

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 908 310

②① N° d'enregistrement national : **07 04278**

⑤① Int Cl⁸ : **A 61 K 36/00** (2006.01), A 61 P 3/00

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 15.06.07.

③① Priorité : 14.11.06 FR 0609930.

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 16.05.08 Bulletin 08/20.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été
établi à la date de publication de la demande.*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : PHYTODIA — FR, UNIVERSITE
LOUIS PASTEUR — FR et CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS — FR.

⑦② Inventeur(s) : SALADIN REGIS.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET ARMENGAUD AINE.

⑤④ **PRODUITS AGONISTES DE TGR5 ET LEURS APPLICATIONS.**

⑤⑦ L'invention vise l'utilisation de produits susceptibles
d'être obtenus à partir de plantes, tels qu'extraits, fractions
et/ou molécules comme agonistes spécifiques de TGR5.

Application pour fabriquer des médicaments pour l'homme
ou l'animal, notamment pour prévenir et/ou traiter des
troubles métaboliques, l'obésité et/ou des maladies qui lui
sont associées comme le syndrome X (syndrome métabolique),
le diabète de type 2, ou pour fabriquer des compléments
alimentaires pour l'homme ou l'animal.

FR 2 908 310 - A1



« Produits agonistes de TGR5 et leurs applications »

5 L'invention a pour objet l'utilisation de produits susceptibles d'être obtenus à partir de plantes pour leurs effets bénéfiques sur les désordres métaboliques chez l'homme ou l'animal.

10 Depuis une trentaine d'année, la sédentarité et la surnutrition ont provoqué une explosion de l'incidence de l'obésité dans les pays industrialisés. Les obèses présentent un risque accru de développer d'autres maladies métaboliques, comme l'hypertension artérielle, les dyslipidémies et le diabète de type 2.

15 Le caractère multi-symptomatique des maladies métaboliques implique une multi-médicamentation, laquelle, outre son coût élevé pour les organismes de santé, augmente les risques d'effets secondaires par interaction médicamenteuse.

20 Malgré l'existence d'un grand nombre d'outils thérapeutiques, il existe un très grand besoin médical pour les maladies métaboliques puisque les traitements actuellement disponibles sont généralement assortis d'effets secondaires difficiles à supporter pour les patients.

25 Les recherches se poursuivent donc dans ce domaine, avec un intérêt particulier pour des solutions alternatives, basées en particulier sur des produits d'origine végétale, considérés comme naturels, par opposition aux composés de synthèse. Ces recherches aboutissent à la découverte de médicaments à base de plantes et/ou d'origine végétale, mais également à 30 l'identification de compléments alimentaires à base de plantes. Il est en effet clairement établi que l'association d'un régime adapté intégrant l'utilisation de compléments alimentaires à base de certaines plantes et d'une activité

physique adéquate, permet de prévenir le développement de ces maladies, et en particulier celui du diabète.

Des résultats de grand intérêt, obtenus avec des extraits ou fractions de plantes qui se sont révélés biologiquement
5 actifs dans des tests spécifiques, sont décrits dans la demande FR 06 09930 du 14 novembre 2006.

Les présents travaux ont porté sur la recherche de produits d'origine végétale reconnaissant spécifiquement une cible biologique interférant avec la fonction mitochondriale.

10 En effet, des études récentes ont montré que la diminution de l'activité métabolique elle-même, et en particulier au niveau de la mitochondrie, était l'une des perturbations majeure et précoce observée dans le développement des maladies métaboliques, notamment dans la pathogenèse du diabète de type
15 2 [Petersen et al].

Ainsi, en utilisant une lignée de cellules de CHO transfectée de manière stable avec un vecteur d'expression du TGR5 et un plasmide rapporteur (à titre d'exemple le gène codant pour la luciférase), les inventeurs ont constaté que
20 l'activité de TGR5 était augmentée, par rapport à un contrôle, lorsque les cellules CHO étaient traitées par des extraits et/ou fractions susceptibles d'être obtenus à partir de plantes, ou par des molécules susceptibles d'être obtenues à partir de ces extraits ou fractions. Ces extraits, fractions
25 et molécules sont désignés globalement par le terme « produits » dans la description et les revendications.

Le récepteur TGR5 appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG en abrégé).

Il s'agit du premier récepteur membranaire activé par les
30 acides biliaires. TGR5 est décrit comme étant un médiateur de certaines fonctions endocrines des acides biliaires.

Son utilisation comme cible biologique conformément à l'invention permet de disposer de produits présentant une

grande spécificité au niveau de leurs effets sur le métabolisme.

L'invention a donc pour but de fournir des produits agonistes de TGR5, et vise les applications de ces produits, 5 chez l'homme et l'animal, notamment dans les domaines thérapeutiques, alimentaires, nutroceutiques et, de manière générale, pour prévenir et traiter les affections et troubles liées à des désordres métaboliques.

L'invention vise ainsi l'utilisation de produits 10 susceptibles d'être obtenus à partir de plantes, tels qu'extraits, fractions et/ou molécules comme agonistes spécifiques de TGR5.

On mesurera l'originalité de l'invention basée sur la mise en évidence du mécanisme d'action desdits produits qui permet 15 le développement d'applications spécifiques.

Les produits mis en œuvre dans l'utilisation selon l'invention sont des produits biologiquement actifs, caractérisés en ce qu'ils présentent une structure chimique différente de celle des acides biliaires, agonistes connus de 20 TGR5 ; possèdent une CE_{50} supérieure ou égale à celle d'un ligand naturel de TGR5, tel que l'acide lithocholique (LCA); et en outre n'activent pas le récepteur nucléaire FXR. De plus, ces produits entraînent une réduction de la prise de poids induite par une nourriture grasse dans un modèle murin 25 de syndrome métabolique et entraînent également une réduction de la masse des coussinets graisseux de l'épididyme dans ce même modèle. Ils entraînent également une amélioration de la tolérance au glucose.

Grâce à ces effets spécifiques, ils s'avèrent ainsi 30 particulièrement appropriés pour prévenir ou traiter des patients souffrant de pathologies telles que l'obésité, le syndrome métabolique ou le diabète de type 2.

Les produits utilisés comme agonistes de TGR5 selon l'invention sont plus spécialement susceptibles d'être obtenus

à partir de plantes choisies dans le groupe comprenant *Olea europaea*, *Alchemilla vulgaris*, *Juglans regia*, *Agrimonia eupatoria*, *Vaccinium myrtillus* et *Obetia radula*.

Des molécules particulièrement préférées compte tenu de leur effet activateur de TGR5 comprennent les triterpènes pentacycliques.

Il s'agit plus spécialement de triterpènes pentacycliques de type oléanane, tel l'acide oléanolique, de type ursane, tel l'acide corosolique, ou de type lupane.

La mise en évidence des effets antihyperglycémique, antihyperinsulinémique et sur l'obésité de l'acide oléanolique présente un caractère particulièrement surprenant étant donné qu'à ce jour les propriétés antihypertensive et hypoglycémique des feuilles d'olivier avaient été seulement attribuées à l'oleuropéine.

De manière avantageuse, lesdits agonistes de TGR5 selon l'invention présentent une grande innocuité et ne donnent pas lieu à des effets secondaires nocifs.

L'invention vise donc également l'utilisation desdits produits biologiquement actifs pour la fabrication de médicaments destinés à la prévention et/ou traitement de troubles métaboliques, plus spécialement de l'obésité et/ou de maladies associées comme le syndrome X (syndrome métabolique), le diabète de type 2.

Lesdits produits sont particulièrement les extraits ou fractions définis ci-dessus.

Dans un mode de réalisation, l'invention vise l'utilisation de triterpènes pentacycliques de type ursane, de triterpènes pentacycliques de type oléanane, ou de triterpènes pentacycliques de type lupane.

Dans un autre mode de réalisation, l'invention vise en particulier l'utilisation desdits extraits, ou fractions, ou de l'acide corosolique pour la prévention et/ou le traitement de l'obésité et/ou le syndrome métabolique.

Dans encore un autre mode de réalisation, l'invention vise l'utilisation desdits extraits ou fractions, ou de l'acide oléanolique pour la prévention et/ou le traitement de l'obésité ou du diabète, notamment du diabète de type 2, et/ou le syndrome métabolique.

Les médicaments fabriqués conformément à l'invention renferment lesdits produits en une quantité thérapeutiquement efficace, en association avec un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable.

Dans l'utilisation selon l'invention, les médicaments se présentent sous une forme pour l'administration par voie orale, injectable ou topique.

Les médicaments ainsi élaborés se présentent sous des formes appropriées pour l'administration par voie orale, telles que gouttes, gélules, sirop, sirop alcoolique, par voie injectable, sous forme de solution dans des ampoules, ou encore par voie topique, telle que crème ou pommade.

La posologie dans les différentes formes et pour l'application quotidienne, sera établie, de manière classique, selon le type d'effets à traiter.

A titre d'exemple, on administrera lesdits médicaments à base desdits agonistes à raison de 0.1mg à 5g/jour.

Les effets antihyperglycémiques, antihyperinsulinémiques et sur la prise de poids desdits produits sont également avantageusement mis à profit en diététique.

L'invention vise ainsi également l'utilisation des agonistes de TGR5 définis ci-dessus comme compléments alimentaires destinés à l'homme (adulte ou enfant) ou à l'animal.

Ces compléments sont incorporés dans l'alimentation durant l'élaboration des aliments ou lors de leur conditionnement, ou en utilisant des préparations déjà formulées avec lesdits produits, permettant d'effectuer la supplémentation désirée.

Ils peuvent également se présenter sous une forme ingérable telle que gélules, capsules, infusions, cette énumération n'étant pas limitative.

5 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont donnés dans les exemples qui suivent se rapportant, à titre illustratif, à des fractions de 6 extraits de plantes (*Olea europaea*, *Alchemilla vulgaris*, *Juglans regia*, d'*Agrimonia eupatoria*, *Vaccinium myrtillus*, *Obetia radula*).

10 Dans ces exemples, il est fait référence aux figures 1 à 15, qui concernent, respectivement :

- la figure 1 : l'effet de fractions d'*Olea europaea* sur l'activité du récepteur TGR5,
- la figure 2 : le profil HPLC de la fraction d'*Olea europaea* active sur le TGR5,
- 15 - la figure 3 : le spectre RMN de l'acide oléanolique, principe actif sur le TGR5, extrait d'*Olea europaea*,
- la figure 4 : l'effet de fractions d'*Alchemilla vulgaris* sur l'activité du récepteur TGR5,
- la figure 5 : le profil HPLC de la fraction d'*Alchemilla*
- 20 *vulgaris* active sur le TGR5,
- la figure 6 : le spectre RMN de l'acide corosolique, principe actif sur le TGR5, extrait d'*Alchemilla vulgaris*,
- la figure 7 : l'effet de fractions de *Juglans regia* sur l'activité du récepteur TGR5,
- 25 - La figure 8 : le profil HPLC du pool de fractions de *Juglans regia* actives sur le TGR5,
- La figure 9 : l'effet de fractions d'*Agrimonia eupatoria* sur l'activité du récepteur TGR5,
- La figure 10 : le profil HPLC de la fraction active
- 30 d'*Agrimonia eupatoria* sur le TGR5,
- La figure 11 : l'effet de fractions de *Vaccinium myrtillus* sur l'activité du récepteur TGR5,
- La figure 12 : le profil HPLC de la fraction de *Vaccinium myrtillus* active sur TGR5,

- La figure 13 : l'effet de fractions d'*Obetia radula* sur l'activité du récepteur TGR5,
- La figure 14 : le profil HPLC de la fraction d'*Obetia radula* active sur TGR5, et
- 5 - La figure 15 : l'effet de l'acide oléanolique (OA), de l'acide corosolique (AVA) et de la fraction active TGR5 de *Juglans regia* (JRL) sur le test de tolérance au glucose (IPGTT) chez la souris soumise à un régime gras.

10 Produits et procédés

Produits

L'acide oléanolique est un produit commercialisé par Extrasynthèse (Genay, France) et l'oleuropéine et l'acide lithocholique sont des produits commercialisés par Sigma-
15 Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

Extraction à partir de plante

L'extraction à l'éthanol est effectuée, exhaustivement, sur 10 g de feuilles d'olivier séchées à l'air et pulvérisées (*Olea europaea* L. Oleaceae, PhytoEst, France) avec une
20 solution aqueuse d'éthanol à 80%, par macération à température ambiante pendant 3 heures. On filtre ensuite le mélange à l'aide d'une pompe aspirante et on concentre le filtrat par évaporation sous pression réduite.

Pour l'extraction au dichlorométhane et au méthanol, on
25 extrait successivement la matière végétale en poudre (10 à 20 g) avec du cyclohexane (100 mL), du dichlorométhane (100 mL) et du méthanol (100 mL), en utilisant un extracteur Soxhlet automatique (2055 Aventi Sotex, Foss Tecator).

Ce protocole permet d'obtenir trois types d'extraits dans
30 lesquels sont respectivement concentrés les constituants très lipophiles, non polaires et polaires du végétal.

On élimine le solvant par évaporation sous pression réduite puis on pèse les résidus correspondants et on les conserve au congélateur jusqu'à utilisation.

Analyse par HPLC

Pour les profils analytiques de chaque extrait, on soumet une solution méthanolique du résidu (5 mg/mL) à une HPLC analytique (Varian Pro Star) couplée à un détecteur DAD (Varian) en utilisant une colonne en phase inverse (Nucleodur 100-10-C18, 250/4,6, Macherey-Nagel).

Pour l'élution, on utilise un mélange d'acétonitrile et d'eau acidifiée (0,1% d'acide trifluoroacétique).

En conditions analytiques, le débit est de 1 mL/min avec le gradient suivant : H₂O/CH₃CN (20:80) pendant 30 min, CH₃CN (100%) pendant 5 min, et H₂O/CH₃CN (20:80) pendant 5 min. Pour l'analyse par LC/MS (Agilent 1200SL), on enregistre le PDA dans la gamme de 200 à 500 nm, en utilisant 254 nm en tant que longueur d'onde de détection. On procède aux analyses avec une APCI (Application Layer Protocol Control Information) couplée à une interface d'ionisation par électronébulisation (ESI) en mode négatif.

20 Analyse par RMN

On utilise un spectromètre de RMN DPX300 fonctionnant à 300 MHz pour ¹H. Les déplacements chimiques sont exprimés en δ (parties par million) en référence au pic de solvant de 7,58 pour la pyridine-d₅ C₅D₅N.

25

Dosage de l'activité TGR5 par un test luciférase

Des cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO) ont été obtenues auprès de l'ATCC (Manassas, Virginie) et maintenues dans du Milieu Essentiel Minimum alpha (α-MEM) auquel est ajouté 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF), 100 μM d'acides aminés non essentiels (AANE), 100 unités/mL de pénicilline et 100 μg/mL de sulfate de streptomycine.

Pour le dosage de l'activité TGR5, on utilise une lignée cellulaire stable obtenue en transfectant des cellules CHO

avec 3,8 µg d'un plasmide, vecteur d'expression du TGR5 (pCMVSPORT6/TGR5), 3,8 µg d'un plasmide rapporteur luciférase dont l'expression est contrôlée par le cAMP Response Element (CRE,pCRE-Luc) et 0,4 µg d'un plasmide d'expression du gène de
5 résistance à la néomycine (pcDNA3.1(+)) en utilisant de la Lipofectamine 2000. Les cellules transfectées sont sélectionnées avec 400 µg/mL de sulfate G418 et les clones individuels sont cultivés indépendamment sur une plaque à 96 puits. Les cellules CHO exprimant TGR5 sont traitées avec
10 10 µM d'acide lithocholique (LCA) ou d'extraits végétaux, puis soumises à des dosages de la luciférase [Picard et al.]. La luminescence est déterminée sur un appareil Centro XS3 LB960 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Allemagne).

15 Dosage de FXR par la luciférase

Pour évaluer l'activité FXR des extraits végétaux, on transfecte grâce à la Lipofectamine 2000 des cellules COS1 (ATCC) avec 25 ng de plasmide vecteur d'expression du hFXR (pCMX-hFXR), 25 ng de plasmide vecteur d'expression du
20 récepteur des rexinoïdes α (RXR α) de souris (m) (pCMX-mRXR α), 50 ng de plasmide rapporteur luciférase (pEcREx7-Luc) et 50 ng de pCMV β utilisé en tant qu'étalon interne dans chaque puits.

Environ 18 heures après les transfections, les cellules sont incubées pendant 5 heures avec différentes concentrations
25 de chaque extrait dans du MEM (ou du DMEM) frais. Après ce traitement, les cellules sont lysées et on détermine l'activité luciférase normalisée en opérant selon Picard et al ci-dessus.

30 Animaux et régime alimentaire

Des souris C57BL/6 mâles de six semaines, obtenues auprès de Charles River, sont utilisées.

La nourriture normale et équilibrée riche en glucides (SAFE, D04) et la nourriture riche en lipides (60% Kcal Fat,

D12492) sont obtenues auprès de Research Diets (New Brunswick, New Jersey).

Les souris sont par cages de 4 ou 5 animaux sous température stable, avec un cycle jour/nuit de 12 heures, et
5 avec 1 accès libre à la nourriture et à l'eau. Les animaux sont maintenus pendant 10 semaines soit sous une alimentation normale et équilibrée ($n = 5$), soit sous une alimentation riche en lipides ($n = 32$). Après 10 semaines sous une
10 alimentation riche en lipides, les animaux sont divisés en quatre groupes de 8 animaux : un groupe est maintenu sous une alimentation riche en lipides uniquement, un autre groupe reçoit la même alimentation additionnée d'acide oléanolique à une dose de 100 mg/kg/jour (l'absorption de nourriture est mesurée tout au long de l'étude et la quantité de composé
15 ajustée de façon à maintenir le dosage stable), un autre groupe reçoit la même alimentation additionnée d'acide corosolique à une dose de 100 mg/kg/jour, enfin un dernier groupe reçoit la même alimentation additionnée de fraction active de *Juglans regia* à une dose de 100 mg/kg/jour. Le poids
20 corporel et l'absorption de nourriture sont déterminés un jour sur deux. Cette expérience est réalisée en respectant les principes éthiques.

Test de tolérance au glucose

25 Le test est réalisé sur des animaux que l'on a laissé jeûner pendant 10 heures. La glycémie est surveillée à l'aide d'un glucomètre portatif (Maxi Kit Glucometer 4, Bayer Diagnostic). Pour ce test, on injecte par voie intrapéritonéale une solution stérile contenant 2 g de
30 glucose/kg de poids corporel. La glycémie est évaluée en prélevant du sang dans la veine caudale à 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 et 180 minutes.

Exemple 1 : identification d'agonistes de TGR5 à partir d'*Olea europaea*

• **Extraction à partir de feuilles d'*Olea europaea***

5

Extraits éthanoliques totaux, extraits au DCM
(dichlorométhane) et extraits au MeOH (méthanol)

10 Les extraits totaux présentant une activation de TGR5
similaire à celle observée avec le LCA (utilisé en tant que
témoin positif) sur le test luciférase dans les cellules CHO-
TGR5 ont d'abord été sélectionnés.

L'isolement du principe actif se poursuit en testant des
extraits enrichis soit en molécules hydrophobes (extraction au
15 DCM), soit en molécules hydrophiles (MeOH). Pour *Olea*
europaea, la majeure partie de l'activité est présente dans
l'extrait DCM.

Fractionnement de l'extrait hydrophobe

20 Le fractionnement de la fraction hydrophobe de l'extrait
d'*Olea europaea* se poursuit par HPLC en phase inverse
préparative ou par chromatographie sur couche mince. Dix
fractions numérotées de 1 à 10 sont obtenues et l'activité
luciférase dans les CHO-TGR5 est mesurée avec à titre de
25 contrôle, celle de LCA et celle de l'oleuropéine à des doses
de 1,5, 5, 15 et 50 µg/mL.

Comme le montre la figure 1, l'activité n'est présente que
dans les fractions 6 à 9. Avec l'oleuropéine à des doses
allant de 1,5 à 50 µg/mL, on n'observe aucun effet agoniste
30 sur TGR5. Ces données démontrent que la molécule active
contenue dans l'extrait DCM d'*Olea europaea* est différente de
l'oleuropéine.

- **Molécule active de la fraction 7**

De manière surprenante, la fraction active 7 présente une grande pureté. La détection UV ne révèle qu'un pic principal
5 avec un temps de rétention de 21,9 minutes (figure 2). L'analyse LC/MS de la fraction 7 permet d'identifier la masse moléculaire de la molécule à 455,3 g/mol. On réalise cette analyse en mode négatif, ce qui signifie qu'il manque un
10 moléculaire réelle du pic principal détecté aux alentours de 456 à 457 g/mol. L'identification est terminée en analysant la fraction 7 par RMN (figure 3). Le spectre obtenu est caractéristique d'une molécule de type triterpénoïde. Les données analytiques de HPLC, de LC/MS et de RMN combinées avec
15 celles disponibles pour les triterpènes de feuilles d'olivier déjà décrits, amènent à conclure que la molécule de la fraction 7 est l'acide oléanolique. Cette identification est confirmée en réalisant une co-injection en HPLC avec un étalon commercial (Extrasynthèse, Genay, France) et par comparaison
20 du spectre de RMN obtenu avec celui déjà rapporté de l'acide oléanolique [Seebacher et al.]. La valeur de la CE₅₀ obtenue pour l'acide oléanolique dans le test d'activité luciférase TGR5 humain qui est de 1,42 µM, est comparable à la CE₅₀ de 0,89 µM obtenue pour le LCA, ligand naturel de TGR5.

25

- **Etude de la sélectivité de l'acide oléanolique vis-à-vis de TGR5**

Pour exclure toute éventuelle implication du récepteur
30 nucléaire des acides biliaires dans l'explication de l'activité biologique de l'acide oléanolique, on détermine ensuite si l'acide oléanolique active le FXR dans un dosage de gène rapporteur (luciférase) dépendant de FXR. Les résultats obtenus confirment que l'acide oléanolique n'active pas le

FXR, ce qui démontre que ce triterpène est un agoniste sélectif de TGR5, le différenciant nettement des acides biliaires, qui activent à la fois TGR5 et FXR.

5 **Exemple 2 : identification d'agonistes de TGR5 à partir d'*Alchemilla vulgaris***

On prépare des extraits et fractions en opérant comme ci-dessus avec *Olea europaea*.

10 Les résultats obtenus avec les fractions des extraits DCM sont donnés sur la figure 4.

On constate la très forte réactivité de la fraction 9 dans le test TGR5.

15 Le profil HPLC de cette fraction est donné sur la figure 5.

La figure 6 rapporte le spectre RMN de l'acide corosolique, qui est la molécule active contenue dans la fraction 9.

20 **Exemple 3 : identification d'agonistes de TGR5 à partir de *Juglans regia***

On opère comme indiqué dans l'exemple 1 en rapport avec *Olea europaea*.

25 Les résultats obtenus avec les fractions des extraits DCM sont donnés sur la figure 7 qui montre la forte activité des fractions 7, 8 et 9. Le profil HPLC du pool de ces fractions est donné sur la figure 8.

30 **Exemple 4 : identification d'agonistes de TGR5 à partir d'*Agrimonia eupatoria***

On opère comme indiqué dans l'exemple 1 en rapport avec *Olea europaea*.

Les résultats obtenus avec 8 fractions des extraits DCM sont donnés sur la figure 9 qui montre la forte activité de la fraction 4. Le profil HPLC de ces fractions est donné sur la figure 10.

5

Exemple 5 : identification d'agonistes de TGR5 à partir de *Vaccinium myrtillus*

On opère comme indiqué dans l'exemple 1.

10

Les résultats obtenus sur 9 fractions DCM sont donnés sur la figure 11. L'examen de cette figure montre que les fractions 3, 5, 6, 7, et 8 présentent une activité supérieure à celle de LCA, tout spécialement en ce qui concerne la fraction 6.

15

Le profil HPLC de cette fraction est donné sur la figure 12.

Exemple 6 : identification d'agonistes de TGR5 à partir d'*Obetia radula*

20

On opère comme indiqué dans l'exemple 1.

Les résultats obtenus sur 8 fractions DCM sont donnés sur la figure 13. L'examen de cette figure montre que les fractions 3, 4 et 6, tout spécialement la fraction 6 présentent une activité supérieure à celle du LCA.

25

Le profil HPLC de cette fraction est donné sur la figure 14.

Exemple 7 : étude de l'effet de fractions actives d'extraits de plantes sur la tolérance au glucose chez les souris soumis à un régime gras

30

L'effet de fractions actives d'extraits de plantes selon l'invention a été évalué dans un modèle murin de syndrome métabolique, à savoir la souris soumise à un régime gras. Des

souris C57BL/6 sont nourries soit avec de la nourriture normale et équilibrée, soit avec de la nourriture riche en lipides pendant 10 semaines avant de commencer le traitement par les extraits de plantes. Pendant cette période, les souris sous régime gras présentent une augmentation de 50% de leur poids corporel, accompagnée d'une augmentation similaire de l'apport calorique.

A la fin de la période de traitement (14 jours) avec les fractions de : *Olea* (OA), *Alchemilla* (AVA) et *Juglans* (JRL), les paramètres cliniques donnés dans le tableau 1 ci-dessous sont obtenus.

Tableau 1

		Alimentation normale		régime gras		
			Véhicule	OA 100 mg/kg	AVA 100 mg/kg	JRL 100 mg/kg
Poids corporel (g)	J0	24,3 ± 0,5	36,1 ± 1	34,5 ± 0,7	34,1 ± 1,5	35 ± 1,3
	J14	26,3 ± 0,4	38,3 ± 1,1	30,4 ± 1,4	35 ± 1,4	35,9 ± 1,3
Prise moyenne d'aliments (Kcal/animal/jour)		7,20 ± 0,29	14,79 ± 0,88	11,43 ± 0,98	x	x
Epididymal WAT (% BW)		1,73 ± 0,09	5,77 ± 0,27	3,7 ± 0,7*	4,8 ± 0,4*	5,1 ± 0,3

Les données représentent les valeurs moyennes ± SEM, alimentation normales n=5, Véhicule, OA, AVA, JRL n=8.
(* p<0,001)

Une tendance à produire un effet inhibiteur sur la prise de poids corporel est observée, ainsi qu'une nette réduction de la masse des coussinets graisseux de l'épididyme, ce qui indique que les fractions actives affectent le métabolisme énergétique.

On mesurera que, dans ces expériences, une alimentation riche en gras est maintenue pendant 10 semaines avant de commencer le traitement. L'étude porte donc sur la capacité à corriger, plutôt qu'à prévenir, l'apparition d'une surcharge pondérale et d'une résistance à l'insuline.

Les résultats de la figure 15 indiquent que ces fractions sont capables d'améliorer l'homéostasie métabolique chez les souris soumises à un régime gras. En particulier, la résistance à l'insuline induite dans ce modèle d'alimentation riche en gras et provoquant un effet pré-diabétique est corrigé: en effet après 14 jours de traitement avec les fractions actives de l'invention, une épreuve d'hyperglycémie provoquée par voie intrapéritonéale (IPGTT) est effectuée. La glycémie moyenne avant l'IPGTT est respectivement de 103 ± 7 , 154 ± 5 , 144 ± 18 , 141 ± 2 et 159 ± 3 mg/dL pour les groupes à alimentation normale, à alimentation riche en lipides, à alimentation riche en lipides + acide oléanolique, à alimentation riche en lipides + acide corosolique, et à alimentation riche en lipides + JRL. Les courbes d'IPGTT montrent clairement que l'administration d'une nourriture riche en gras induit une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline (figure 15). Cette tolérance au glucose est partiellement corrigée lorsque les souris sont traitées avec les fractions actives.

L'invention fournit ainsi des agonistes de TGR5 hautement spécifiques et puissants et les résultats obtenus montrent la forte activité de ces molécules, correspondant à des fractions pures et/ou enrichies.

Références bibliographiques

K.F. Petersen, S. Dufour, D. Befroy, R. Garcia, et G.I. Shulman. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *New Engl. J. Med.* 350 (2004) 664-671.

F. Picard, M. Gehin, M.C. Annicotte, S. Rocchi, M.F. Champy, B.W. O'Malley, P. Chambon, et J. Auwerx. SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell* 111 (2002) 931-941.

W. Seebacher, N. Simic, R. Weiss, R. Sat, et O. Kunert. *Magn. Reson. Chem.* 41 (2003) 636-638.

Revendications

1 - Utilisation de produits susceptibles d'être obtenus à partir de plantes, tels qu'extraits, fractions et/ou molécules
5 comme agonistes spécifiques de TGR5, lesdits produits étant des extraits de plantes, ou des fractions susceptibles d'être obtenues à partir de ces extraits ou des molécules susceptibles d'être obtenues à partir de ces extraits ou fractions :

- 10 - présentant une CE_{50} supérieure ou égale à celle d'un ligand naturel de TGR5, tel que l'acide lithocholique (LCA),
- n'activant pas le récepteur nucléaire FXR,
- entraînant une réduction de la prise de poids induite
15 par une nourriture grasse chez un modèle murin de syndrome métabolique ainsi qu'une réduction de la masse des coussinets graisseux de l'épididyme dans ce même modèle,
- entraînant une amélioration de la tolérance au
20 glucose.

2 - Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les plantes sont choisies dans le groupe comprenant
Olea europaea, *Alchemilla vulgaris*, *Juglans regia*, *Agrimonia*
25 *eupatoria*, *Vaccinium myrtillus* et *Obetia radula*.

3 - Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que les molécules comprennent un triterpène pentacyclique.

30

4 - Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que les molécules comprennent un triterpène pentacyclique de type oléanane, tel que l'acide oléanolique.

5 - Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que les molécules comprennent un triterpène pentacyclique de type ursane, tel que l'acide corosolique.

5 6 - Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que les molécules comprennent un triterpène pentacyclique de type lupane.

10 7 - Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour fabriquer des médicaments pour l'homme ou l'animal pour prévenir et/ou traiter des troubles métaboliques, l'obésité et/ou des maladies qui lui sont associées comme le syndrome X (syndrome métabolique), le diabète de type 2.

15 8 - Utilisation selon la revendication 7, dans laquelle lesdits extraits, ou fractions, ou l'acide corosolique sont mis en œuvre pour prévenir et/ou traiter l'obésité et/ou le syndrome métabolique.

20 9 - Utilisation selon la revendication 7, dans laquelle lesdits extraits, ou fractions, ou l'acide oléanolique sont mis en œuvre pour la prévention et/ou le traitement de l'obésité ou du diabète, notamment du diabète de type 2 et/ou le syndrome métabolique.

25

10 - Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que lesdits médicaments sont destinés à une administration par voie orale, injectable ou topique.

11 - Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour l'élaboration de compléments alimentaires destinés à l'homme ou à l'animal.

5

12 - Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que lesdits compléments sont incorporés dans l'alimentation durant l'élaboration des aliments ou lors de leur conditionnement, ou en utilisant des préparations déjà
10 formulées avec lesdits produits, permettant d'effectuer la supplémentation désirée.

13 - Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que lesdits compléments se présentent sous une forme
15 ingérable telle que gélules, capsules, infusions.

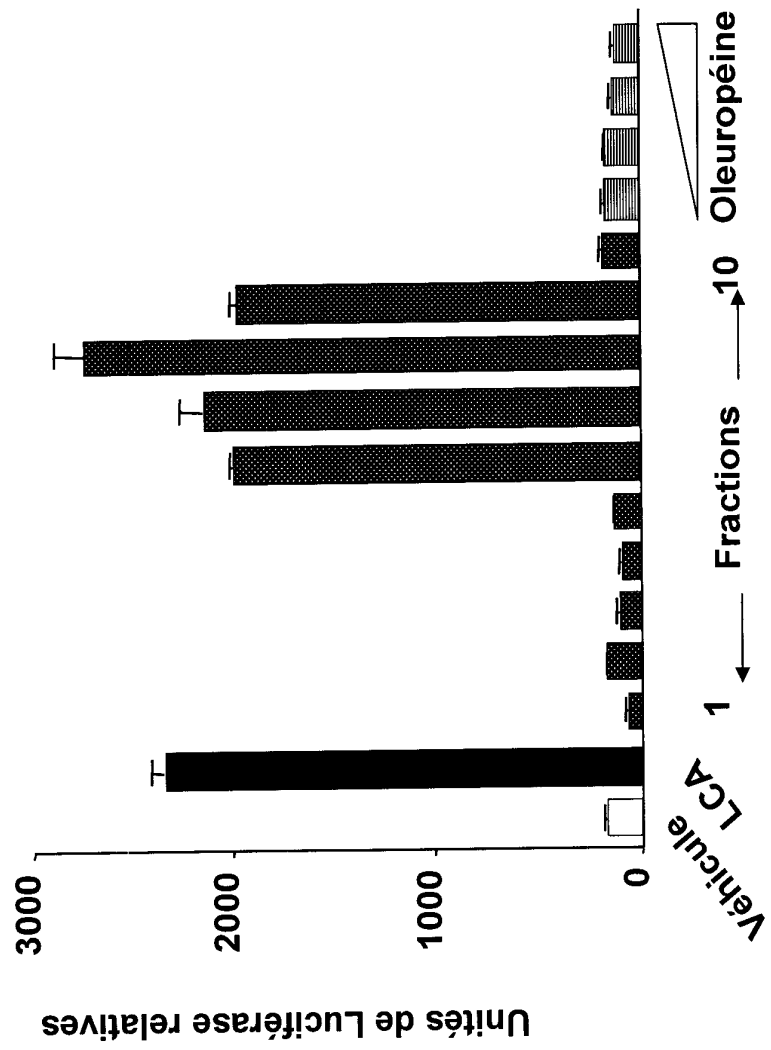
Figure 1

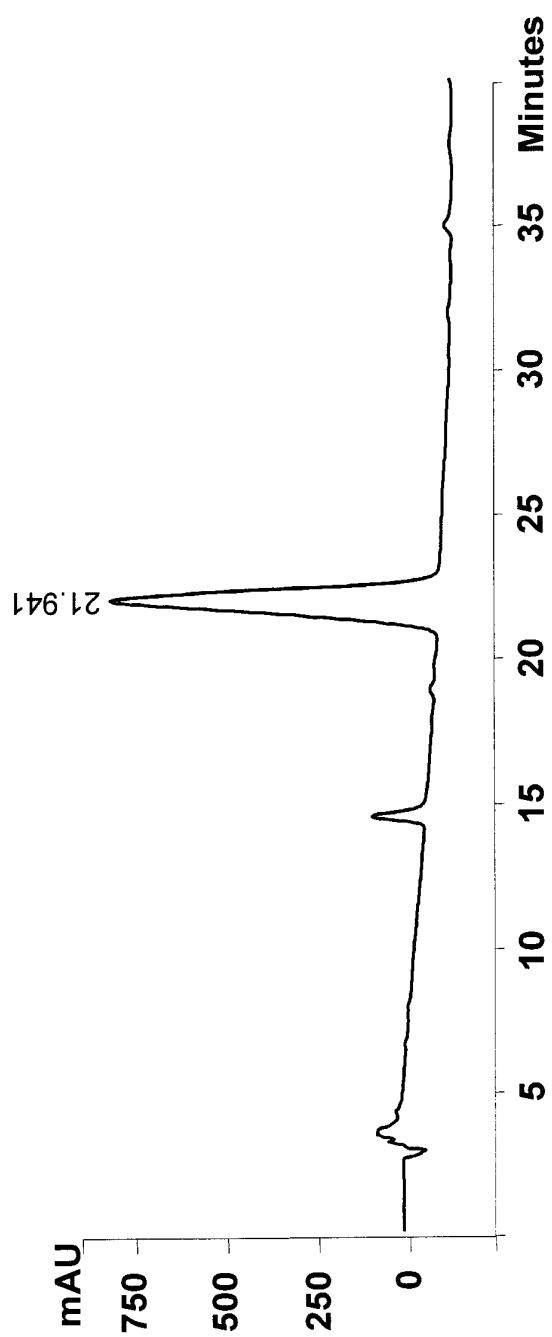
Figure 2

Figure 3

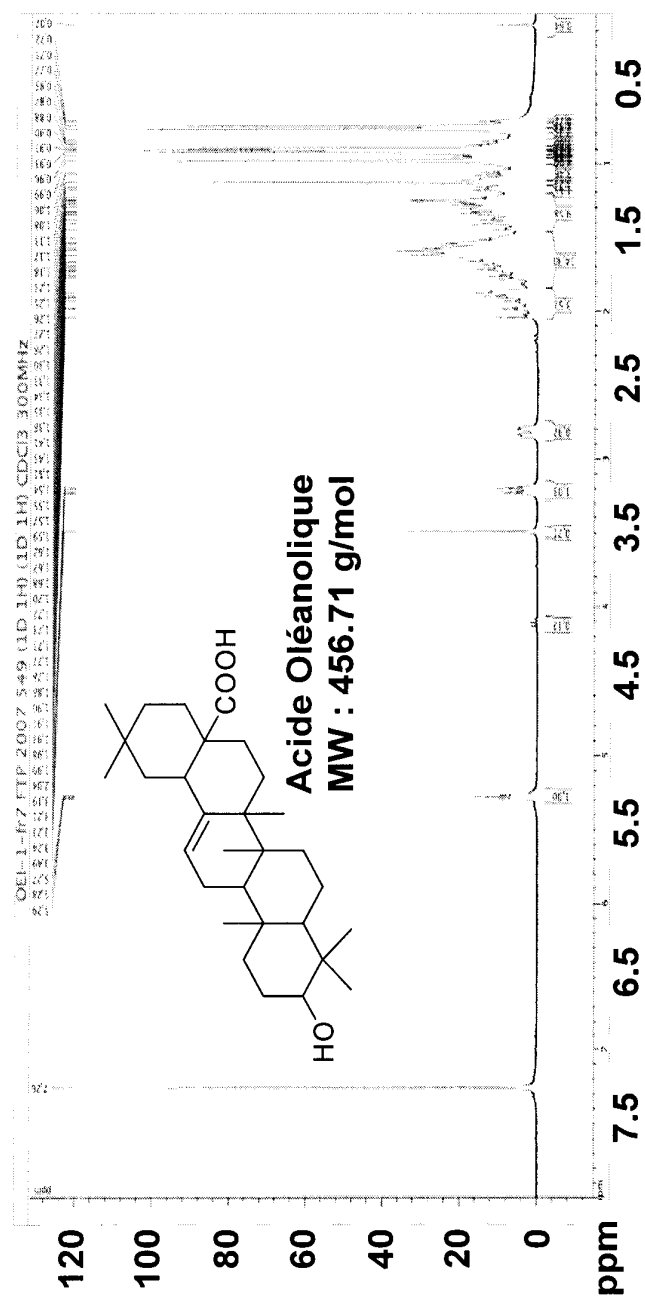


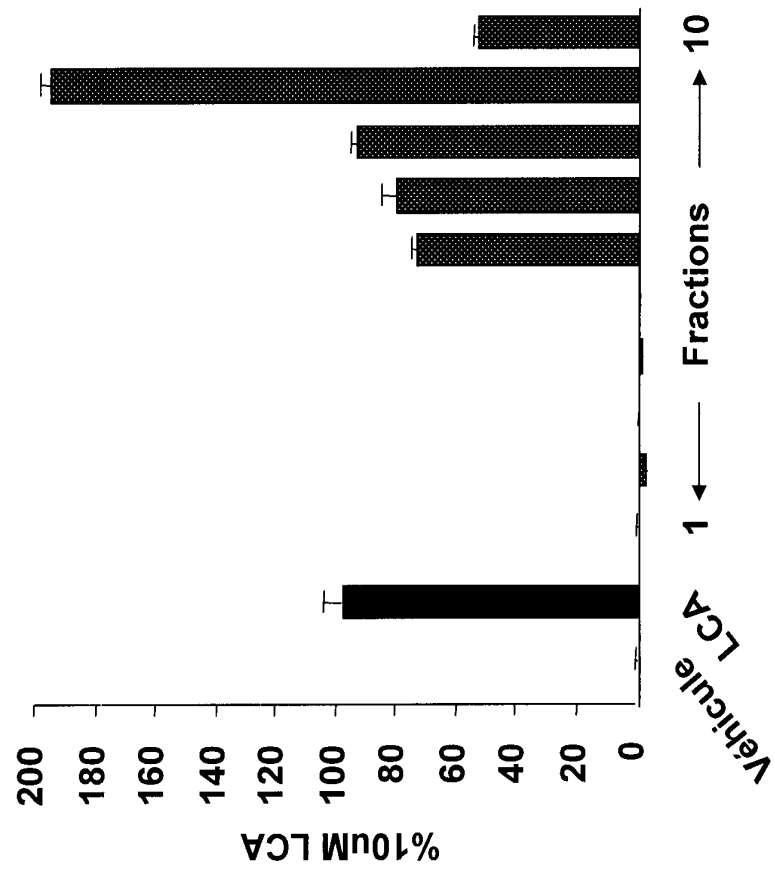
Figure 4

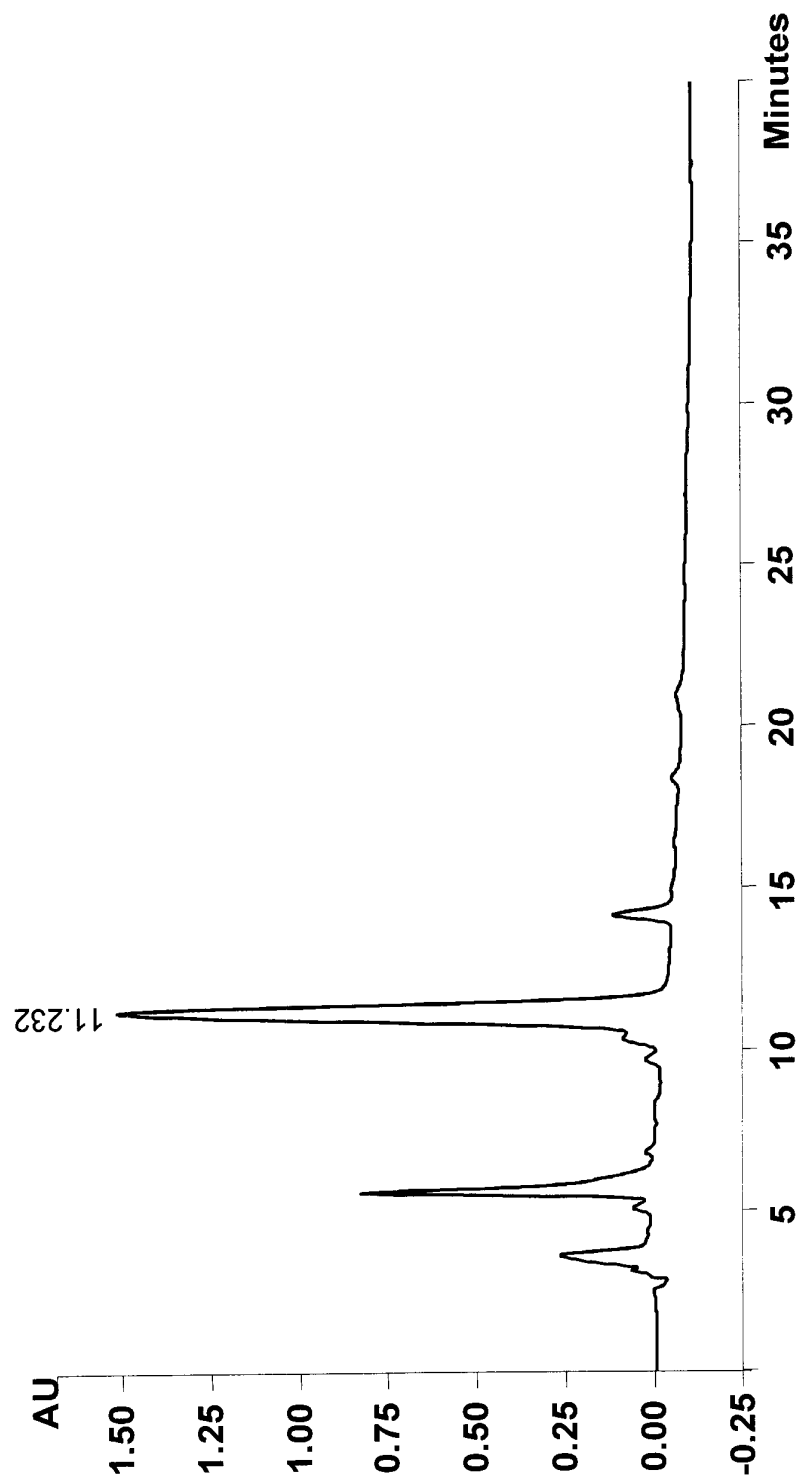
Figure 5

Figure 6

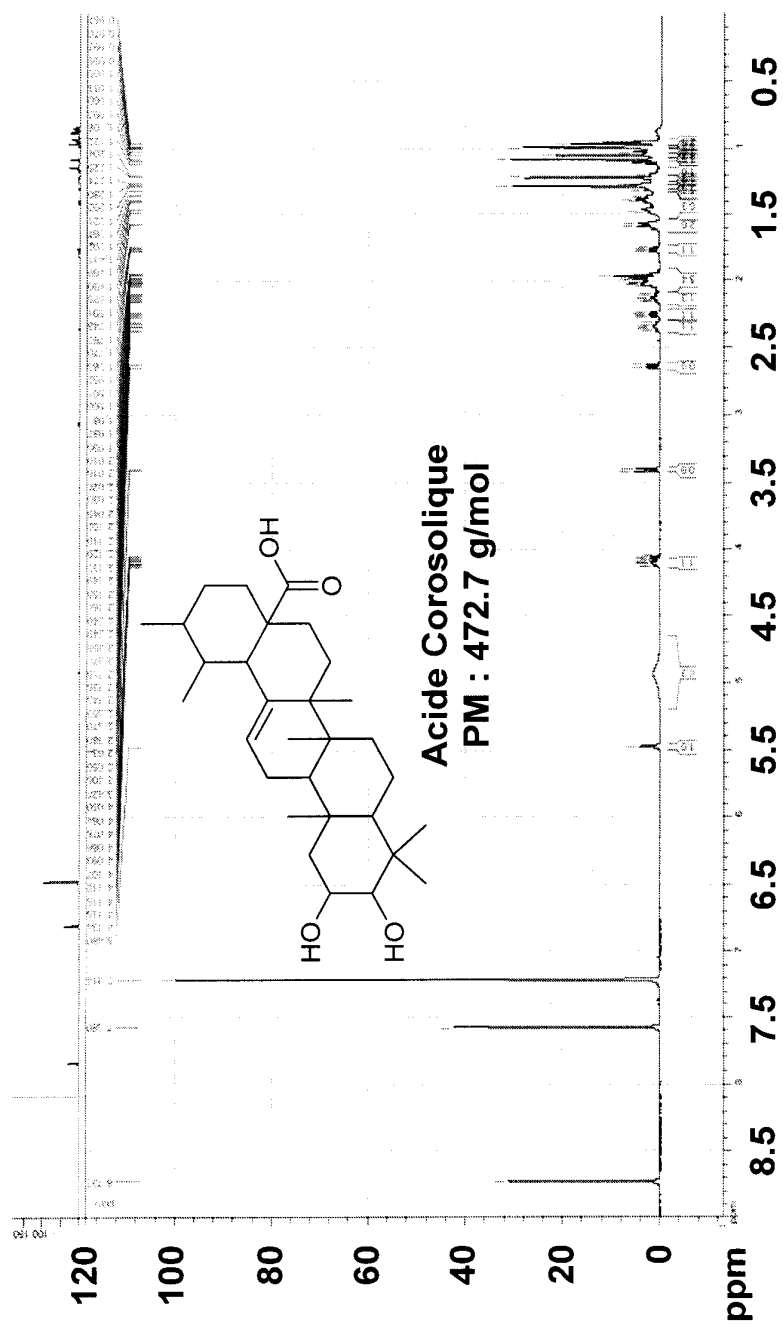


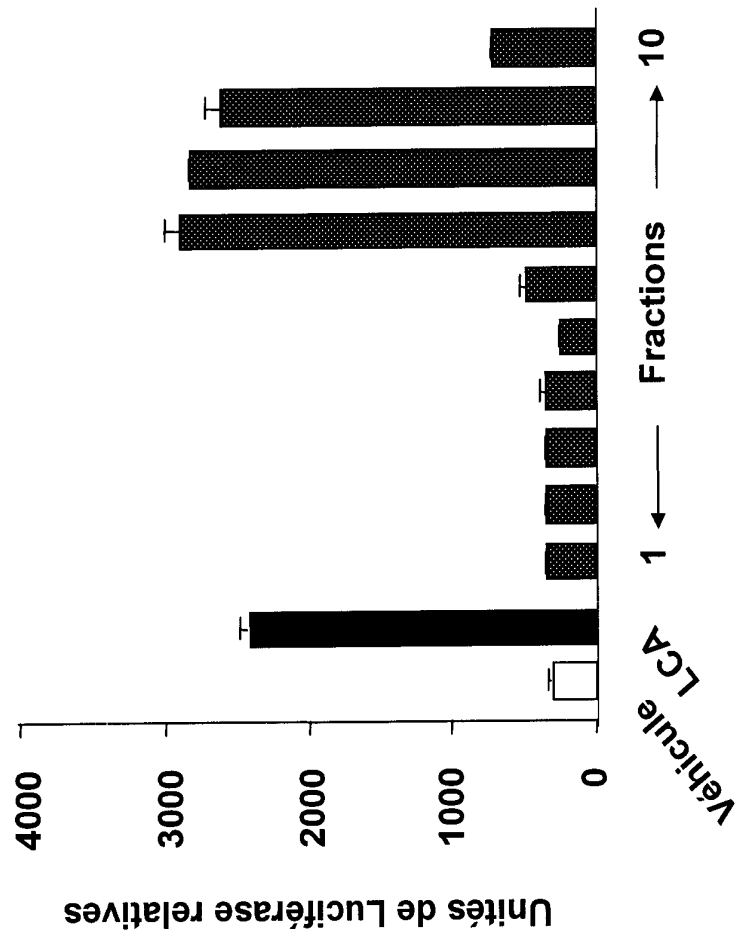
Figure 7

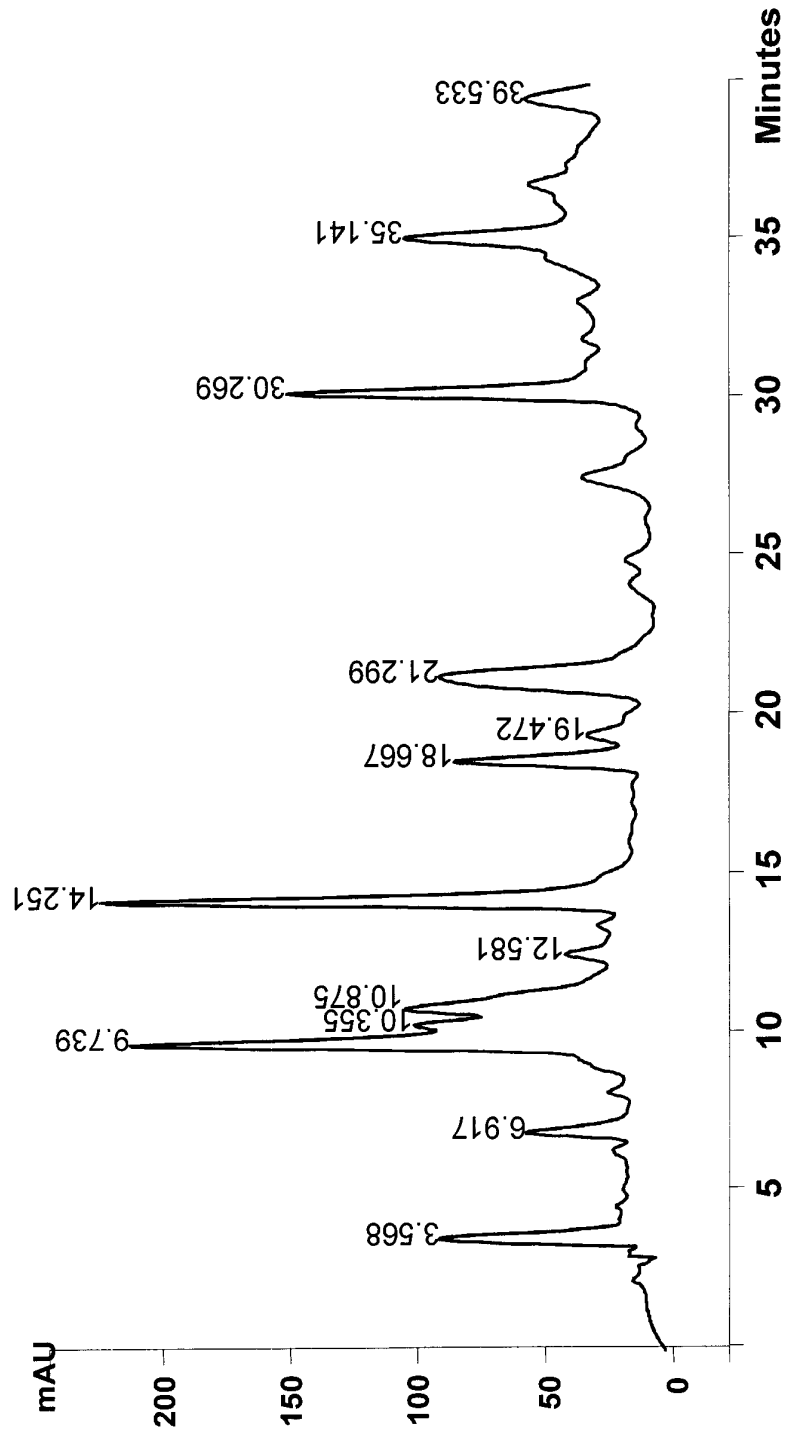
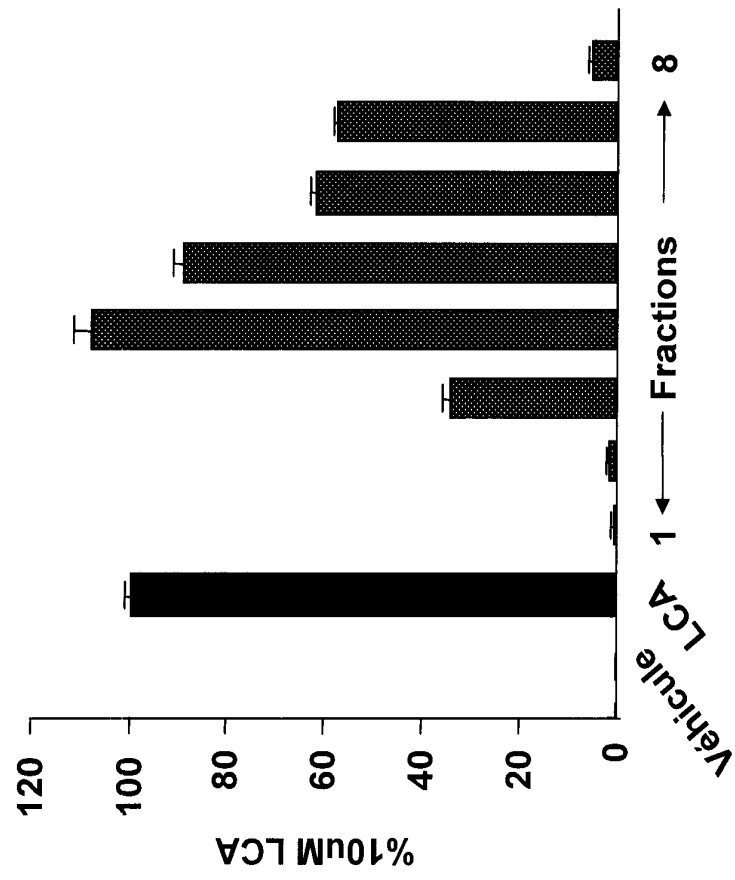
Figure 8

Figure 9

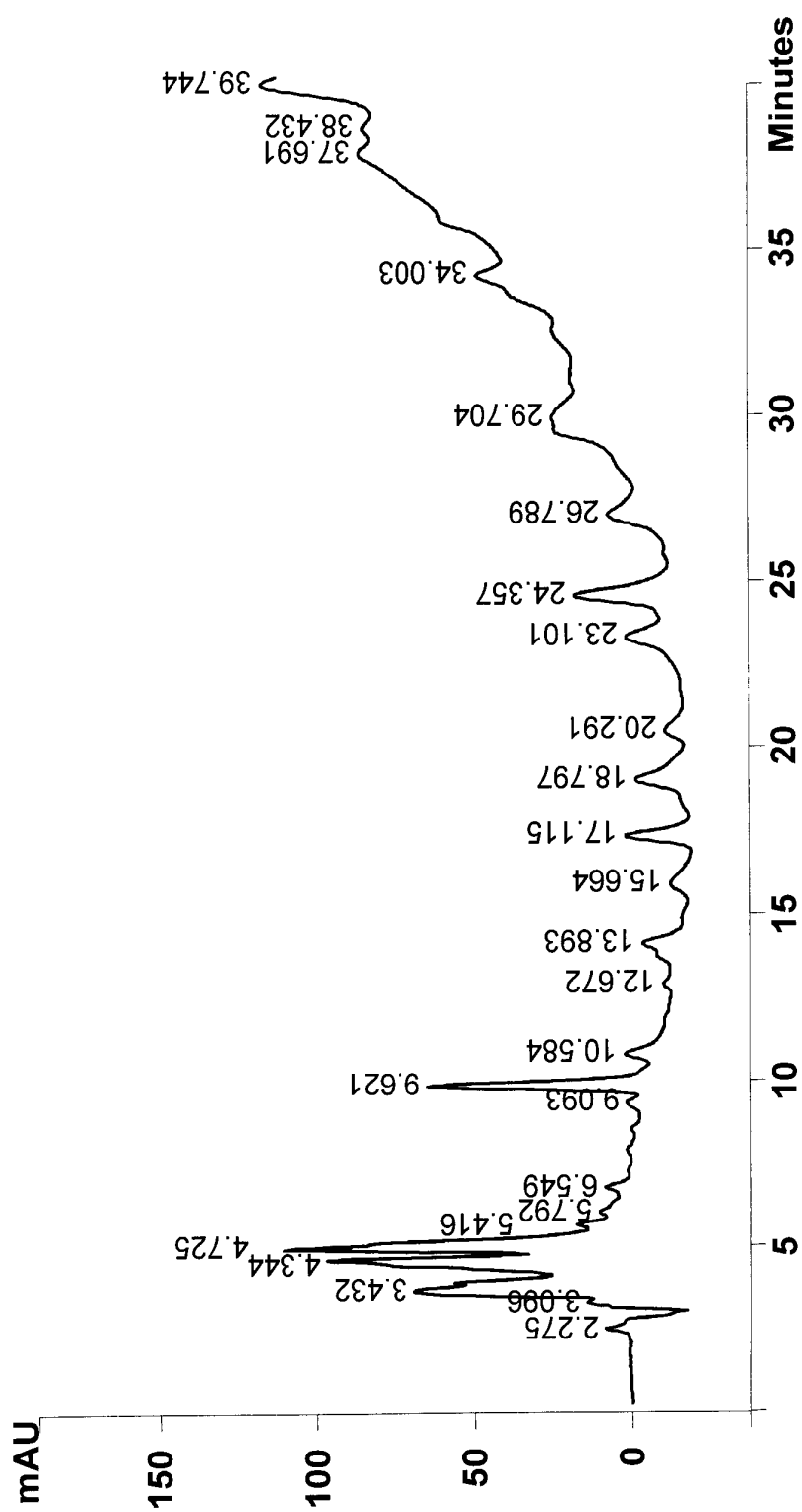
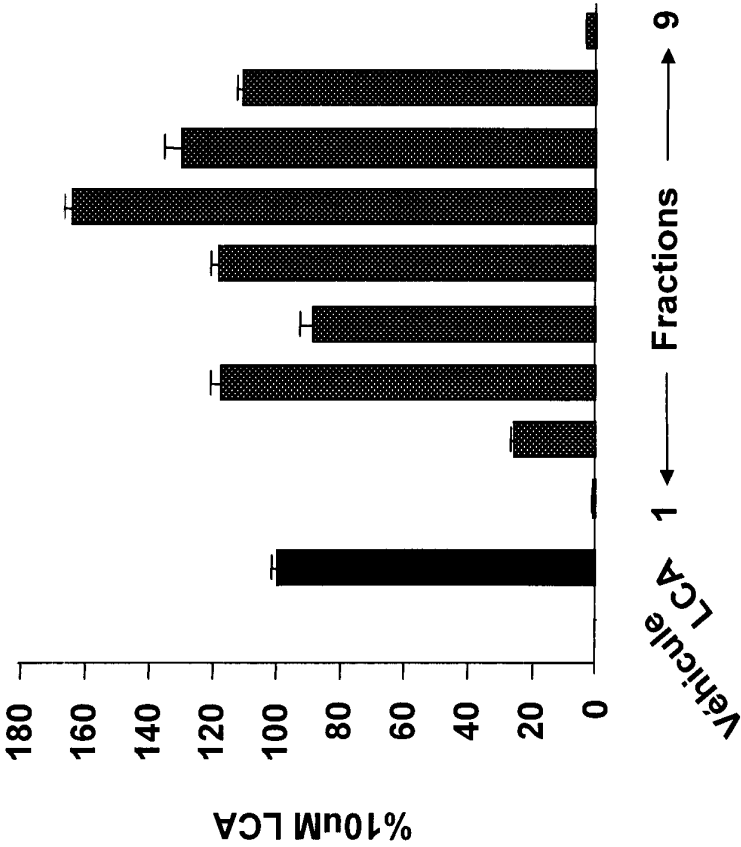


Figure 10

Figure 11



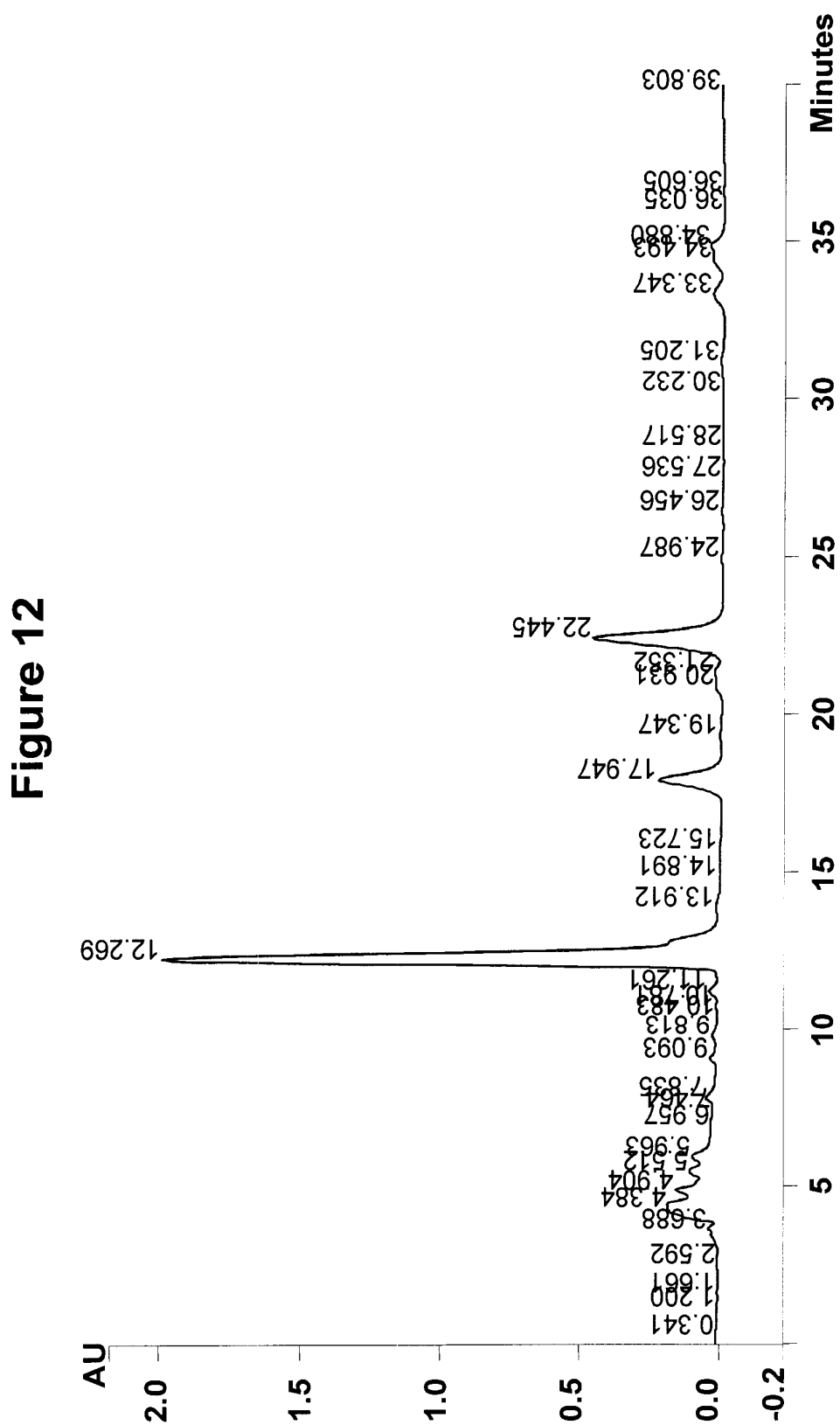


Figure 13

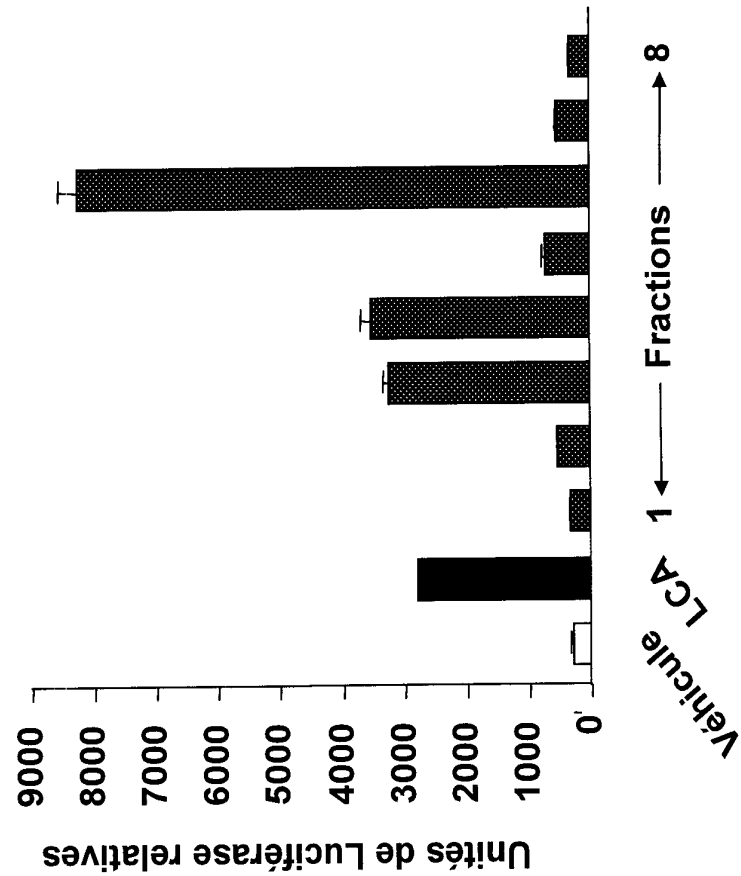


Figure 14

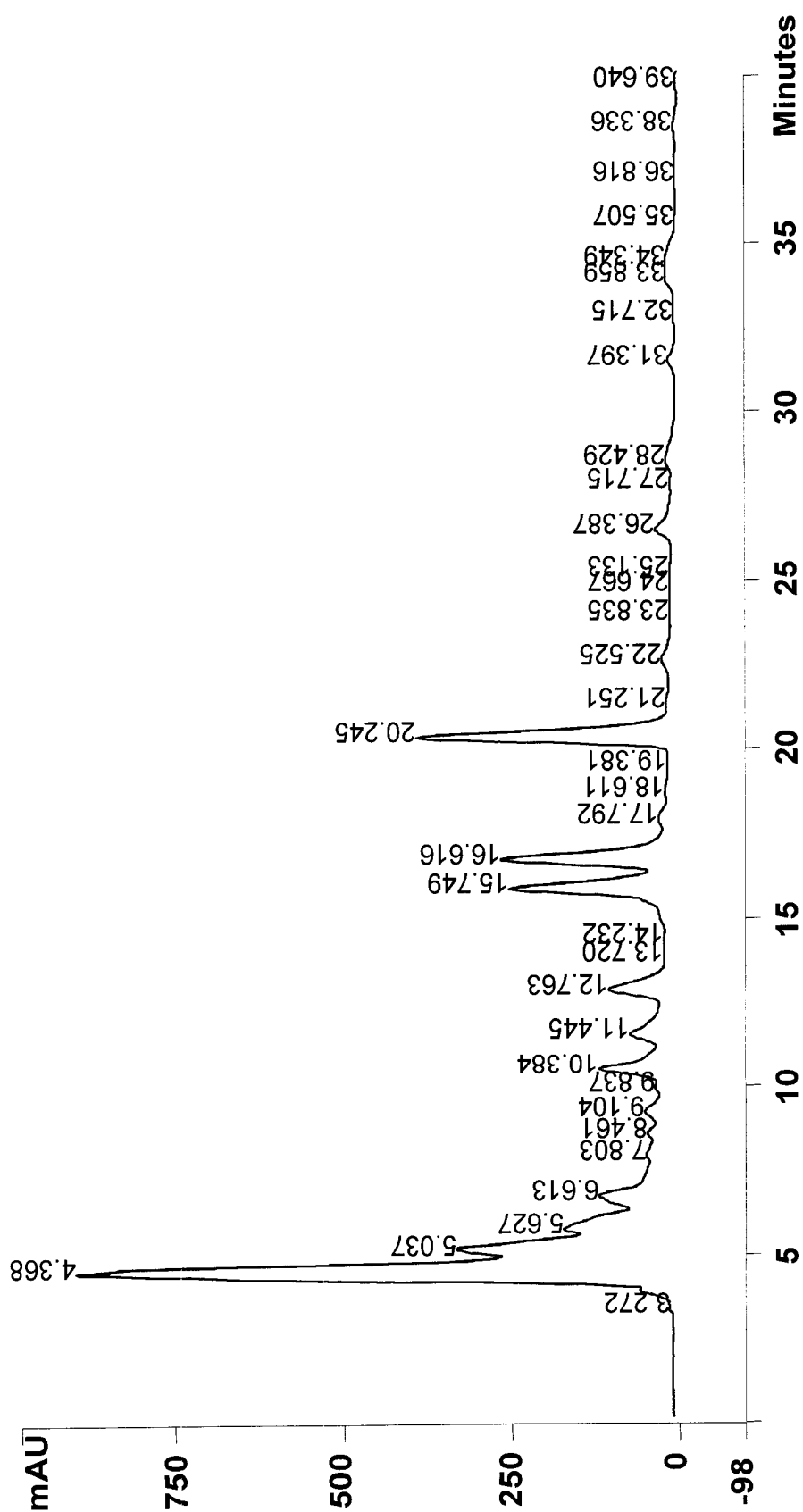


Figure 15