80	145.78 (2)	6	5.84 t (2)	5.86 br s (6)
3	198.74	198.35 (3)	7a	2.40 dd (8, 20)	2.42 dd (7a)
4	49.06	48.45 (4)	7b	2.11 *	2.14 d (7b)
5	137.40	136.06 (5)	8	2.05 *	2.07 d (8)
6	122.02	120.93 (6)	10	3.71 br s	3.70 s (10)
7	24.61	24.03 (7)	12a	3.41 d (15)	
8	42.72	41.75 (8)	12b	2.59 d (15)	2.59 * (12b)
9	50.01	50.20 (9)	15a	1.87 dd (7, 20)	1.89 dd (15a)
10	36.15	35.03 (10)	15b	1.45 *	1.48 * (15b)
11	215.24	215.16 (11)	16	4.51 t (7)	4.66 t (16)
12	49.87	48.55 (12)	17	2.65 d (7)	2.59 * (17)
13	49.93	48.72 (13)	23	6.84 d (16)	6.85 d (23)
14	51.47	50.20 (14)	24	6.98 d (16)	6.99 d (24)
15	46.77	46.75 (15)	18	0.94 s	0.91 s (18)
16	71.39	70.45 (16)	19	1.47 s	1.43 s (19)
17	59.33	58.77 (17)	21	1.42 s	1.43 s (21)
18	20.67	19.19 (18)	26	1.55 s	1.59 s (26)
19	18.74	17.31 (19)	27	1.52 s	1.56 s (27)
20	79.75	78.85 (20)	28	1.26 s	1.29 s (28)
21	25.33	24.03 (21)	29	1.26 s	1.32 s (29)
22	203.99	203.85 (22)	30	0.98 s	1.03 s (30)
23	122.51	121.26 (23)	1'	4.66 d (8)	4.59 t (1')
24	151.17	150.14 (24)	2'	3.30 t (8)	
25	80.47	79.66 (25)	3', 4'	3.47 m	
26	26.65	25.02 (26)	5'	3.38 m	
27	27.16	25.46 (27)	6'a	4.01 dd (12, 2)	4.06 dd (6'a)
28	20.87	19.39 (28)	6'b	3.83 dd (12, 3)	3.87 dd (6'b)
29	28.25	26.89 (29)			
30	21.00	20.50 (30)			
1'	101.19	99.73 (1')			
2'	74.03	72.89 (2')			
3'	77.47	76.16 (3')			
4'	70.77	69.20 (4')			
5'	78.05	76.69 (5')			
6'	62.34	60.05 (6')			
CO Me	170.26	170.49 Co Me)			
CO Me	21.91	23.27 (co me)			

4.2. RMN proton et carbone du composé C2

Le spectre de RMN 1 H du composé C2 (Figure 33) est similaire à celui de C1. Il est possible d'observer :

- huit méthyles (-CH 3) apparaissant sous forme de singulets à δ H =0,96; 1,04; 1,29 ; 1,32; 1,35 ; 1,36 ; 1,42 et 1,44 ppm attribués respectivement aux protons H 30 , H 18 , H 29 , H 28 , H 19 , H 21 , H 27 et H 26 .
- trois méthylènes (-CH 2 -) portant chacun deux protons non équivalents : 2H 7 (δ H = 2,09 et 2,40 ppm, m) ; 2H 12 (δ H = 2,69 et 3,35 ppm, d, J= 14,5 Hz) et 2H 15 (δ H = 1,21 et 1,90 ppm, m).
- un méthine portant un oxygène (-CH-O-) à δ H = 4,53 ppm attribué au proton H 16 .
- deux oléfines trisubstituées attribuées aux protons H 6 (δ H = 5,86 ppm, m) et H 1 (δ H = 6,14 ppm, d, J= 2,4 Hz).
- une paire Trans-oléfine H 23 et H 24 résonnant respectivement à δ H = 6,86 et 6,99 ppm (tous les deux, d, J= 15,5 Hz).

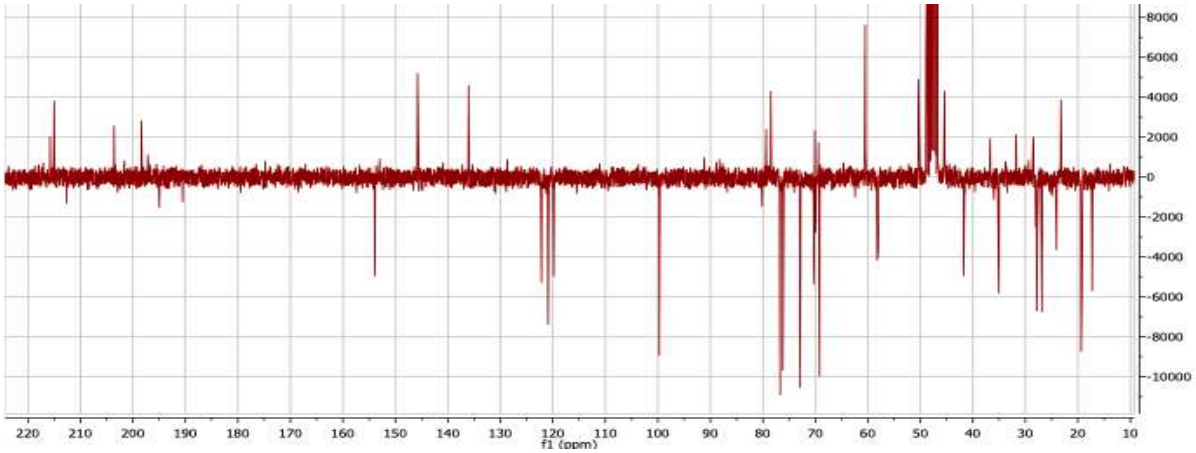


Figure 33. Spectre RMN ^{13}C de C2

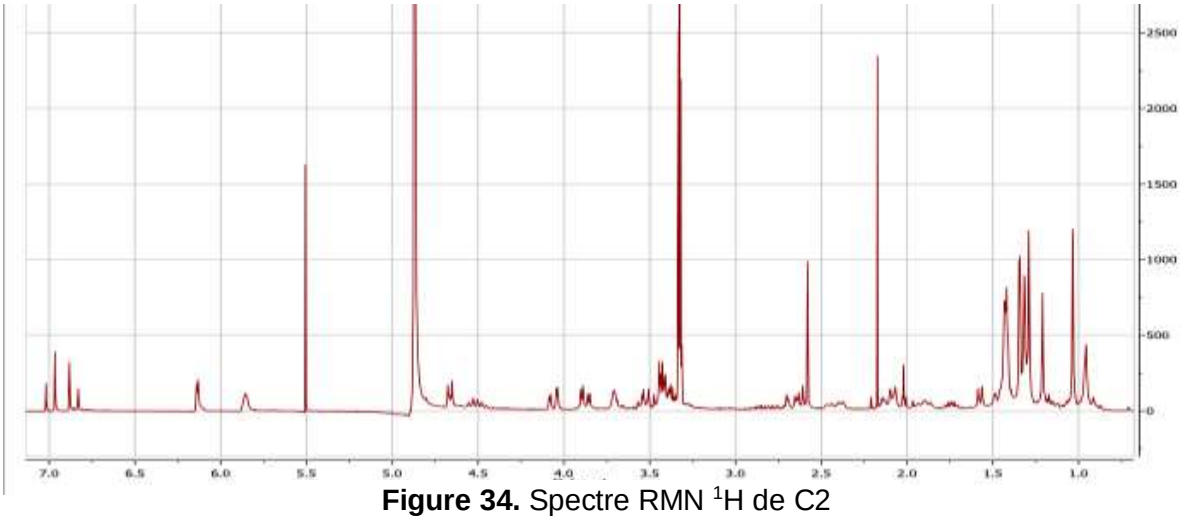


Figure 34. Spectre RMN ^{1}H de C2

L’ensemble de ces résultats et la comparaison des données spectroscopiques de C2 avec celles de la littérature (Seger et al. 2005), nous ont permis d’identifier ce composé à la 2-O-β-D-Glucopyranosyl-cucurbitacine I (Figure 19).

Tableau 10. *Correspondance des données spectroscopiques proton et carbone de C2 avec des données référencées* (Seger et al. 2005)

N°	^{13}C, δ (ppm)	Correspondance C1	N°	^{1}H δ (ppm)	Correspondance C1
1	123.7 d	122,17	1	6.11 d	6.14d
2	147.2s	145,77	6	5.83 br s	5.86 brs
3	199.8s	198,34	7a	2.40 m	2.42m
4	50.1s	48,92	7b	2.08 m	2.14m
5	137.5s	136,07	8	2.06 m	2.09m
6	122.3 d	120,92	10	3.68 br s	3.70 brs
7	24.6 t	23,24	12a	3.41 d	3.42d
8	43.1 d	41,72	12b	2.65 d	2.67d
9	50.3s	50,25	15a	1.88 dd	1.90dd
10	36.5 d	35,02	15b	1.44 m	1,43m
11	216.4s	215,01	16	4.50 m	4.52m
12	50.1 t	47,69	17	2.60 d	2.61d
13	50.7s	50,33	18	0.93s	0.96s
14	49.5sb	47,75	19	01.01s	1.03s
15	46.8 t	42,4	21	1.40s	1.41s
16	71.7 d	70,25	23a	6.83 d	6,86
17	59.6 d	58,22	24	6.97 d	6,99
18	20.8 q	19,24	26	1.32s	1.34s
19	20.6 q	19,16	27	1.32s	1.35s
20	79.9s	78,49	28	1.29s	1.31s
21	25.5 q	24,07	29	1.27s	1.29s
22	205.0s	203,56	30	1.41s	1.42s
23	121.3 d	119,85	10	4.64 d	4.67d
24	155.4 d	153,91	20	3.43 m	3.44m
25	71.5s	70,09	30	3.44 m	3.45m
26	29.2 q	27,81	40	3.53 m	3.54m
27	29.2 q	27,81	50	3.38 m	3.41m
28	28.3 q	26,86	60 a	4.04 dd	4.06dd
29	20.8 q	19,36	60 b	3.85 dd	3.88 dd
30	18.7 q	17,27			
1'	101.2 d	99,74			
2'	74.3 d	72,9			
3'	77.6 d	76,17			
4'	70.7 d	69,4			
5'	78.1 d	76,69			
6'	62.0 t	60,5			

III. Conclusion

Pour mieux connaître les molécules de Pna1 qui pourraient éventuellement être impliquées dans ses différents effets biologiques, nous avons pu identifier les métabolites secondaires présents dans cet extrait au moyen de LC – PDA-CAD-MS. Cela a révélé que plusieurs composés étaient présents dans Pna1 dans une large mesure, dont un majoritaire qui est la 2-O-β-D- glucopyranosyl-cucurbitacine E représentant plus de 50% de l'extrait. Un pic final a été récupéré à Tr 16,67 min (composé 10). Le métabolite correspondant avait la configuration moléculaire d'une cucurbitacine mais n'avait pas encore été décrit dans la bibliographie. Nous supposons que l'un de ces 10 composés, ou peut-être une combinaison de plusieurs, affiche l'activité stimulant l'insuline que nous avons découverte dans Pna1. L'analyse des profils chimiques de Pna1 et Sna1 a démontré une ressemblance qualitative et quantitative de leur composition moléculaire à l'exception de deux composés (cucurbitacine A et S que nous retrouvons seulement dans l'extrait de pulpe Pna1).

Dans une deuxième étape, l'application de différentes techniques de séparation et de purification comme la chromatographie sur colonne, l'HPLC semi-préparative, la MPLC et la CCM préparative nous a permis d'isoler 4 cucurbitacines à partir de Pna1: la cucurbitacine E, la 2O-β-D-glucopyranosyl-cucurbitacine E, O-β-D-glucopyranosylcucurbitacine I, et une cucurbitacine non identifiée encore.

Chapitre 7 Conclusion générale et perspectives

L’utilisation des plantes médicinales à des fins thérapeutiques est une pratique ancestrale qui existe depuis le début de la civilisation. Actuellement, avec les avancées technologiques, la performance ainsi que la diversité des techniques analytiques, l’isolement et l’identification des molécules phytochimiques bioactives sont de plus en plus facilités, ce qui a révolutionné le monde médical et plus particulièrement le domaine thérapeutique. Les plantes représentent aujourd’hui une source infinie de possibilités thérapeutiques de par leur richesse en molécules et nouvelles structures potentiellement bioactives et non par l’idée reçue qui dit qu’un traitement phytochimique présenterait moins de toxicité et moins d’effets secondaires qu’un traitement chimique.

Ce travail de thèse avait pour objectifs d’identifier de nouvelles activités biologiques d’extraits de Citrullus colocynthis en identifiant des cibles métaboliques sur lesquelles agissent ces derniers.

La méthode expérimentale employée a consisté à préparer des extraits par macération de différents organes de Citrullus colocynthis dans des solvants de polarités croissantes. Ensuite, nous avons étudié l’effet des extraits sur différentes cibles métaboliques qui étaient susceptibles d’expliquer l’effet antidiabétique aigu de *Citrullus colocynthis* préalablement décrit dans la bibliographie. Les deux cibles choisies sont : l’ α-amylase et GLUT 4. En parallèle la toxicité des extraits a été évaluée in vitro sur des cellules 3t3-L1 et via un test d’hémolyse. Les extraits qui présentaient une bonne activité ont été analysés et fractionnés par différentes méthodes chromatographiques et par RMN.

A partir des résultats obtenus, nous pouvons résumer les conclusions issues de cette étude comme suit :

1. Suite à l’’étude de l’effet de Citrullus colocynthis sur GLUT 4, nous avons démontré que Pna1 augmentait la translocation de GLUT4 sans changer la demi-dose maximale (ED50) d'insuline, ni changer la cinétique de translocation de GLUT4. Au niveau moléculaire, Pna1 s'est révélé augmenter la phosphorylation de PKB induite par l'insuline sans modifier la phosphorylation du récepteur d'insuline. Ainsi, nous avons mis en évidence que la fraction d'acétate d'éthyle de l'extrait de pulpe aqueuse non dégraissée présente une activité améliorant les effets de l'insuline mais ne mime pas son action. D’après les données bibliographiques, c'est la première fois qu'une telle activité est décrite pour un extrait ou un composé végétal.

2. L’étude de cytotoxicité de notre plante a montré qu’à la concentration de 1mg/ml, les extraits de pulpe et de graine présentent un faible taux d’hémolyse qui ne dépasse pas les 18% après 60 min d’incubation. Par la suite, les tests de viabilité cellulaire ont montré que Pna1 n'était pas toxique pour les cellules. De plus, comme l'insuline, Pna1 a restauré la viabilité cellulaire en absence de nutriments.

3. Les extraits de graine et de pulpe de *Citrullus colocynthis* présentent une activité inhibitrice de l' α -amylase avec une activité intéressante de la fraction acétate d’éthyle de l’extrait aqueux brut de pulpe, Pna1 et Sna1. Malgré le fait

qu’ils présentent une activité relativement intéressante elle reste néanmoins plus faible que celle de l’acarbose qui est l’inhibiteur de référence de l’ α -glucosidase . Une purification et un fractionnement bio-guidé de Pna1 seraient nécessaires dans un futur proche afin d’isoler la molécule responsable de cette activité.

4. Dans la dernière étape, nous avons tout d’abord mis en évidence la similitude dans la composition chimique des fractions acétate d’éthyle de graine et de pulpe, et ce, par la comparaison qualitative et quantitative de leurs profils chimiques obtenus par LCMS. Ensuite, la fraction acétate d’éthyle de pulpe a été fractionnée par l’application de différentes techniques de séparation et de purification, la chromatographie sur colonne, l’HPLC semi-préparative, la MPLC et la CCM, qui nous ont permis d’isoler 4 cucurbitacines. L’élucidation structurale de ces produits a été réalisée au moyen de la RMN 1D (1 H et 13 C). L’étude phytochimique nous a également permis d’identifier une nouvelle molécule qui correspond à une cucurbitacine dont la configuration moléculaire n'a pas encore été décrite dans la littérature.

Aussi, ces résultats demeurent prometteurs, et pourraient servir de base pour des projets de recherche ultérieurs afin d’apporter des résultats complémentaires qui viendraient valider l’efficacité antidiabétique de ces extraits naturels et de proposer leur utilisation en tant qu’agents antidiabétiques alternatifs. En perspectives, notre étude pourrait être poursuivie en suivant certains axes de recherche :

- Poursuivre l’isolement des cucurbitacines afin de tester leurs effets sur l’ α-amylase et GLUT4
- Déterminer le mécanisme d’action sur le plan moléculaire de Pna1 sur GLUT4 et l’ α-amylase
- Explorer l’effet protecteur de Pna1 sur les adipocytes.
- Évaluer leurs effets sur des modèles murins diabétiques et approfondir le mécanisme d’action de ces composés.
- Isoler en plus grande quantité les cucurbitacines les plus actives afin de réaliser des hémi-synthèses et permettre ainsi d’établir des relations structure-activité pour ces composés et envisager des études de pharmaco-modulation.

Références bibliographiques

Abdel-Hassan, Issa, Jamal Abdel-Barry, and Sarah Mohammeda. 2000. “The Hypoglycaemic and Antihyperglycaemic Effect of Citrullus Colocynthis Fruit Aqueous Extract in Normal and Alloxan Diabetic Rabbits.” *Journal of Ethnopharmacology* 71 (July): 325–30. https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00215-9.

Abdullah, A., S. Bakry, A. Abd El-Baky, and A. Mansour. 2010. “EVALUATION OF THE ANTIOXIDATIVE, ANTIDIABETIC AND ANTILIPIDEMIC EFFECT OF BITTER MEL ON SEEDS (CITRULLUS COLOCYNTHIS) ALCOHOLIC EXTRACT ON FEMALE RATS.” *Al-Azhar Bulletin of Science* 21 (Issue 1-C): 13–26. https://doi.org/10.21608/absb.2010.7351.

Adam, S. E. I., M. A. Al-Yahya, and A. H. Al-Farhan. 2001. “Response of Najdi Sheep to Oral Administration of Citrullus Colocynthis Fruits, Nerium Oleander Leaves or Their Mixture.” *Small Ruminant Research: The Journal of the International Goat Association* 40 (3): 239–44. https://doi.org/10.1016/s0921-4488(01)00184-5.

Agarwal, Vipin, Ashish Kumar Sharma, Anshu Upadhyay, Gopendra Singh, and Rajiv Gupta. 2012. “Hypoglycemic Effects of Citrullus Colocynthis Roots.” *Acta Poloniae Pharmaceutica* 69 (1): 75–79.

Aguilar Martinez. n.d. “ÉRYTHROCYTES - Faculté de médecine de Montpellier.” yumpu.com. Accessed May 31, 2021. https://www.yumpu.com/fr/document/read/16839227/erythrocytes-faculte-de-medecine-de-montpellier.

Aljabry, Abdalla Saleh, Ayat Ahmed Alrasheid, and Elnur Ramadan. 2019. “Citrullus Colocynthis a Prospective Antimicrobial and Antifungal Agent.” *American Journal of Medicine and Medical Sciences* 9 (2): 41–45.

Amin, Alia, Mohammad Tahir, and Khalid Pervez Lone. 2017. “Effect of Citrullus Colocynthis Aqueous Seed Extract on Beta Cell Regeneration and Intra-Islet Vasculature in Alloxan Induced Diabetic Male Albino Rats.” *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association* 67 (5): 715–21.

Amirkia, Vafa, and Michael Heinrich. 2014. “Alkaloids as Drug Leads – A Predictive Structural and Biodiversity-Based Analysis.” *Phytochemistry Letters* 10 (December): xlviii–liii. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.06.015.

Ashcroft, Frances M., and Patrik Rorsman. 2012a. “Diabetes Mellitus and the β Cell: The Last Ten Years.” *Cell* 148 (6): 1160–71. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.010.

———. 2012b. “Diabetes Mellitus and the β Cell: The Last Ten Years.” *Cell* 148 (6): 1160–71. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.010.

Ashcroft, Frances, and Patrik Rorsman. 2004. “Type 2 Diabetes Mellitus: Not Quite Exciting Enough?” *Human Molecular Genetics* 13 Spec No 1 (April): R21-31. https://doi.org/10.1093/hmg/ddh066.

Asyaz, S., Farman Khan, Iqbal Hussain, M.A. Khan, and Ihsan Khan. 2010. “Evaluation of Chemical Analysis Profile of Citrullus Colocynthis Growing in Southern Area of Khyber Pukhtunkhwa, Pakistan.” *World Appl. Sci. J* 10 (January): 402–5.

Atole, S.K., Rajendra Jangde, Preety Philip, D.S. Rekhe, D.V. Aghav, H.J. Waghode, and A.M. Chougule. 2009. “Safety Evaluation Studies of Citrullus Colocynthis for Diabetes in Rats.” *Veterinary World* 2 (January): 423–25.

Barghamdi, Batol, Fereshteh Ghorat, Khairollah Asadollahi, Kourosh Sayehmiri, Robab Peyghambari, and Ghobad Abangah. 2016. “Therapeutic Effects of Citrullus Colocynthis Fruit in Patients with Type II Diabetes: A Clinical Trial Study.” *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 8 (2): 130–34. https://doi.org/10.4103/0975-7406.171702.

Barth, Astrid, Dieter Müller, and Katrin Dürrling. 2002. “In Vitro Investigation of a Standardized Dried Extract of Citrullus Colocynthis on Liver Toxicity in Adult Rats.” *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie* 54 (3): 223–30. https://doi.org/10.1078/0940-2993-00252.

Bashary, Roqia, Manish Vyas, Surendra Kumar Nayak, Ashish Suttee, Surajpal Verma, Rakesh Narang, and Gopal L. Khatik. 2020. “An Insight of Alpha-Amylase Inhibitors as a Valuable Tool in the Management of Type 2 Diabetes Mellitus.” *Current Diabetes Reviews* 16 (2): 117–36. https://doi.org/10.2174/1573399815666190618093315.

Baumgard, L. H., G. J. Hausman, and M. V. Sanz Fernandez. 2016. “Insulin: Pancreatic Secretion and Adipocyte Regulation.” *Domestic Animal Endocrinology* 54 (January): 76–84. https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2015.07.001.

Bendjeddou, D., K. Lalaoui, and D. Satta. 2003. “Immunostimulating Activity of the Hot Water-Soluble Polysaccharide Extracts of Anacyclus Pyrethrum, Alpinia Galanga and Citrullus Colocynthis.” *Journal of Ethnopharmacology* 88 (2–3): 155–60. https://doi.org/10.1016/s0378-8741(03)00226-5.

Bernfeld, Peter. 1955. “[17] Amylases, α and β.” In *Methods in Enzymology*, 1:149–58. Elsevier. https://doi.org/10.1016/0076-6879(55)01021-5.

Bluestone, Jeffrey A., Kevan Herold, and George Eisenbarth. 2010. “Genetics, Pathogenesis and Clinical Interventions in Type 1 Diabetes.” *Nature* 464 (7293): 1293–1300.

Boland, Brandon B., Christopher J. Rhodes, and Joseph S. Grimsby. 2017. “The Dynamic Plasticity of Insulin Production in β-Cells.” *Molecular Metabolism* 6 (9): 958–73. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.04.010.

Bonnefond, Amélie, Philippe Froguel, and Martine Vaxillaire. 2010. “The Emerging Genetics of Type 2 Diabetes.” *Trends in Molecular Medicine* 16 (9): 407–16. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.06.004.

Bourek, Zohra. 2013. “Thèse Master ‘Contribution à l’étude Phytochimique Des Effets Hemolytiques de 3 Plantes.’”

Bridges, Amanda, Karlyle G. Bistas, and Tibb F. Jacobs. 2021. “Exenatide.” In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK518981/.

Bruneton, Jean. 2016. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales,*. Ed, Tec et Doc.,. https://www.lavoisier.fr/livre/genie-pharmaceutique/pharmacognie-phytochimie-plantes-medicinales-5e-ed/bruneton/descriptif-9782743021658.

Brunetti, Antonio, Eusebio Chiefari, and Daniela Foti. 2014. “Recent Advances in the Molecular Genetics of Type 2 Diabetes Mellitus.” *World Journal of Diabetes* 5 (2): 128–40. https://doi.org/10.4239/wjd.v5.i2.128.

Bryant, Nia J., Roland Govers, and David E. James. 2002. “Regulated Transport of the Glucose Transporter GLUT4.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 3 (4): 267–77. https://doi.org/10.1038/nrm782.

Butler, Alexandra E., Juliette Janson, Susan Bonner-Weir, Robert Ritzel, Robert A. Rizza, and Peter C. Butler. 2003. “Beta-Cell Deficit and Increased Beta-Cell Apoptosis in Humans with Type 2 Diabetes.” *Diabetes* 52 (1): 102–10. https://doi.org/10.2337/diabetes.52.1.102.

Camilleri, Michael, and Andres Acosta. 2018. “Combination Therapies for Obesity.” *Metabolic Syndrome and Related Disorders* 16 (8): 390–94. https://doi.org/10.1089/met.2018.0075.

Carillon, Alain. 2009. “Place de La Phytothérapie Dans Les Systèmes de Santé Au XXI Ème Siècle,” 2009, In: Conférence SIPAM, Djerba, Tunisie, Mars 2009, 7p edition.

Charron, M. J., F. C. Brosius, S. L. Alper, and H. F. Lodish. 1989. “A Glucose Transport Protein Expressed Predominately in Insulin-Responsive Tissues.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (8): 2535–39. https://doi.org/10.1073/pnas.86.8.2535.

Chawech, Rachid, Raoudha Jarraya, Cynthia Girardi, Marieke Vansteelandt, Guillaume Marti, Imen Nasri, Claire Racaud-Sultan, and Nicolas Fabre. 2015. “Cucurbitacins from the Leaves of

Citrullus Colocynthis (L.) Schrad." *Molecules* 20 (10): 18001–15. https://doi.org/10.3390/molecules201018001.

Chawech, Rachid, Dhekra Mhalla, Mohamed Trigui, Mohamed Mihoubi, Nicolas Fabre, and Raoudha Jarraya. 2015. "Chemical Composition and Antibacterial Activity of Extracts and Compounds Isolated from Citrullus Colocynthis (L.) Schrad." *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 4 (December): 197–203.

Chiang, Shian-Huey, Christian A. Baumann, Makoto Kanzaki, Debbie C. Thurmond, Robert T. Watson, Cheryl L. Neudauer, Ian G. Macara, Jeffrey E. Pessin, and Alan R. Saltiel. 2001. "Insulin-Stimulated GLUT4 Translocation Requires the CAP-Dependent Activation of TC10." *Nature* 410 (6831): 944–48. https://doi.org/10.1038/35073608.

Colagiuri, Stephen, David Matthews, Lawrence A. Leiter, Siew Pheng Chan, Giorgio Sesti, and Michel Marre. 2018. "The Place of Gliclazide MR in the Evolving Type 2 Diabetes Landscape: A Comparison with Other Sulfonylureas and Newer Oral Antihyperglycemic Agents." *Diabetes Research and Clinical Practice* 143 (September): 1–14. https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.05.028.

Danne, Thomas, Lutz Heinemann, and Jan Bolinder. 2018. "New Insulins, Biosimilars, and Insulin Therapy." *Diabetes Technology & Therapeutics* 20 (S1): S55–70. https://doi.org/10.1089/dia.2018.2505.

Dashti, Nazanin, Marzeyeh Zamani, Reza Mahdavi, and Ali Rahimi. 2011. "The Effect of Citrulluscolocynthis on Blood Glucose Profile Level in Diabetic Rabbits." *Pars of Jahrom University of Medical Sciences* 9 (August): 27–32. https://doi.org/10.29252/jmj.9.4.27.

Daugaard, J. R., J. N. Nielsen, S. Kristiansen, J. L. Andersen, M. Hargreaves, and E. A. Richter. 2000. "Fiber Type-Specific Expression of GLUT4 in Human Skeletal Muscle: Influence of Exercise Training." *Diabetes* 49 (7): 1092–95. https://doi.org/10.2337/diabetes.49.7.1092.

De Meyts, Pierre. 2000. "The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network." In *Endotext*, edited by Kenneth R. Feingold, Bradley Anawalt, Alison Boyce, George Chrousos, Kathleen Dungan, Ashley Grossman, Jerome M. Hershman, et al. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK378978/.

Delazar, Abbas, Simon Gibbons, Ali Kosari, Hossein Nazemiyeh, Masoud Modarresi, Dr Lutfun Nahar, and Satyajit Sarker. 2006. "Flavone C-Glycosides and Cucurbitacin Glycosides from Citrullus Colocynthis." *DARU Volume* 14 (June).

Dhakad, Prashant Kumar, Pramod Kumar Sharma, and Sokindra Kumar. 2017. "A Review on Phytochemical Studies and Biological Potential of Citrullus Colocynthis (L.) Schrad.

(Cucurbitaceae).” *Bioengineering and Bioscience* 5 (4): 55–64. https://doi.org/10.13189/bb.2017.050401.

Ebrahimi, Esmaeel, Somaieh Bahramzadeh, Mahmoud Hashemitabar, Ghorban Mohammadzadeh, Saeed Shirali, and Javad Jodat. 2016. “Effect of Hydroalcoholic Leaves Extract of Citrullus Colocynthis on Induction of Insulin Secretion from Isolated Rat Islets of Langerhans.” *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 6 (8): 638–41. https://doi.org/10.1016/S2222-1808(16)61101-5.

El-Baky, Atef E Abd, and Hatem K Amin. 2011. “EFFECT OF CITRULLUS COLOCYNTHIS IN AMELIORATE THE OXIDATIVE STRESS AND NEPHROPATHY IN DIABETIC EXPERIMENTAL RATS,” 10.

El-Beshbishy, Ha, and Sa Bahashwan. 2012. “Hypoglycemic Effect of Basil (Ocimum Basilicum) Aqueous Extract Is Mediated through Inhibition of α-Glucosidase and α-Amylase Activities: An in Vitro Study.” *Toxicology and Industrial Health* 28 (1): 42–50. https://doi.org/10.1177/0748233711403193.

“ENQUETE STEPwise ALGERIE 2016-2017 : MEILLEURE CONNAISSANCE DU PROFIL DE SANTE DES ALGERIENS POUR LES FACTEURS DE RISQUE DES MALADIES NON TRANSMISSIBLES.” n.d. Regional Office for Africa. Accessed May 22, 2021. https://www.afro.who.int/fr/media-centre/events/enquete-stepwise-algerie-2016-2017-meilleure-connaissance-du-profil-de-sante.

Errajraji, A., F. Ouhdouch, and N. El-Anssari. 2010. “Usage des plantes médicinales dans le traitement du diabète de type 2 au Maroc: Use of medicinal plants for type 2 diabetes treatment, in Morocco.” *Médecine des Maladies Métaboliques* 4 (3): 301–4. https://doi.org/10.1016/S1957-2557(10)70064-X.

Etxeberria, Usune, Ana Laura de la Garza, Javier Campión, J. Alfredo Martínez, and Fermín I. Milagro. 2012. “Antidiabetic Effects of Natural Plant Extracts via Inhibition of Carbohydrate Hydrolysis Enzymes with Emphasis on Pancreatic Alpha Amylase.” *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 16 (3): 269–97. https://doi.org/10.1517/14728222.2012.664134.

Fabricant, D S, and N R Farnsworth. 2001. “The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery.” *Environmental Health Perspectives* 109 (Suppl 1): 69–75.

Fagerholm, E., E. Ahlqvist, C. Forsblom, N. Sandholm, A. Syreeni, M. Parkkonen, A. J. McKnight, et al. 2012. “SNP in the Genome-Wide Association Study Hotspot on Chromosome 9p21 Confers Susceptibility to Diabetic Nephropathy in Type 1 Diabetes.” *Diabetologia* 55 (9): 2386–93. https://doi.org/10.1007/s00125-012-2587-0.

Fahy, Eoin, Dawn Cotter, Manish Sud, and Shankar Subramaniam. 2011. “Lipid Classification, Structures and Tools.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1811 (11): 637–47. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.06.009.

Gibbs, E. M., J. L. Stock, S. C. McCoid, H. A. Stukenbrok, J. E. Pessin, R. W. Stevenson, A. J. Milici, and J. D. McNeish. 1995. “Glycemic Improvement in Diabetic Db/Db Mice by Overexpression of the Human Insulin-Regulatable Glucose Transporter (GLUT4).” *The Journal of Clinical Investigation* 95 (4): 1512–18. https://doi.org/10.1172/JCI117823.

Gill, N.S., Supreet Kaur, Rajendra Arora, and Manoj Bali. 2011. “Screening of Antioxidant and Antiulcer Potential of Citrullus Colocynthis Methanolic Seed Extract.” *Research Journal of Phytochemistry* 5 (February): 98–106. https://doi.org/10.3923/rjphyto.2011.98.106.

Göke, B. 2008. “Islet Cell Function: Alpha and Beta Cells--Partners towards Normoglycaemia.” *International Journal of Clinical Practice. Supplement*, no. 159 (March): 2–7. https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2007.01686.x.

Gong, Jing, Ke Fang, Hui Dong, Dingkun Wang, Meilin Hu, and Fuer Lu. 2016. “Effect of Fenugreek on Hyperglycaemia and Hyperlipidemia in Diabetes and Prediabetes: A Meta-Analysis.” *Journal of Ethnopharmacology* 194 (December): 260–68. https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.08.003.

Gonzalez, Eva, and Timothy E. Mcgraw. n.d. *Insulin Signaling Diverges into Akt-Dependent Andindependent Signals to Regulate the Recruitment/Docking and the Fusion of GLUT4 Vesicles to the Plasma Membrane. Molecular Biology of the Cell*.

Governa, Paolo, Giulia Baini, Vittoria Borgonetti, Giulia Cettolin, Daniela Giachetti, Anna Rosa Magnano, Elisabetta Miraldi, and Marco Biagi. 2018. “Phytotherapy in the Management of Diabetes: A Review.” *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry* 23 (1). https://doi.org/10.3390/molecules23010105.

Grussu, Dominic, Derek Stewart, and Gordon J. McDougall. 2011. “Berry Polyphenols Inhibit α-Amylase in Vitro: Identifying Active Components in Rowanberry and Raspberry.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (6): 2324–31. https://doi.org/10.1021/jf1045359.

Guariguata, L., D. R. Whiting, I. Hambleton, J. Beagley, U. Linnenkamp, and J. E. Shaw. 2014. “Global Estimates of Diabetes Prevalence for 2013 and Projections for 2035.” *Diabetes Research and Clinical Practice* 103 (2): 137–49. https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.11.002.

“Gurib-Fakim, A. (2006) Medicinal Plants Traditions of Yesterday and Drugs of Tomorrow. Molecular Aspects of Medicine, 27, 1-93. - References - Scientific Research Publishing.” n.d. Accessed

August 22, 2020. https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1656844.

Gurudeeban, S., and Ramanathan. 2010. “Antidiabetic Effect of Citrullus Colocynthis in Alloxan Induced Diabetic Rats.” *Inventi Rapid: Ethnopharmacology* 1 (March): Inventi:Med Chem/112/10.

Hammarstedt, Ann, Ismail Syed, Archana Vijayakumar, Björn Eliasson, Silvia Gogg, Barbara B. Kahn, and Ulf Smith. 2018. “Adipose Tissue Dysfunction Is Associated with Low Levels of the Novel Palmitic Acid Hydroxystearic Acids.” *Scientific Reports* 8 (1): 15757. https://doi.org/10.1038/s41598-018-34113-3.

Hammiche, Victoria, and Khadra Maiza. 2006. “Traditional Medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N’ajjer.” *Journal of Ethnopharmacology* 105 (3): 358–67. https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.11.028.

Hardie, D. Grahame. 2012. “Organismal Carbohydrate and Lipid Homeostasis.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (5). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006031.

Haseltine, C., M. Rolfsmeier, and P. Blum. 1996. “The Glucose Effect and Regulation of Alpha-Amylase Synthesis in the Hyperthermophilic Archaeon Sulfolobus Solfataricus.” *Journal of Bacteriology* 178 (4): 945–50. https://doi.org/10.1128/jb.178.4.945-950.1996.

Hatam, Natiq A. R., Donald A. Whiting, and Nahia J. Yousif. 1989. “Cucurbitacin Glycosides from Citrullus Colocynthis.” *Phytochemistry* 28 (4): 1268–71. https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80230-4.

Hebbani, Ananda Vardhan, Vaddi Damodara Reddy, and Varadacharyulu Nallanchakravarthula. 2014. “In Vitro Anti-Hemolytic Activity of Terminalia Arjuna (Roxb.) Wt. & Arn. Bark Powder Aqueous Extract.” *Indian Journal of Advances in Chemical Science*, 7.

“Hmamouchi: Bibliographic Research in the Countries... - Google Scholar.” n.d. Accessed May 22, 2021. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Bibliographic%20research%20in%20the%20countries%20of%20the%20Maghreb&journal=Medusa%20Newsletter&volume=2&pages=7-12&publication_year=1998&author=Hmamouchi%2CM.

Holmberg, B., I. Jakobson, and T. Malmfors. 1974. “The Effect of Organic Solvents on Erhtyrocytes during Hypotonic Hemolysis.” *Environmental Research* 7 (2): 193–205. https://doi.org/10.1016/0013-9351(74)90150-9.

Huang, Shaohui, and Michael P. Czech. 2007. “The GLUT4 Glucose Transporter.” *Cell Metabolism* 5 (4): 237–52. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.03.006.

Huseini, H. Fallah, F. Darvishzadeh, R. Heshmat, Z. Jafariazar, Mohsin Raza, and B. Larijani. 2009. “The Clinical Investigation of Citrullus Colocynthis (L.) Schrad Fruit in Treatment of Type II Diabetic Patients: A Randomized, Double Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial.” *Phytotherapy Research* 23 (8): 1186–89. https://doi.org/10.1002/ptr.2754.

Hussain, Hidayat, Ivan R. Green, Muhammad Saleem, Khanzadi F. Khattak, Muhammad Irshad, and Maroof Ali. 2019. “Cucurbitacins as Anticancer Agents: A Patent Review.” *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* 14 (2): 133–43. https://doi.org/10.2174/1574892813666181119123035.

Ismail, Tamer, Mohamed Nassan, Adel Alkhedaide, and Mohamed Soliman. 2016. “Modulation of Aquaporins Expressions and Its Impact on Alleviating Diabetic Complications in Rats: Role of Citrullus Colocynthis.” *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology* 6 (4): 310. https://doi.org/10.5455/njppp.2016.6.23022016131.

Jahromi, Behdad, Iulia Pirvulescu, Kenneth D. Candido, and Nebojsa Nick Knezevic. 2021. “Herbal Medicine for Pain Management: Efficacy and Drug Interactions.” *Pharmaceutics* 13 (2). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020251.

Jameson, J. Larry, Leslie J. De Groot, David Morritz de Kretser, Linda C. Giudice, Ashely B. Grossman, Shlomo Melmed, John T. Potts Jr, and Gordon C. Weir. 2016. *Endocrinology: Adult & Pediatric*. Elsevier. https://research.monash.edu/en/publications/endocrinology-adult-amp-pediatric.

Jayaprakasam, Bolleddula, Navindra P. Seeram, and Muraleedharan G. Nair. 2003. “Anticancer and Antiinflammatory Activities of Cucurbitacins from Cucurbita Andreana.” *Cancer Letters* 189 (1): 11–16. https://doi.org/10.1016/s0304-3835(02)00497-4.

Jenkins, Alicia J., Mugdha V. Joglekar, Anandwardhan A. Hardikar, Anthony C. Keech, David N. O’Neal, and Andrzej S. Januszewski. 2015. “Biomarkers in Diabetic Retinopathy.” *The Review of Diabetic Studies : RDS* 12 (1–2): 159–95. https://doi.org/10.1900/RDS.2015.12.159.

Jewell, Jenna. 2010. “Regulation of Exocytosis by Syntaxin 4-Munc18c Complexes,” January.

Jia, Shuo, Mingyue Shen, Fan Zhang, and Jianhua Xie. 2017. “Recent Advances in Momordica Charantia: Functional Components and Biological Activities.” *International Journal of Molecular Sciences* 18 (12): E2555. https://doi.org/10.3390/ijms18122555.

Jiang, Guoqiang, and Bei B. Zhang. 2003. “Glucagon and Regulation of Glucose Metabolism.” *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 284 (4): E671-678. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00492.2002.

Johnston, Rhona, Olalekan Uthman, Ewen Cummins, Christine Clar, Pamela Royle, Jill Colquitt, Bee Kang Tan, et al. 2017. “Canagliflozin, Dapagliflozin and Empagliflozin Monotherapy for Treating Type 2 Diabetes: Systematic Review and Economic Evaluation.” *Health Technology Assessment (Winchester, England)* 21 (2): 1–218. https://doi.org/10.3310/hta21020.

Kaestner, K. H., R. J. Christy, J. C. McLenithan, L. T. Braiterman, P. Cornelius, P. H. Pekala, and M. D. Lane. 1989. “Sequence, Tissue Distribution, and Differential Expression of MRNA for a Putative Insulin-Responsive Glucose Transporter in Mouse 3T3-L1 Adipocytes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (9): 3150–54. https://doi.org/10.1073/pnas.86.9.3150.

Kajaria, Divya, Ranjana, Jyotishankar Tripathi, Yamini Bhushan Tripathi, and Srikant Tiwari. 2013. “In-Vitro α Amylase and Glycosidase Inhibitory Effect of Ethanolic Extract of Antiasthmatic Drug — Shirishadi.” *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 4 (4): 206–9. https://doi.org/10.4103/2231-4040.121415.

Kalva, Sireesha, and Nishat Fatima. n.d. “Insulinomimetic Effect of Citrullus Colocynthis Roots in STZ Challenged Rat Model,” 18.

Kanchanapoom, Tripetch, Ryoji Kasai, and Kazuo Yamasaki. 2002. “Cucurbitane, Hexanorcucurbitane and Octanorcucurbitane Glycosides from Fruits of Trichosanthes Tricuspidata.” *Phytochemistry* 59 (2): 215–28. https://doi.org/10.1016/s0031-9422(01)00430-7.

Kane, Susan, Hiroyuki Sano, Simon C. H. Liu, John M. Asara, William S. Lane, Charles C. Garner, and Gustav E. Lienhard. 2002. “A Method to Identify Serine Kinase Substrates: Akt PHOSPHORYLATES A NOVEL ADIPOCYTE PROTEIN WITH A Rab GTPASE-ACTIVATING PROTEIN (GAP) DOMAIN*.” *Journal of Biological Chemistry* 277 (25): 22115–18. https://doi.org/10.1074/jbc.C200198200.

Karásek, David. 2020. “Pioglitazone.” *Vnitrni Lekarstvi* 66 (2): 121–25.

Kaushik, Ujjwal, Vidhu Aeri, and Showkat R. Mir. 2015. “Cucurbitacins – An Insight into Medicinal Leads from Nature.” *Pharmacognosy Reviews* 9 (17): 12–18. https://doi.org/10.4103/0973-7847.156314.

Kayali, Ayse G., Jens Eichhorn, Tetsuro Haruta, Aaron J. Morris, James G. Nelson, Peter Vollenweider, Jerrold M. Olefsky, and Nicholas J. G. Webster. 1998. “Association of the

Insulin Receptor with Phospholipase C-γ (PLCγ) in 3T3-L1 Adipocytes Suggests a Role for PLCγ in Metabolic Signaling by Insulin*." *Journal of Biological Chemistry* 273 (22): 13808–18. https://doi.org/10.1074/jbc.273.22.13808.

Khalil. 2010. "The Effect of *Citrullus Colocynthis* Pulp Extract on the Liver of Diabetic Rats a Light and Scanning Electron Microscopic Study." *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 6 (3): 155–63. https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2010.155.163.

Khan, A. H., and J. E. Pessin. 2002. "Insulin Regulation of Glucose Uptake: A Complex Interplay of Intracellular Signalling Pathways." *Diabetologia* 45 (11): 1475–83. https://doi.org/10.1007/s00125-002-0974-7.

Klip, Amira, Timothy E. McGraw, and David E. James. 2019. "Thirty Sweet Years of GLUT4." *The Journal of Biological Chemistry* 294 (30): 11369–81. https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.008351.

KOMAKI, Eriko, Shinya YAMAGUCHI, Isafumi MARU, Mitsuhiro Kinoshita, Kazuaki KAKEHI, Yasuhiro OHTA, and Yoji TSUKADA. 2003. "Identification of Anti.ALPHA.Amylase Components from Olive Leaf Extracts." *Food Science and Technology Research - FOOD SCI TECHNOL RES* 9 (February): 35–39. https://doi.org/10.3136/fstr.9.35.

Kooti, Wesam, Maryam Farokhipour, Zahra Asadzadeh, Damoon Ashtary-Larky, and Majid Asadi-Samani. 2016. "The Role of Medicinal Plants in the Treatment of Diabetes: A Systematic Review." *Electronic Physician* 8 (1): 1832–42. https://doi.org/10.19082/1832.

Kotani, K., A. J. Carozzi, H. Sakaue, K. Hara, L. J. Robinson, S. F. Clark, K. Yonezawa, D. E. James, and M. Kasuga. 1995. "Requirement for Phosphoinositide 3-Kinase in Insulin-Stimulated GLUT4 Translocation in 3T3-L1 Adipocytes." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 209 (1): 343–48. https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1509.

Kumar, Sunil, Dinesh Kumar, null Manjusha, Kamal Saroha, Nidhan Singh, and Bhoodev Vashishta. 2008. "Antioxidant and Free Radical Scavenging Potential of Citrullus Colocynthis (L.) Schrad. Methanolic Fruit Extract." *Acta Pharmaceutica (Zagreb, Croatia)* 58 (2): 215–20. https://doi.org/10.2478/v10007-008-0008-1.

Kupriyanova, Tatyana A., and Konstantin V. Kandror. 1999. "Akt-2 Binds to Glut4-Containing Vesicles and Phosphorylates Their Component Proteins in Response to Insulin*." *Journal of Biological Chemistry* 274 (3): 1458–64. https://doi.org/10.1074/jbc.274.3.1458.

Kuriki, T., and T. Imanaka. 1999. "The Concept of the Alpha-Amylase Family: Structural Similarity and Common Catalytic Mechanism." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87 (5): 557–65. https://doi.org/10.1016/s1389-1723(99)80114-5.

Lahfa, F. B., R. Azzi, D. Mezouar, and R. Djaziri. 2017. “Hypoglycemic Effect of Citrullus Colocynthis Extracts.” *Phytothérapie* 15 (2): 50–56. https://doi.org/10.1007/s10298-015-0997-4.

Lakshmi, B., V. Sendrayaperumal, and S. Subramanian. 2013. “Beneficial Effects of Citrullus Colocynthis Seeds Extract Studied in Alloxan-Induced Diabetic Rats.” *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 19 (March): 47–55.

Levine, R., M. S. Goldstein, B. Huddlestun, and S. P. Klein. 1950. “Action of Insulin on the ‘permeability’ of Cells to Free Hexoses, as Studied by Its Effect on the Distribution of Galactose.” *The American Journal of Physiology* 163 (1): 70–76. https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1950.163.1.70.

Li, Guo-Xiang, and Zai-Qun Liu. 2008. “The Protective Effects of Ginsenosides on Human Erythrocytes against Hemin-Induced Hemolysis.” *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 46 (3): 886–92. https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.10.020.

Lyssenko, Valeriya, Peter Almgren, Dragi Anevski, Roland Perfekt, Kaj Lahti, Michael Nissén, Bo Isomaa, et al. 2005. “Predictors of and Longitudinal Changes in Insulin Sensitivity and Secretion Preceding Onset of Type 2 Diabetes.” *Diabetes* 54 (1): 166–74. https://doi.org/10.2337/diabetes.54.1.166.

Lyssenko, Valeriya, and Leif Groop. 2009. “Genome-Wide Association Study for Type 2 Diabetes: Clinical Applications.” *Current Opinion in Lipidology* 20 (2): 87–91. https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e32832923af.

Mahomoodally, Mohamad Fawzi, Kheemy Protab, and Muhammad Zakariyyah Aumeeruddy. 2019. “Medicinal Plants Brought by Indian Indentured Immigrants: A Comparative Review of Ethnopharmacological Uses between Mauritius and India.” *Journal of Ethnopharmacology* 234 (April): 245–89. https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.01.012.

Marc, David-Muller. 2003. “LE GLOBULE ROUGE ET SA PATHOLOGIE,” 26.

Marchand, A., R. S. Galen, and F. Van Lente. 1980. “The Predictive Value of Serum Haptoglobin in Hemolytic Disease.” *JAMA* 243 (19): 1909–11.

Marrelli, Mariangela, Valentina Amodeo, Giancarlo Statti, and Filomena Conforti. 2018. “Biological Properties and Bioactive Components of Allium Cepa L.: Focus on Potential Benefits in the Treatment of Obesity and Related Comorbidities.” *Molecules (Basel, Switzerland)* 24 (1): E119. https://doi.org/10.3390/molecules24010119.

Marzouk, B., Z. Marzouk, N. Fenina, A. Bouraoui, and M. Aouni. 2011. “Anti-Inflammatory and

Analgesic Activities of Tunisian Citrullus Colocynthis Schrad. Immature Fruit and Seed Organic Extracts." *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 15 (6): 665–72.

Marzouk, Belsem, Ehsen Haloui, Najoua Akremi, Mahjoub Aouni, Zohra Marzouk, and Nadia Fenina. 2012. "Antimicrobial and Anticoagulant Activities of Citrullus Colocynthis Schrad. Leaves from Tunisia (Medenine)." *Afr. J. Pharm. Pharmacol* 6 (January).

Marzouk, Belsem, Zohra Marzouk, Rachel Décor, Hayet Edziri, Ehsen Haloui, Nadia Fenina, and Mahjoub Aouni. 2009. "Antibacterial and Anticandidal Screening of Tunisian Citrullus Colocynthis Schrad. from Medenine." *Journal of Ethnopharmacology* 125 (2): 344–49. https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.025.

Marzouk, Belsem, Zohra Marzouk, Ehsen Haloui, Nadia Fenina, Abderrahman Bouraoui, and Mahjoub Aouni. 2010. "Screening of Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Citrullus Colocynthis from Southern Tunisia." *Journal of Ethnopharmacology* 128 (1): 15–19. https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.11.027.

McGee, Sean L., and Mark Hargreaves. 2004. "Exercise and Myocyte Enhancer Factor 2 Regulation in Human Skeletal Muscle." *Diabetes* 53 (5): 1208–14. https://doi.org/10.2337/diabetes.53.5.1208.

MHHB Asad. 2012. "Antihaemorrhagic Potential of Citrullus Colocynthis Schrad (Cucurbitaceae) against Naja Naja Karachiensis (Black Pakistan Cobra) Venom." *Journal of Medicinal Plants Research* 6 (18). https://doi.org/10.5897/JMPR12.048.

Ministerrådet, Nordiska. 2006. *Cucurbitacins in Plant Food.* Copenhagen: Nordiska ministerrådets förlag. http://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=3382843.

Monnier, Catherine, and Pierre Potier. 2002. *Les Plantes médicinales : Vertus et traditions*. Toulouse: Privat.

Moraes-Vieira, Pedro M., Alan Saghatelian, and Barbara B. Kahn. 2016. "GLUT4 Expression in Adipocytes Regulates De Novo Lipogenesis and Levels of a Novel Class of Lipids With Antidiabetic and Anti-Inflammatory Effects." *Diabetes* 65 (7): 1808–15. https://doi.org/10.2337/db16-0221.

Najafi, Shahla, Nima Sanadgol, Batool Sadeghi-Nejad, Maryam Beiragi, and Ehsan Sanadgol. 2010. "Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of Citrullus Colocynthis (Linn.) Schrad against Staphylococcus Aureus." *Journal of Medicinal Plants* 4 (November): 2321–25.

Nathan, David M., John B. Buse, Mayer B. Davidson, Ele Ferrannini, Rury R. Holman, Robert

Sherwin, and Bernard Zinman. 2009. “Medical Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Consensus Algorithm for the Initiation and Adjustment of Therapy: A Consensus Statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes.” *Diabetes Care* 32 (1): 193–203. https://doi.org/10.2337/dc08-9025.

Nayab, Durey, Shagufta Perveen, Zaheer Ahmed, and Abdul Malik. 2010. “ChemInform Abstract: New Pentacyclic Cucurbitane Glucosides from the Fruits of Citrullus Colocynthis Schrad.” *ChemInform* 41 (October). https://doi.org/10.1002/chin.201041190.

Ng, Yvonne, Georg Ramm, Jamie A. Lopez, and David E. James. 2008. “Rapid Activation of Akt2 Is Sufficient to Stimulate GLUT4 Translocation in 3T3-L1 Adipocytes.” *Cell Metabolism* 7 (4): 348–56. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.02.008.

Nmila, R., R. Gross, H. Rchid, M. Roye, M. Manteghetti, P. Petit, M. Tijane, G. Ribes, and Y. Sauvaire. 2000. “Insulinotropic Effect of Citrullus Colocynthis Fruit Extracts.” *Planta Medica* 66 (5): 418–23. https://doi.org/10.1055/s-2000-8586.

Norseen, Julie, Tetsuya Hosooka, Ann Hammarstedt, Mark M. Yore, Shashi Kant, Pratik Aryal, Urban A. Kiernan, et al. 2012. “Retinol-Binding Protein 4 Inhibits Insulin Signaling in Adipocytes by Inducing Proinflammatory Cytokines in Macrophages through a c-Jun N-Terminal Kinase- and Toll-like Receptor 4-Dependent and Retinol-Independent Mechanism.” *Molecular and Cellular Biology* 32 (10): 2010–19. https://doi.org/10.1128/MCB.06193-11.

Oresic, Matej, Virve A. Hänninen, and Antonio Vidal-Puig. 2008. “Lipidomics: A New Window to Biomedical Frontiers.” *Trends in Biotechnology* 26 (12): 647–52. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.09.001.

Oryan, Ahmad, Mohammad Hashemnia, Ahmad-Reza Hamidi, and Adel Mohammadalipour. 2014. “Effects of Hydro-Ethanol Extract of Citrullus Colocynthis on Blood Glucose Levels and Pathology of Organs in Alloxan-Induced Diabetic Rats.” *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4 (2): 125–30. https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60328-5.

Ostovar, Mohadeseh, Abolfazl Akbari, Mohammad Hossein Anbardar, Aida Iraji, Mohsen Salmanpour, Salar Hafez Ghoran, Mojtaba Heydari, and Mesbah Shams. 2020. “Effects of Citrullus Colocynthis L. in a Rat Model of Diabetic Neuropathy.” *Journal of Integrative Medicine* 18 (1): 59–67. https://doi.org/10.1016/j.joim.2019.12.002.

Ota, Ajda, and Nataša P. Ulrih. 2017. “An Overview of Herbal Products and Secondary Metabolites Used for Management of Type Two Diabetes.” *Frontiers in Pharmacology* 8: 436. https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00436.

Ozcan, Oguzhan, Alparslan Karakas, and Dogan Yucel. 2012. “Effects of Hemolysis on the Assays

of Serum CK, CK-MB Activities and CK-MB (MASS), Troponin and Myoglobin Measurments." *Turkish Journal of Biochemistry* 37 (January): 375–85. https://doi.org/10.5505/tjb.2012.21043.

Patil, Shashank M., Prithvi S. Shirahatti, and Ramith Ramu. 2021. "Azadirachta Indica A. Juss (Neem) against Diabetes Mellitus: A Critical Review on Its Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology." *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, September, rgab098. https://doi.org/10.1093/jpp/rgab098.

Patterson, C. C., E. Gyürüs, J. Rosenbauer, O. Cinek, A. Neu, E. Schober, R. C. Parslow, et al. 2012. "Trends in Childhood Type 1 Diabetes Incidence in Europe during 1989-2008: Evidence of Non-Uniformity over Time in Rates of Increase." *Diabetologia* 55 (8): 2142–47. https://doi.org/10.1007/s00125-012-2571-8.

Piccoli, Giorgina B., Giorgio Grassi, Gianfranca Cabiddu, Marta Nazha, Simona Roggero, Irene Capizzi, Agostino De Pascale, et al. 2015. "Diabetic Kidney Disease: A Syndrome Rather Than a Single Disease." *The Review of Diabetic Studies : RDS* 12 (1–2): 87–109. https://doi.org/10.1900/RDS.2015.12.87.

Pihoker, Catherine, Lisa K. Gilliam, Sian Ellard, Dana Dabelea, Cralen Davis, Lawrence M. Dolan, Carla J. Greenbaum, et al. 2013. "Prevalence, Characteristics and Clinical Diagnosis of Maturity Onset Diabetes of the Young Due to Mutations in HNF1A, HNF4A, and Glucokinase: Results from the SEARCH for Diabetes in Youth." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98 (10): 4055–62. https://doi.org/10.1210/jc.2013-1279.

"Plantes Thérapeutiques WICHTL Max, ANTON Robert." n.d. Accessed August 22, 2020. https://www.lavoisier.fr/livre/sciences-de-la-vie/plantes-therapeutiques-2-ed/wichtl/descriptif-9782743006310.

Popa, Simona, and Maria Mota. 2013. "Beta-Cell Function and Failure in Type 2 Diabetes." *Type 2 Diabetes*, June. https://doi.org/10.5772/56467.

Posadzki, Paul, Leala K. Watson, Amani Alotaibi, and Edzard Ernst. 2013. "Prevalence of Use of Complementary and Alternative Medicine (CAM) by Patients/Consumers in the UK: Systematic Review of Surveys." *Clinical Medicine (London, England)* 13 (2): 126–31. https://doi.org/10.7861/clinmedicine.13-2-126.

Posner, Barry I. 2017. "Insulin Signalling: The Inside Story." *Canadian Journal of Diabetes* 41 (1): 108–13. https://doi.org/10.1016/j.jcjd.2016.07.002.

Powers, Alvin C., and David D'Alessio. 2017. "Endocrine Pancreas and Pharmacotherapy of Diabetes Mellitus and Hypoglycemia." In *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis*

of Therapeutics, edited by Laurence L. Brunton, Randa Hilal-Dandan, and Björn C. Knollmann, 13th ed. New York, NY: McGraw-Hill Education. accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1162542616.

Quideau, Stéphane, Denis Deffieux, Céline Douat-Casassus, and Laurent Pouységu. 2011. "Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis." *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 50 (3): 586–621. https://doi.org/10.1002/anie.201000044.

Qureshi, Rahmatullah, Ghulamraza Bhatti, And Rabia, and Rabia Memon. 2010. "Ethnomedicinal Uses of Herbs from Northern Part of NARA Desert, Pakistan." *Pakistan Journal of Botany* 42 (April): 839–51.

Rahbar, A. R., and I. Nabipour. 2010. "The Hypolipidemic Effect of Citrullus Colocynthis on Patients with Hyperlipidemia." *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS* 13 (24): 1202–7. https://doi.org/10.3923/pjbs.2010.1202.1207.

Rahier, J., Y. Guiot, R. M. Goebbels, C. Sempoux, and J. C. Henquin. 2008. "Pancreatic Beta-Cell Mass in European Subjects with Type 2 Diabetes." *Diabetes, Obesity & Metabolism* 10 Suppl 4 (November): 32–42. https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2008.00969.x.

Rahimzadeh, Mahsa, Samaneh Jahanshahi, Soheila Moein, and Mahmood Reza Moein. 2014. "Evaluation of Alpha- Amylase Inhibition by Urtica Dioica and Juglans Regia Extracts." *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 17 (6): 465–69.

Rajamanickam, E., Gurudeeban Selvaraj, Ramanathan, and Satyavani Kaliamurthi. 2010. "Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of Citrullus Colocynthis." *International Journal of Current Research* 2 (January): 078–081.

Rajangam, Jayaram, A. Shivakumar, T. Anitha, Vishal Joshi, and Narahari Narayan Palei. 2009. "Antidiabetic Effect of Petroleum Ether Extract of Citrullus Colocynthis Fruits against Streptozotocin-Induced Hyperglycemic Rats." *Romjbiol-Plant Biol* 54 (January): 127–34.

Ramzi, Samar, and A. Sahragard. 2013. "A Lectin Extracted from Citrullus Colocynthis L. (Cucurbitaceae) Inhibits Digestive α-Amylase of Ectomyelois Ceratoniae Zeller (Lepidoptera: Pyralidae)." *Journal of Entomological and Acarological Research* 45 (December): 20. https://doi.org/10.4081/jear.2013.e20.

Rayego-Mateos, Sandra, José Luis Morgado-Pascual, Lucas Opazo-Ríos, Melania Guerrero-Hue, Cristina García-Caballero, Cristina Vázquez-Carballo, Sebastián Mas, et al. 2020. "Pathogenic Pathways and Therapeutic Approaches Targeting Inflammation in Diabetic Nephropathy." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (11): 3798. https://doi.org/10.3390/ijms21113798.

Ríos, José Luis, Flavio Francini, and Guillermo R. Schinella. 2015. “Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus.” *Planta Medica* 81 (12–13): 975–94. https://doi.org/10.1055/s-0035-1546131.

Sahidul Ali, Mir, Souvik Mukherjee, Subhajit Makar, and Gargi Pal. 2019. “Cucurbitacins a Vibrant Triterpenoid: A Review on Its Anticancer Property” 7 (February): 2347–7881. https://doi.org/10.29161/PT.v7.i2.2019.43.

Sakamoto, Kei, and Geoffrey D. Holman. 2008. “Emerging Role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the Regulation of GLUT4 Traffic.” *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 295 (1): E29–37. https://doi.org/10.1152/ajpendo.90331.2008.

Salhi, Souad, Mohamed Fadli, Lahcen Zidane, and Allal Douira. 2010. “Etudes floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc).” *Lazaroa* 31: 133–43. https://doi.org/10.5209/rev_LAZA.2010.v31.9.

Santos, Heitor O., and Guilherme A. R. da Silva. 2018. “To What Extent Does Cinnamon Administration Improve the Glycemic and Lipid Profiles?” *Clinical Nutrition ESPEN* 27 (October): 1–9. https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2018.07.011.

Sari-Hassoun, Meryem, Marie-Jeanne Clement, Imane Hamdi, Guillaume Bollot, Cyril Bauvais, Vandana Joshi, Flavio Toma, et al. 2016. “Cucurbitacin I Elicits the Formation of Actin/Phospho-Myosin II Co-Aggregates by Stimulation of the RhoA/ROCK Pathway and Inhibition of LIM-Kinase.” *Biochemical Pharmacology* 102 (February): 45–63. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.12.013.

Sayem, Abu Sadat Md, Aditya Arya, Hamed Karimian, Narendiran Krishnasamy, Ameya Ashok Hasamnis, and Chowdhury Faiz Hossain. 2018. “Action of Phytochemicals on Insulin Signaling Pathways Accelerating Glucose Transporter (GLUT4) Protein Translocation.” *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry* 23 (2). https://doi.org/10.3390/molecules23020258.

Schempp, Cm, E Schöpf, and E Simon. 2002. “Plant-Induced Toxic and Allergic Dermatitis (Phytodermatitis).” *Der Hautarzt; Zeitschrift Fur Dermatologie, Venerologie, Und Verwandte Gebiete* 53 (2): 93–97. https://doi.org/10.1007/s001050100212.

Scott, Lesley J. 2017. “Sitagliptin: A Review in Type 2 Diabetes.” *Drugs* 77 (2): 209–24. https://doi.org/10.1007/s40265-016-0686-9.

Sebbagh, N., C. Cruciani-Guglielmacci, F. Ouali, M.-F. Berthault, C. Rouch, D. Chabane Sari, and C. Magnan. 2009. “Comparative Effects of Citrullus Colocynthis, Sunflower and Olive Oil-Enriched Diet in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats.” *Diabetes & Metabolism* 35 (3):

178–84. https://doi.org/10.1016/j.diabet.2008.10.005.

Seger, Christoph, Sonja Sturm, Maria-Elisabeth Mair, Ernst P. Ellmerer, and Hermann Stuppner. 2005. “1H and 13C NMR Signal Assignment of Cucurbitacin Derivatives from Citrullus Colocynthis (L.) Schrader and Ecballium Elaterium L. (Cucurbitaceae).” *Magnetic Resonance in Chemistry: MRC* 43 (6): 489–91. https://doi.org/10.1002/mrc.1570.

Selvaraj, Gurudeeban, Satyavani Kaliamurthi, and Ramanathan. 2010. “Bitter Apple (Citrullus Colocynthis): An Overview of Chemical Composition and Biomedical Potentials.” *Asian Journal of Plant Science* 9 (July): 394–401. https://doi.org/10.3923/ajps.2010.394.401.

Shahin-Kaleybar, Behzad, Ali Niazi, Alireza Afsharifar, Ghorbanali Nematzadeh, Reza Yousefi, Bernhard Retzl, Roland Hellinger, Edin Muratspahić, and Christian W. Gruber. 2020. “Isolation of Cysteine-Rich Peptides from Citrullus Colocynthis.” *Biomolecules* 10 (9). https://doi.org/10.3390/biom10091326.

Shanmugam, Shobana, YN Sreerama, and Nagappa Malleshi. 2009. “Composition and Enzyme Inhibitory Properties of Finger Millet (Eleusine Coracana L.) Seed Coat Phenolics: Mode of Inhibition of ??-Glucosidase and Pancreatic Amylase.” *Food Chemistry* 115 (August): 1268–73. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.042.

Shepherd, P. R., and B. B. Kahn. 1999. “Glucose Transporters and Insulin Action--Implications for Insulin Resistance and Diabetes Mellitus.” *The New England Journal of Medicine* 341 (4): 248–57. https://doi.org/10.1056/NEJM199907223410406.

Shi, Chenghe, Sabiha Karim, Chunyong Wang, Mingjing Zhao, and Ghulam Murtaza. 2014. “A Review on Antidiabetic Activity of Citrullus Colocynthis Schrad.” *Acta Poloniae Pharmaceutica* 71 (3): 363–67.

Shishtar, Esra’, Elena Jovanovski, Alexandra Jenkins, and Vladimir Vuksan. 2014. “Effects of Korean White Ginseng (Panax Ginseng C.A. Meyer) on Vascular and Glycemic Health in Type 2 Diabetes: Results of a Randomized, Double Blind, Placebo-Controlled, Multiple-Crossover, Acute Dose Escalation Trial.” *Clinical Nutrition Research* 3 (2): 89–97. https://doi.org/10.7762/cnr.2014.3.2.89.

Sukant, Garg Sunil. 2017. “Cucurbitacin B and Cancer Intervention: Chemistry, Biology and Mechanisms (Review).” 2017. https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2017.4203.

Tabatabaei-Malazy, Ozra, Amir Ramezani, Rasha Atlasi, Bagher Larijani, and Mohammad Abdollahi. 2016. “Scientometric Study of Academic Publications on Antioxidative Herbal Medicines in Type 2 Diabetes Mellitus.” *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders* 15 (October).

https://doi.org/10.1186/s40200-016-0273-3.

Tahraoui, A., J. El-Hilaly, Z. H. Israili, and B. Lyoussi. 2007. “Ethnopharmacological Survey of Plants Used in the Traditional Treatment of Hypertension and Diabetes in South-Eastern Morocco (Errachidia Province).” *Journal of Ethnopharmacology* 110 (1): 105–17. https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.011.

Talchai, Chutima, Shouhong Xuan, Hua V. Lin, Lori Sussel, and Domenico Accili. 2012. “Pancreatic β-Cell Dedifferentiation As Mechanism Of Diabetic β-Cell Failure.” *Cell* 150 (6): 1223–34. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.029.

Taylor, Simeon I., Zhinous Shahidzadeh Yazdi, and Amber L. Beitelshees. 2021. “Pharmacological Treatment of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes.” *The Journal of Clinical Investigation* 131 (2): 142243. https://doi.org/10.1172/JCI142243.

Tiwari, Pragya, Khurshid Ahmad, and Mohammad Hassan Baig. 2017. “Gymnema Sylvestre for Diabetes: From Traditional Herb to Future’s Therapeutic.” *Current Pharmaceutical Design* 23 (11): 1667–76. https://doi.org/10.2174/1381612823666161108162048.

Tsujita, Takahiro. 2016. “Persimmon-Tannin, an α-Amylase Inhibitor, Retards Carbohydrate Absorption in Rats.” *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 62 (3): 192–97. https://doi.org/10.3177/jnsv.62.192.

Tundis, R., M. R. Loizzo, and F. Menichini. 2010. “Natural Products as Alpha-Amylase and Alpha-Glucosidase Inhibitors and Their Hypoglycaemic Potential in the Treatment of Diabetes: An Update.” *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 10 (4): 315–31. https://doi.org/10.2174/138955710791331007.

Ul Haq, Faraz, Arslan Ali, Muhammad Noman Khan, Syed Muhammad Zaki Shah, Ram Chandra Kandel, Nudrat Aziz, Achyut Adhikari, et al. 2019. “Metabolite Profiling and Quantitation of Cucurbitacins in Cucurbitaceae Plants by Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry.” *Scientific Reports* 9 (1): 15992. https://doi.org/10.1038/s41598-019-52404-1.

Van Buren, Tyler, Gilad Arwatz, and Alexander J. Smits. 2020. “A Simple Method to Monitor Hemolysis in Real Time.” *Scientific Reports* 10 (1): 5101. https://doi.org/10.1038/s41598-020-62041-8.

Vargas, Elizabeth, Vivek Podder, and Maria Alicia Carrillo Sepulveda. 2020. “Physiology, Glucose Transporter Type 4 (GLUT4).” In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537322/.

Yang, Qin, Timothy E. Graham, Nimesh Mody, Frederic Preitner, Odile D. Peroni, Janice M.

Zabolotny, Ko Kotani, Loredana Quadro, and Barbara B. Kahn. 2005. “Serum Retinol Binding Protein 4 Contributes to Insulin Resistance in Obesity and Type 2 Diabetes.” *Nature* 436 (7049): 356–62. https://doi.org/10.1038/nature03711.

Yaniv, Zohara, Ella Shabelsky, and Dan Schafferman. 1999. “Colocynth: Potential Arid Land Oilseed from an Ancient Cucurbit,” January.

Yazit, S. M., S. Nemmiche, F. Amamou, R. K. Meziane, and D. Chabane-Sari. 2020. “Anti-Hyperlipidemic Effect of Fatty Acids Methyl Esters (FAMEs) of Citrullus Colocynthis in High-Fat Diet Induced Obesity in Rats.” *Phytothérapie* 18 (3–4): 131–39. https://doi.org/10.3166/phyto-2018-0101.

Zaini, Nurul Aqilah Mohd, Farooq Anwar, Azizah Abdul Hamid, and Nazamid Saari. 2011. “Kundur [Benincasa Hispida (Thunb.) Cogn.]: A Potential Source for Valuable Nutrients and Functional Foods.” *Food Research International*, Exotic Fruits: their Composition, Nutraceutical and Agroindustrial Potential, 44 (7): 2368–76. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.024.

Zheng, Min-Si, Yu-Shuang Liu, Tao Yuan, Li-Ya Liu, Zhi-Yong Li, and Xiu-Lan Huang. 2020. “[Research progress on chemical constituents of Citrullus colocynthis and their pharmacological effects].” *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi = Zhongguo Zhongyao Zazhi = China Journal of Chinese Materia Medica* 45 (4): 816–24. https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20191104.201.

Zhou, Yan-Xi, Ruo-Qi Zhang, Khalid Rahman, Zhi-Xing Cao, Hong Zhang, and Cheng Peng. 2019. “Diverse Pharmacological Activities and Potential Medicinal Benefits of Geniposide.” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM* 2019: 4925682. https://doi.org/10.1155/2019/4925682.

Zibaee, Arash, Bita Valizadeh, and Jalal Jalali sendi. 2013. “Inhibition of Digestive α-Amylases from Chilo Suppressalis Walker (Lepidoptera: Crambidae) by a Proteinaceous Extract of Citrullus Colocynthis L. (Cucurbitaceae).” *Journal of Plant Protection Research* 53 (July): 195–202. https://doi.org/10.2478/jppr-2013-0030.

Annexe

Matériel et méthode- Effet de Citrullus colocynthis sur la translocation GLUT4

1. Matériel biologique

Les fibroblastes murins 3T3-L1 sont obtenus auprès de l'American Type Culture collection ATCC/LGC Standards (Teddington, Royaume-Uni), et les cellules Plat-E, permettant la synthèse des rétrovirus, sont proviennent du Dr Toshi Kitamura (Université de Tokyo, Japon). Les fibroblastes 3T3-L1 exprimant HA-GLUT4 et HA-RTf ont déjà été décrits précédemment [18]. Les milieux de culture et l'Hepes sont fournis par Invitrogen (Cergy Pontoise, France), l'insuline par Lilly (Suresnes, France), le sérum fœtal bovin par PAA (Les Mureaux, France). La biotine, la dexaméthasone, l'IBMX (isobuthylméthylxanthine), l'anticorps irrelevant ainsi que les produits chimiques sont obtenus chez Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France), la rosiglitazone chez Enzo Life Sciences (Villeurbanne, France). L'anticorps monoclonal de souris anti-HA, reconnaissant l'épitope YPYDVPDYA de l'hémagglutinine de l'Influenza, est fourni par Covance (Emeryville, CA, Etats-Unis). L'anticorps anti-CD4 est fourni par Serotec, l'anticorps anti-GLUT4 a été développé chez le lapin dans notre laboratoire et est dirigé contre la partie intracellulaire de GLUT4 [19]. Les anticorps fluorescents proviennent de Molecular Probes/Invitrogen (Carlsbad, CA, Etats-Unis). L'ADN polymérase Phusion, les enzymes de restriction, ainsi que la T4 DNA ligase sont fournis par New England Biolabs (NEB). Les amorces pour PCR et l'échelle d'ADN Smart ladder sont fournies par Eurogentec, et les kits de purification des produits PCR par Macherey-Nagel. Les kits de purification des plasmides, ainsi que la T4 DNA ligase et la phosphatase alcaline sont fournis par Roche, et le X-Treme Gene par Roche Diagnostics. Le vecteur pBabe, plasmide portant les gènes de résistance à l'ampicilline et à la puromycine ou à la néomycine (G418), provient du Dr Hartmut Land (Université de Rochester, Rochester, NY, Etats-Unis). Enfin, le conjugué humTf-HRP ainsi que l'anticorps anti-HRP sont fournis par Jackson Immuno Research.

2. Les adipocytes 3T3-L1

Les cellules utilisées sont des fibroblastes issus d'embryons murins. Elles proviennent d'une lignée cellulaire 3T3-L1 obtenue l'American Type Culture collection ATCC/LGC Standards (Teddington, Royaume-Uni). Ces fibroblastes sont capables de se différencier spontanément en adipocytes, c'est pourquoi ils sont aussi appelés pré-adipocytes. Cette différenciation spontanée concerne 5% des cellules au bout de 6 jours et plus de 60% à 28 jours. Les fibroblastes sont des cellules polygonales qui adhèrent au fond des boîtes de culture et forment un tapis cellulaire monocouche et jointif à confluence. Lorsque la confluence est atteinte, la différenciation en adipocytes peut être stimulée. Les adipocytes sont caractérisés par la formation de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme et la forme arrondie des cellules. Deux jours après la fin de la stimulation de la différenciation, 50% des cellules présentent une à deux gouttelettes lipidiques et, huit jours plus tard, 80% des cellules présentent cinq à dix gouttelettes lipidiques.

3. Transfection des cellules Plat-E et infection des fibroblastes 3T3-L1

Pendant la transfection et l'infection, les cellules sont incubées dans un milieu sans antibiotique. Les cellules Plat-E sont transfectées avec l'ADNc via le X-treme GENE (formulation liposomale), selon le protocole du fabricant. La solution rétrovirale est récupérée 24h et 48h après la transfection des Plat-E et passée à travers un filtre de 0,45 microns afin d'éliminer d'éventuelles cellules Plat-E. Le virus récupéré à 48h est conservé à -80°C et servira pour créer les lignées cellulaires infectées par 2

plasmides différents. Les fibroblastes 3T3-L1 sont ensuite infectés par le rétrovirus obtenu après 24h à l'aide de polybrene, selon le protocole du fabricant. Les cellules sont ensuite trypsinisées et ensemencées en présence de l'antibiotique de sélection adapté : 2 ug/ml de puromycine ou 250 ug/ml de G418 (néomycine). Pour les lignées cellulaires exprimant 2 protéines exogènes, un second tour d'infection est ensuite réalisé. Ainsi, les fibroblastes 3T3-L1 expriment de façon stable les protéines d'intérêt.

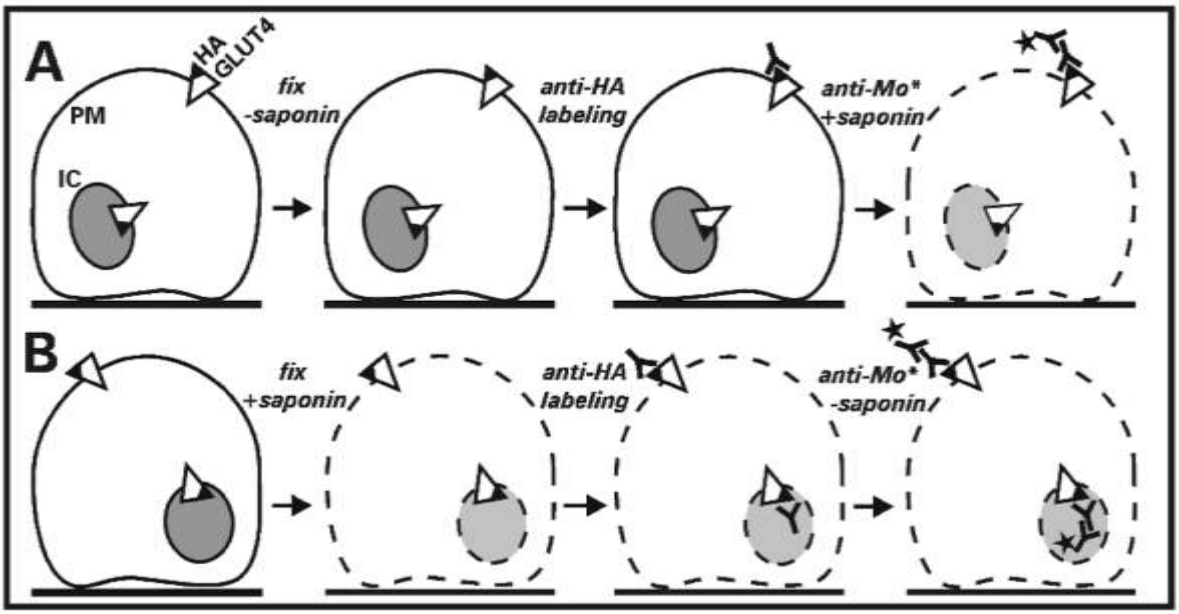


Figure 35. Configuration expérimentale du test de l'état de transition. Les cellules sont cultivées dans des plaques à 96 puits, incubées avec ou sans insuline, fixées et laissées non traitées (A) ou perméabilisées (B). Ensuite, toutes les cellules sont incubées avec l'anticorps anti-HA murin primaire et l'anticorps secondaire antimouse fluorescent par la suite. La fluorescence est mesurée à l'aide d'un lecteur de plaques à puits multiples. Le rapport A: B × 100 donne le pourcentage de HA-GLUT4 à la surface de la cellule. HA, étiquette d'épitope de l'hémagglutinine de la grippe; IC, compartiment intracellulaire; PM, membrane plasmique.

4. Culture cellulaire

Les cellules Plat-E sont incubées à 37°C, à 5% de CO_2 dans du milieu DMEM#61965 contenant 10% de sérum de veau fœtal (décomplémenté 30 minutes à 55°C), 100 unités/ml de pénicilline, 100 ug/ml de streptomycine, 1 ug/ml de puromycine et 10 ug/ml de blasticidine.

Les fibroblastes 3T3-L1 sont ensemencés à 30% ou 50% dans des plaques 96 ou 24 puits préalablement enrobées de gélatine et fixées avec du glutaraldéhyde pour assurer l'adhésion des cellules, et cultivés à 37°C avec 10% de CO_2 dans du milieu DMEM#61965 contenant 10% de sérum de veau fœtal (décomplémenté 30 minutes à 55°C), 100 unités/ml de pénicilline, 100 ug/ml de streptomycine ainsi que les antibiotiques de sélection. Le milieu est renouvelé lorsque les cellules sont confluentes. La différentiation des fibroblastes en adipocytes est lancée 2 jours après la confluence (jour 0) grâce au milieu précédent (sans antibiotique de sélection) auquel on ajoute 0,1 ug/ml de biotine et de dexamethasone, 700 nM d'insuline, 0,5 mM d'IBMX

et 1 uM de rosiglitazone. 72h après ajout du milieu de différentiation (jour +3), le milieu est remplacé par le même que précédemment mais supplémenté avec uniquement 350 nM d'insuline. Le lendemain (J+4), le milieu est changé de la même manière. Ensuite, de J+5 jusqu'à l'expérimentation le milieu est remplacé tous les jours par du milieu sans supplémentation. Les expérimentations ont lieu entre J+9 et J+11 après le lancement de la différenciation. Une heure avant chaque expérience, les cellules sont mises en déplétion, c'est-à-dire privées de sérum par une culture en milieu DMEM contenant le mélange penstrep et 2 g/L de BSA.

5. Techniques de fluorescence

5.1. Mesure du taux de translocation de GLUT4

Le test basé sur la fluorescence pour la détection de GLUT4 à la surface cellulaire a été décrit en détail précédemment (Govers, James et Coster 2008). Les cellules exprimant HA – GLUT4 sont mise en déplétion durant 2h au total : 1h30 avec du DMEM supplémenté de bicarbonate 0,2% BSA et 30 min avec du DMEM sans bicarbonate supplémenté de 20 mM HEPES et 0,2% BSA.

Les adipocytes cultivés dans des plaques à 96 sont incubés pendant 40 minutes à 37°C avec ou sans insuline en l'absence ou en présence d'extraits à à une concentration de 4, 20 ou 100 µg / ml, les extraits ont été préalablement dissous dans du DMSO, toutes les conditions ont été normalisées à 5% de DMSO.

Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire anti-HA pendant 1 heure. En parallèle, certaines des cellules sont mises en contact avec un anticorps non relevant qui se fixe de façon non spécifique (n'exprimant pas HA – GLUT4) et va permettre de déterminer le signal non spécifique afin d'éliminer le bruit de fond.

Enfin, l'anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé au fluorophore Alexafluor 488 est ajouté et va se fixer à l'anticorps primaire.

À la fin de l'expérimentation, les plaques à 96 puits ont été analysées en utilisant le mode de lecture par le bas dans un lecteur de plaque de microtitrage à fluorescence (FLUOstar Galaxy, BMG Labtechnologies; Offenburg, Allemagne) ainsi qu'un microscope à épifluorescence pour garantir que les changements de fluorescence sont vraiment représentaient des changements dans les quantités de GLUT4 à la surface des cellules.

La fluorescence est mesurée à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 485 et 520 nm respectivement. Le taux de translocation de GLUT4 est déterminé par immunofluorescence : les adipocytes 3T3-L1 utilisés expriment le transporteur GLUT4 avec une étiquette HA dans sa première boucle extracellulaire, ce qui permet sa détection à la membrane par l'utilisation d'anticorps anti-HA.

5.2. Mesure de la cytotoxicité des extraits

Un autre essai basé sur la fluorescence a été réalisé dans le but de mesurer la viabilité cellulaire des extraits Pna1 et Sna1 a été réalisé avec le composé de résazurine Alamar Blue. Comme contrôle positif, les cellules ont été incubées avec différentes concentrations de l'enzyme glucose oxydase génératrice de peroxyde d'hydrogène, puis incubées jusqu'à 60 min avec 100 µM de résazurine.

Pour mesurer la cytotoxicité, les adipocytes ont été traités pendant 1 h et 24h avec une gamme de concentration des extraits Sna1 et Pna1 dissous dans du DMSO puis incubés jusqu'à 60 min avec 100 µM de résazurine dans un incubateur à CO2. La fluorescence rouge a été mesurée en utilisant un lecteur de plaques de microtitration à fluorescence (FLUOstar Galaxy, BMG Labtechnologies; Offenburg, Allemagne).

6. Mesure de la captation du glucose

L'absorption du glucose a été mesurée comme décrit précédemment (Martinez et al. 2010). Brièvement, les adipocytes cultivés dans des plaques à 12 puits ont été incubés pendant 2 h dans du MEMα avec 0,2% de BSA et pendant 5 min dans du KRP [12,5 mM Hepes (pH 7,4), 120 mM NaCl, 6 mM KCl, 1,2 mM MgSO 4, 1 mM CaCl 2, 0,4 mM NaH 2 PO 4, 0,6 mM Na 2 HPO 4 et 0,2% BSA]. Ensuite, les cellules ont été incubées pendant 40 min à 37 ° C en l'absence ou en présence d'insuline 1 nM et des extraits (20 pg / ml de Sna1 et 100 pg / ml de Pna1).

Pour contrôler les cellules, 50 uM de cytochalasine B ont été ajoutés et après 1 minute à tous les puits 0,1 mM de [3 H] -2désoxy-glucose (10,4 kBq / puits). Après 3 minutes, les cellules ont été largement lavées avec une solution saline tamponnée au phosphate glacée (PBS), lysées dans du Triton X-100 à 1%, et la radioactivité dans les échantillons a été déterminée en utilisant le liquide de scintillation Ultima Gold (PerkinElmer; Waltham, MA, USA) et un compteur à scintillation (Tricarb; Packard / PerkinElmer).

Toutes les incubations jusqu'aux lavages PBS ont été réalisées à 37 ° C. Des cellules traitées à la cytochalasine B ont été utilisées pour déterminer le fond du test.

7. Extraction et dosage des protéines

Les adipocytes ont été incubés pendant 2 h dans du DMEM avec 0,2% de BSA puis stimulés pendant 5 et 15 min en l'absence ou en présence d'insuline 1 nM et 100 µg / ml de Pna1.

Les cellules ont été lysées dans un tampon glacé contenant 50 mM d'HEPES pH 7,4, 150 mM de NaCl, 10 mM d'EDTA, 1% de Triton X-100, 100 mM de NaF, 2 mM de vanadate, 10 mM de pyrophosphate de sodium et 10 mM de cocktail d'inhibiteur de protéase Complete (Roche ; Meylan, France). Après 30 mn, une centrifugation à 13250g est effectuée, le surnageant contenant les protéines est ensuite récupéré et stocké à -20°C.

La méthode de dosage spectrophotométrique des protéines, Pierce BCA Protein assay kit (Thermo Fisher Scientific), a été utilisée pour le dosage des protéines extraites de la lignée 3T3-l1. Une gamme d'étalonnage est préparée en parallèle pour avoir la concentration des protéines.

8. Western blot

Le gel de migration est composé d'un gel de séparation 10% (5ml d'H 2 O, 10ml de tampon de concentration, 5ml d'acrylamide, 70µl d'APS, 20µg TEMED) et d'un gel de concentration (4ml d'H 2 O, 5ml de tampon de concentration, 1ml d'acrylamide, 50µl d'APS, 20µg TEMED).

Les protéines solubilisées dans du Laemmli 4X β mercaptoethanol, sont ensuite chauffées à 95° pendant 5min. Après le dépôt de quantité égale de protéines, la migration est réalisée à 100V pendant 2h. Après migration, le transfert sur membrane de nitrocellulose se fait à froid, pendant 1h à 100V. La membrane est ensuite lavée 3

fois au TBS- Tween 0,05% et bloquée dans une solution TBS-Tween 0,05%lait 5% pendant 1h.

L'anticorps primaire est dilué dans du TBS-Tween 0,05%BSA3%, la membrane est mise dans la solution de l'anticorps primaire sur la nuit à 4° et sous agitation. Le lendemain, après 3 lavages de 10 mn au TBS-Tween 0,05%, la membrane est incubée à température ambiante et sous agitation avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP (peroxydase de Raifort) et diluée dans le lait pendant une heure. La révélation de l'expression des protéines d'intérêt est visualisé en utilisant un réactif de chimioluminescence (Roche) et un imageur à base de caméra CCD (LAS-3000, Fuji fi lm; St. Quentin en Yvelines, France). Les intensités relatives ont été quantifiées à l'aide du logiciel MultiGauge (Fuji fi lm).

9. Statistiques

Toutes les données sont présentées comme des moyennes -/+ S.D. L'expérience de criblage d'extraits de *Citrullus colocynthis* et l'expérience de captation de glucose ont été répétées au moins trois fois. Pour les mesures de fluorescence dans des plaques à 96 puits, quatre puits ont été utilisés pour chaque condition. La signification statistique entre les points de données individuels a été analysée par un *t-test* bilatéral. Les différences entre les courbes dose-réponse de l'insuline ont été analysées par des tests F à somme additionnelle de carrés en utilisant l'ajustement de la courbe de réponse sigmoïdale log (dose) (graphique Prism). Les différences entre les courbes de cinétique de translocation de GLUT4 ont été analysées par des tests F à somme additionnelle de carrés en utilisant l'ajustement de courbe d'association en deux phases (graphique Prism). Les différences entre les ensembles de données ont été considérées comme statistiquement différentes lorsque $P < 0,05$.

Résumé

Le présent travail est une contribution à la recherche et à l'évaluation d'activités antidiabétiques de *Citrullus colocynthis*, plante médicinale locale utilisée pour traiter diverses pathologies, dont le diabète de type 2. Jusqu'à présent, ses effets antidiabétiques ont été attribués à son amélioration de la sécrétion d'insuline pancréatique. L'objectif de ces travaux de thèse est de rechercher et d'évaluer l'effet antidiabétique d'extraits de coloquinte sur deux cibles thérapeutiques, un transporteur de glucose : GLUT4 et une enzyme : l'α-amylase. En parallèle nous avons réalisé une étude comparative des effets biologiques et de la composition chimique de différents extraits de pulpe et de graine de Citrullus colocynthis. Nos travaux ont révélé que les extraits de coloquinte améliorent de façon aiguë la translocation de GLUT4 induite par l'insuline et augmentent de façon significative l'absorption du glucose. Nous avons découvert qu'une des fractions de la pulpe augmentait la translocation de GLUT4 sans changer la dose demi-maximale d'insuline ni changer la cinétique de translocation de GLUT4. Sur le plan moléculaire, l'extrait de pulpe s'est révélé augmenter la phosphorylation de la Protéine Kinase B PKB induite par l'insuline sans modifier la phosphorylation du récepteur d'insuline. L'évaluation de l'effet hémolytique ainsi que les tests de viabilité cellulaire sur les adipocytes ont montré que les fractions actives n'étaient pas toxiques pour les cellules, de plus, elles présentaient même un effet protecteur. L'évaluation de l'inhibition de l'α-amylase a démontré que les extraits de pulpe et de graine de *Citrullus colocynthis* confirment la présence d'une activité inhibitrice. Enfin, nous avons déterminé les profils phytochimiques de nos extraits d'intérêt par LC-MS et identifié plusieurs composés qui constituaient 87% de l'extrait. La combinaison de plusieurs méthodes d'analyses chimiques, spectroscopiques et chromatographiques nous a permis d'évaluer qualitativement et quantitativement les biomolécules dans les extraits de différentes parties de Citrullus colocynthis ainsi que la mise en évidence d'une nouvelle molécule susceptible d'être une cucurbitacine non décrite encore dans la littérature.

Mots clés : Citrullus colocynthis, diabète de type 2, GLUT4, α-amylase, cucurbitacines.

Summary

The present work is a contribution to the research and evaluation of the anti-diabetic activities of Citrullus colocynthis, a local medicinal plant used to treat various pathologies, including type 2 diabetes. Until now, its anti-diabetic effects have been attributed to its improved pancreatic insulin secretion. The objective of this thesis work is to research and evaluate the anti-diabetic effect of extracts of colocynth on two therapeutic targets, a glucose transporter: GLUT4 and an enzyme: α-amylase. In parallel, we carried out a comparative study of the biological effects and the chemical composition of various extracts of pulp and seed of Citrullus colocynthis. Our work revealed that colocynth extracts acutely improve insulin-induced GLUT4 translocation and significantly increase glucose uptake. We have shown that one of the pulp fractions increases the translocation of GLUT4 without changing the half-maximal dose of insulin or changing the kinetics of translocation of GLUT4. Molecularly, the pulp extract has been shown to increase insulin-induced phosphorylation of Protein Kinase B PKB without altering insulin receptor phosphorylation. Evaluation of the hemolytic effect as well as cell viability tests on adipocytes showed that the active fractions were not toxic to the cells, moreover, they even had a protective effect. Evaluation of α-amylase inhibition showed that extracts from the pulp and seed of Citrullus colocynthis confirmed the presence of inhibitory activity. Finally, we determined the phytochemical profiles of our extracts of interest by LC-MS and identified several compounds that made up 87% of the extract. The combination of several chemical, spectroscopic and chromatographic analysis methods allowed us to qualitatively and quantitatively assess the biomolecules in the extracts of different parts of Citrullus colocynthis as well as the demonstration of a new molecule likely to be a cucurbitacin. not yet described in the literature.

Keywords: Citrullus colocynthis, type 2 diabetes, GLUT4, α-amylase, cucurbitacins.

ملخص

هذا العمل هو مساهمة في البحث والتقييم للأنشطة المضادة لمرض السكري في Citrullus colocynthis ، وهو نبات طبي محلي يستخدم لعلاج أمراض مختلفة ، بما في ذلك مرض السكري من النوع 2. حتى الآن ، تُعزى آثاره المضادة للسكري إلى تحسين إفراز الأنسولين في البنكرياس. الهدف من هذه الرسالة البحثية وتقييم التأثير المضاد لمرض السكري لمستخلصات الكولوسينث على هدفين علاجيين ، ناقل الجلوكوز: GLUT4 وإنزيم: α-amylase. بالتوازي مع ذلك ، أجرينا دراسة مقارنة للتأثيرات البيولوجية والتركيب الكيميائي لمستخلصات مختلفة من لب وبذور نبات سيتروس كولوسينثيس.

كشف عملنا أن مستخلصات الكولوسينث تحسن بشكل حاد انتقال GLUT4 الناجم عن الأنسولين وتزيد بشكل كبير من تحفيز الأنسولين لامتصاص الجلوكوز الخلوي. لقد أظهرنا أن أحد أجزاء اللب يزيد من انتقال GLUT4 دون تغيير نصف جرعة الأنسولين القصوى أو تغيير حركية انتقال GLUT4. جزيئيًا ، ثبت أن مستخلص اللب يزيد من الفسفرة التي يسببها الأنسولين لبروتين Kinase B PKB دون تغيير فسفرة مستقبلات الأنسولين. أظهر البحث والتقييم للتأثير الانحلالي وكذلك اختبارات حيوية الخلية على الخلايا الشحمية أن الكسور النشطة لم تكن سامة للخلايا ، علاوة على ذلك ، كان لها تأثير وقائي. أظهر تقييم تثبيط α-amylase أن المستخلصات من لب وبذور Citrullus colocynthis أكدت وجود نشاط مثبط. جزء اللب مع أفضل معدل لتثبيط ألفا الأميليز. أخيرًا ، حددنا الملامح الكيميائية النباتية لمقتطفاتنا التي تهمنا بواسطة LC-MS وحددنا العديد من المركبات التي تشكل 87 ٪ من المستخلص. سمح لنا الجمع بين العديد من طرق التحليل الكيميائي والطيفي والكروماتوغرافي بإجراء تقييم نوعي وكمي للجزيئات الحيوية في مقتطفات من أجزاء مختلفة من Citrullus colocynthis بالإضافة إلى إظهار جزيء جديد يحتمل أن يكون كوكوربيتاسين. لم يتم وصفها بعد في الأدبيات.

الكلمات المفتاحية: Citrullus colocynthis ، داء السكري من النوع 2 ، α- GLUT4 ، amylase ، cucurbitacins.