



Composés bioactifs

Effet thérapeutique de l'extrait aqueux de *Globularia alypum* suite à une insulino-toxicité induite *in vitro* sur les cardiomyocytes de *Rattus norvegicus*

Therapeutic effect of aqueous extract of *Globularia alypum* following *in vitro* insulin induced toxicity on *Rattus norvegicus* cardiomyocytes

Leila SMAÏL¹, Sihem BERDJA¹, Saka BOUALEM², Samia NEGGAZI¹, Saliha BOUMAZA¹, Ghouti KACIMI³, Lynda BOUDARÈNE², Souhila AOUICHAT BOUGUERRA.¹

¹Equipe de Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté des Sciences de la Nature, Université des Sciences et Technologies, Houari Boumediene. BP 32 DZ-16011 El Allia, Alger, Algérie. ²Laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnelle, Faculté de Chimie, Université des Sciences et Technologies, Houari Boumediene, Alger. ³Laboratoire de Biochimie, Hôpital Central de l'Armée, Alger.

Auteur correspondant : Leila.smail@yahoo.fr

Reçu le 06 juin 2017, Révisé le 23 juillet 2017, Accepté le 24 septembre 2017

Résumé Introduction. L'insulino-résistance, marquée par une réaction inflammatoire *via* la production de TNF- α et par l'hyperinsulinémie compensatoire, conduit à long terme à l'installation d'une glucolipotoxicité et du diabète de type 2. **Objectif.** Dans cette étude, les effets d'un extrait aqueux de *Globularia alypum* (*Ga*) a été analysé *in vitro*, suite à un stress induit sur le cardiomyocyte de *Rattus norvegicus*. **Matériel et Méthodes.** Le stress a été induit par addition d'une dose élevée d'insuline (10 UI/ mL). Les taux de prolifération ont été déterminés par comptage et les contenus cellulaires en monoxyde d'azote (NO), en malondialdéhyde (MDA) et en catalase ont été évalués. **Résultats.** En présence de la dose élevée d'insuline, les cardiomyocytes ont montré une diminution de la survie cellulaire, un déséquilibre du statut redox en faveur d'une augmentation de NO et de MDA et d'une diminution d'une enzyme du système antioxydant, la catalase. Suite à l'action de l'extrait de *Ga*, il a été noté une amélioration du taux de prolifération cellulaire, une diminution du taux de No et de MDA ainsi qu'une augmentation de l'activité de la catalase. **Conclusion.** L'état de stress induit sur le cardiomyocyte par l'insulino-résistance, mimé par la dose élevée d'insuline, entraîne des altérations physiologiques et biochimiques. Ces dernières, précurseurs de mort cellulaire par apoptose sont atténuées après addition d'un extrait de *Globularia alypum*, lequel pourrait constituer une cible thérapeutique en aval de l'installation du DT2.

Mots clés : Insuline, Stress oxydant, Polyphénols, *Globularia alypum*, thérapeutique

Abstract Introduction. Insulin resistance marked by an inflammatory response *via* TNF- α production and compensatory hyperinsulinemia leading to a long term installation of glucolipototoxicity and type 2 diabetes (2TD). **Objective.** In this study, the effect of *Globularia alypum* (*Ga*) aqueous extract *in vitro*, following an induced stress on the cardiomyocyte of *Rattus norvegicus*. **Material and Methods.** The stress was induced by the addition of a high insulin dose (10 UI/mL). The proliferation rate was analyzed by counting and the cellular contents of nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA) and catalase were determined. **Results.** In the presence of a high dose of insulin, cardiomyocytes showed decreased cell survival, imbalanced redox status in favor of increased NO and MDA and decreased catalase. Following the action of *Ga* aqueous extract, improvement in the rate of cell proliferation, decreased levels of NO and MDA and increased levels of catalase activity were noted. **Conclusion.** The state of stress on cardiomyocytes induced by insulin resistance, mimed by the high dose of insulin was marked by physiological and biochemical alterations. These, apoptosis precursors are attenuated after addition of *Globularia alypum* aqueous extract which may be a therapeutic target upstream on the installation of 2TD.

Keywords: *Insulin, Oxidative Stress, Polyphenols, Globularia alypum, Therapeutic.*

Introduction

Le diabète de type 2 est considéré comme une maladie polygénique avec une forte implication des facteurs environnementaux, tels que l'alimentation et la sédentarité [1]. L'intolérance au glucose, en association avec l'hyperinsulinémie et la résistance à l'insuline sont des caractéristiques précoces de la phase prédiabétique [1,2]. La conception traditionnelle de la pathogenèse du diabète de type 2 est que l'hyperinsulinémie se produit, en conséquence de l'insulino-résistance [1]. Par ailleurs, il est établi que la résistance à l'insuline est médiée par les acides gras et les cytokines inflammatoires [4,5]. Selon Polonsky *et al.* [6], l'hyperinsulinémie compensatoire est une défense incontournable et rapide de l'organisme contre la résistance à l'insuline et ce, afin de maintenir l'homéostasie du glucose.

Globularia alypum est une plante sauvage appartenant à la famille des Globulariaceae, c'est un arbuste vivace qui se trouve dans toute la région méditerranéenne [7,8]. Dans la pharmacopée traditionnelle algérienne,

Globularia alypum appelée localement "Ain Larnab" est l'un des plus traditionnels remèdes végétaux, ses feuilles sont traditionnellement utilisées comme un agent hypoglycémiant [9,10] ; elle est également utilisée dans le traitement des maladies cardiovasculaires et rénales [8,11].

Pour notre part, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet thérapeutique d'un extrait aqueux de *Globularia alypum in vitro*, sur le cardiomyocyte de *Rattus*

norvegicus soumis à une dose supra-physiologique d'insuline mimant un état hyperinsulinémique.

Matériel et méthodes

Préparation de l'extrait aqueux de *Globularia alypum*

La partie aérienne de *Globularia alypum* correspond au spécimen Voucher (INA / P / n ° 6), conservée dans l'herbier du Département de Botanique, de l'Institut National Agronomique (INA), Alger - Algérie. L'extrait aqueux a été préparé par décoction et lyophilisé (80 Cryodos, -75 °C, 5 m³/ h). Le rendement obtenu est de 0,15 %. L'extrait a été stocké dans des flacons en verre scellés à $\pm 4^{\circ}\text{C}$ avant d'être testé et analysé. Cette partie a été réalisée en collaboration avec le laboratoire d'analyse organique fonctionnelle de la Faculté de chimie de l'USTHB.

Détermination des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux dans l'extrait aqueux de *Ga* est déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode de Singleton *et al.*, (1999), en utilisant l'acide gallique comme référence. Une aliquote de 0,2mL de l'extrait aqueux correspondant à 1000 μg de *Ga* est mélangé à 46mL d'eau distillée et 1mL de réactif de Folin-Ciocalteu. Le mélange est incubé durant 3 min dans l'obscurité puis 3mL d'une solution de carbonate de sodium (7,5%) sont ajoutés à ce dernier. Après 2h

d'incubation à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 740 nm. Le contenu phénolique total est évalué à partir d'une courbe étalon d'acide gallique et les résultats sont exprimés en microgrammes d'acide gallique (GA) équivalents (E) par milligramme d'extrait (μg GAE/mg) [12].

Détermination des flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes totaux sont déterminés selon la méthode décrite par Djouahri *et al.*, (2014), en utilisant la quercétine comme référence. Quatre mL de *Ga* sont mélangés à 4 mL d'une solution de trichlorure d'aluminium (2 % dans du méthanol). Après 15 min d'incubation, l'absorbance est mesurée à 415 nm. Le contenu en flavonoïdes totaux est évalué à partir d'une courbe étalon de quercétine et les résultats sont exprimés en microgrammes de quercétine (Q) équivalents (E) par milligramme d'extrait (μg QE/mg) [13].

Activité antioxydante ou effet piégeage sur le radical DPPH par l'extrait aqueux de *Ga*

L'évaluation de l'action du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est réalisée par la méthode décrite par Brand, (1995) [14], basée sur la dégradation du radical DPPH (diphényl-1-picrylhydrazyl) solubilisé dans un mélange méthanol/eau à 80%. Un antioxydant aura la capacité de céder un électron au radical synthétique DPPH (coloration violette) pour le réduire en DPPH non radicalaire (coloration jaune-verte). La mesure de la décroissance de la coloration violette au bout de 30 min d'incubation permet de déterminer le pourcentage d'inhibition par rapport au blanc dont l'absorbance ne varie pas. L'extrait aqueux de *Ga* est dissout dans le méthanol et une gamme de concentrations déterminées (100, 200, 400, 600, 800 et 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) est réalisée. Vingt-cinq μL de chaque concentration sont ajoutés à la solution de DPPH méthanol (60 μM , 975 μL). Après 30 min d'incubation à 25 °C, l'absorbance est mesurée à 517 nm. L'acide ascorbique et l' α -tocophérol sont utilisés comme référence des composés. La capacité de piégeage du DPPH par l'extrait aqueux de *Ga* est calculée à partir de l'équation suivante : % de l'activité de piégeage des radicaux = [(Abs blanc - Abs échantillons) / Abs blanc] x 100.

Culture des cardiomyocytes

Les rats *Rattus norvegicus* de sexe mâle proviennent de l'animalerie de la Faculté des Sciences Biologiques de l'USTHB. Les conseils pour la protection et l'utilisation des animaux de laboratoire sont suivis [15]. Le protocole et l'utilisation des rats ont été approuvés par le Comité d'Ethique de notre Institution. Le poids moyen des rats est de 155,10 \pm 31,83g. Ces animaux sont anesthésiés et sacrifiés, le cœur prélevé dans des conditions d'asepsie est

immédiatement plongé dans une boîte de Pétri contenant du DMEM (Dulbecco Medium essentiel minimum of Eagle) à 10% de sérum de veau foetal (SVF) additionné de 1% d'antibiotiques (ATB) (streptomycine 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pénicilline 50 UI/mL, Sigma, USA), 1,2% de glutamine (Sigma, USA) et 5% d'hépès pour le maintien du pH. Le ventricule séparé des oreillettes est fragmenté en explants de 2 à 3 mm d'épaisseur. Ces derniers, après une incubation de 30 min en présence de trypsine à 1% (Gibco, USA) pendant 15 mn pour digérer la trame matricielle, sont placés dans des flacons de culture de type flasks, contenant du DMEM additionné de 20% de SVF, 1,2% glutamine et 1% d'antibiotiques permettant la mise en route de la primoculture, dans un incubateur à 37°C, sous atmosphère humidifiée à 95% d'air et 5% de CO₂. Lorsque les aires de prolifération confluent et forment un tapis cellulaire, il a été procédé à une trypsination ; l'action de la trypsine (1%) facilite la séparation des cellules les unes des autres et leur détachement du support. La suspension obtenue permet le premier ensemencement correspondant au 1^{er} passage, c'est la mise en route de la culture secondaire. Chaque nouvel ensemencement correspond à un nouveau passage. Au 5^{ème} passage de la culture secondaire et à confluence, les cardiomyocytes sont mis en suspension après trypsination et sont ensemencés à raison de 1.5 x 10⁶ cellules par flask, dans du DMEM supplémenté de 10% SVF, 1.2% glutamine, 1% ATB. Plusieurs lots de cellules sont constitués : lot témoin, lot soumis à 10 UI/mL d'insuline pendant 6h et lot soumis à l'insuline puis traité à l'extrait aqueux de *Ga* pendant 24h.

Etude de la prolifération

Au 5^{ème} passage, les cardiomyocytes sont mis en suspension, après trypsination et incubés pendant 48 h. Au-delà de cette étape, les cellules soumises aux différentes conditions expérimentales sont trypsinées et l'évaluation du taux de prolifération est effectuée sur 100 μL de la suspension cellulaire par comptage sur cellule de Mallasez.

Étude morphométrique

Au terme des différentes conditions expérimentales, le milieu est éliminé et les cellules sont lavées au PBS 1x et fixées au Bouin aqueux pendant 30 min. Après rinçage au PBS et à l'alcool (96°), les cellules sont colorées pendant 10 min par une solution de May-Grunwald-Giemsa (V/V, 1/1, Fluka) diluée au 1/3 dans de l'eau distillée. L'excès de colorant est éliminé par le PBS 1x. L'observation est réalisée sur microscope inversé (Zeiss).

Etude des paramètres du statut redox

Dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS)

Le dosage des TBARS est réalisé selon la méthode de Heath et Packer (1968). Les produits de la peroxydation lipidique les plus couramment dosés sont les aldéhydes, en particulier le MDA. Ce dernier est dosé dans les compartiments intracellulaires des cardiomyocytes témoins et ceux soumis à l'insuline (10 UI/mL) pendant 6 h ainsi que ceux soumis à l'insuline et traités à l'extrait aqueux de *Ga*, après lyse en présence de triton X100 (Sigma) et réaction avec l'acide thiobarbiturique (TBA) à 95°C [15]. Les lysats sont centrifugés à 10000xg pendant 20 minutes à 4°C dans un tampon ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 0,2 M, pH 6,5. Le MDA contenu dans les surnageants, en présence de l'acide trichloracétique à 10%, réagit avec le TBA et entraîne la formation d'un complexe coloré à 532 nm. La quantité de MDA est extrapolée à partir d'une gamme étalon et évaluée en μmol .

Dosage du NO

Du fait de sa demi-vie très courte, la formation du NO est classiquement évaluée de manière indirecte par la détermination des concentrations des nitrites (NO_2^-) et des nitrates (NO_3^-) qui constituent les produits de dégradation oxydative du NO. Les différents lots de cardiomyocytes sont déprotéinisés par centrifugation à 10000 g pendant 10 minutes à 20°C. La détermination des nitrites et des nitrates est directement réalisée à partir du surnageant obtenu. La réaction de Griess permet de mesurer uniquement les nitrites. Les nitrates devront donc être préalablement réduits en nitrites pour être quantifiés. La concentration ainsi mesurée représente la somme des nitrites et des nitrates. La transformation des nitrates en nitrites est basée sur une réaction de réduction par le cadmium lequel est régénéré à l'aide d'une solution de sulfate de cuivre CuSO_4 5 mM dans un tampon glycine-NaOH, par contact pendant 5 minutes. Les nitrites contenus dans les compartiments intracellulaires déprotéinisés et régénérés sont quantifiés après addition du réactif de Griess [0,1 % N-(1 naphthyl) ethylènediamine dihydrochloride, 1 % sulfanilamide, et 5 % acide phosphorique]. La lecture des DO est effectuée à 543 nm [16]. Une gamme étalon est réalisée avec du nitrite de sodium (NaNO_2).

Dosage de l'activité enzymatique de la catalase

L'activité enzymatique de la catalase est déterminée par la méthode de Clairborne, (1985) ; elle est basée sur la mesure de la disparition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) du fait de l'activité de cette enzyme [18], par la préparation dans une cuve de mesure en quartz, une solution substrat composée de tampon phosphate (KH_2PO_4), pH 7,4), du H_2O_2 et de la source

enzymatique (compartiment intracellulaire). La lecture est effectuée à 560 nm chaque minute pendant 2 minutes. L'activité enzymatique est exprimée en UI/mg de protéine.

Analyse Statistique

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes affectées de l'écart type. L'étude statistique a été réalisée par comparaison de deux moyennes par le test de Student : * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

Résultats

Étude des composants de l'extrait aqueux de *Ga*

Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux

L'extrait aqueux de *Ga* présente une teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes, respectivement équivalentes à $32,50 \pm 0,10 \mu\text{g GAE/mg}$ et $14,96 \pm 0,20 \mu\text{g QE/mg}$ (Tableau I).

Activité antioxydante ou effet piégeage par le DPPH

L'activité antioxydante a été évaluée par le dosage du DPPH dans l'extrait aqueux de *Ga* comparativement aux contrôles positifs antioxydants synthétiques, le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT). L'extrait aqueux de *Ga* a montré une activité anti-radicalaire d'une IC 50 de $40,03 \pm 0,09 \mu\text{g / mL}$, cette activité est faible, comparé à l'effet antioxydant du BHA et du BHT dont les IC50 sont respectivement de $21,28 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$ et $12,76 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$ (Tableau I).

Tableau I. Teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes et activité antioxydante de l'extrait aqueux de *Globularia alypum*

Echantillon Et standards	Polyphénols totaux ($\mu\text{g GAE/mg}$)	Flavonoïdes totaux ($\mu\text{g QE/mg}$)	DPPH (IC50) ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Ga</i>	$32,50 \pm 0,10$	$14,96 \pm 0,20$	$40,03 \pm 0,09$
BHA			$21,28 \pm 0,12$
BHT			$12,76 \pm 0,08$

Les valeurs sont les moyennes affectées de l'écart-type. GAE : Equivalent en acide Gallique ; QE : équivalent en quercétine ; BHA : Butylhydroxyanisole et BHT Butylhydroxytoluène.

Evaluation des taux de prolifération

Les résultats ont montré une diminution hautement significative du taux de prolifération des cardiomyocytes

de *Rattus norvegicus* après 48 h d'incubation puis soumis à 10 UI/mL d'insuline pendant 6 h, par rapport à leurs témoins correspondants (Fig. 1).

Par ailleurs, une augmentation hautement significative du taux de prolifération des cardiomyocytes après 48 h d'incubation, a été observée en présence d'insuline à raison de 10 UI/mL durant 6h puis traités à l'extrait aqueux de *Ga* pendant 24 h par rapport à leurs témoins correspondants. Peu de variations sont enregistrées entre les témoins soumis à *Ga* (témoins + *Ga*) et les témoins correspondants (témoins).

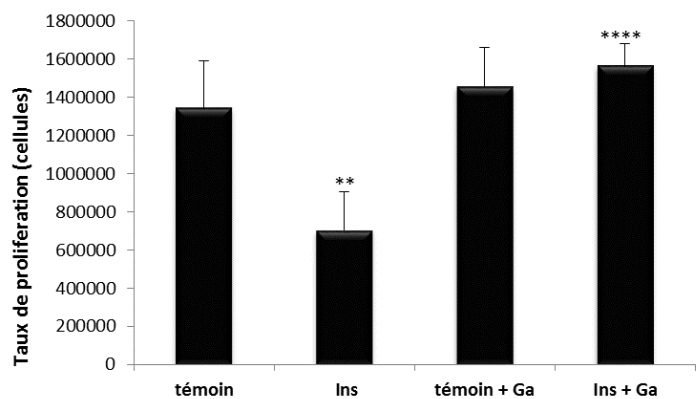


Fig. 1. Evaluation des taux de prolifération des cardiomyocytes de *Rattus norvegicus*, en culture

Ins : Cardiomyocytes soumis à 10 UI/mL d'insuline pendant 6h. *Témoin*

+ *Ga* : Cardiomyocytes traités à l'extrait aqueux de *Globularia alypum*. *Ins + Ga* : soumis à 10 UI/mL d'insuline pendant 6h puis traités à l'extrait de *Globularia alypum* pendant 24h. Les valeurs représentent les moyennes de six déterminations et sont affectées de l'écart type.

** $P < 0,05$ *Ins* vs *Témoin*. **** $P < 0,0001$ *Ins + Ga* vs *Ins*.

Etude morphologique

Les cardiomyocytes de *Rattus norvegicus* incubés pendant 48 h et soumis à 10 UI/mL d'insuline pendant 6 h et ceux soumis à l'insuline puis traités par *Ga* pendant 24 h par rapport à leurs témoins correspondants, ont montré de grandes variations morphologiques et fonctionnelles marquées essentiellement par une taille qui semble augmentée indiquant une hypertrophie ; une vacuolisation cytosolique due à l'oncose ; une densification de la chromatine, une fragmentation des noyaux ainsi qu' un bourgeonnement de la membrane plasmique, signes d'apoptose (Fig. 2).

Evaluation du MDA

Les résultats ont montré une augmentation hautement significative des taux de MDA contenus dans les compartiments intracellulaires des cardiomyocytes de *Rattus norvegicus* après 48 h d'incubation puis soumis à 10 UI/mL d'insuline pendant 6 h par rapport à leurs

témoins correspondants. Concernant les cardiomyocytes soumis à l'insuline durant 6 h et traités par *Ga*, une diminution significative des taux de MDA est notée (Fig. 3).

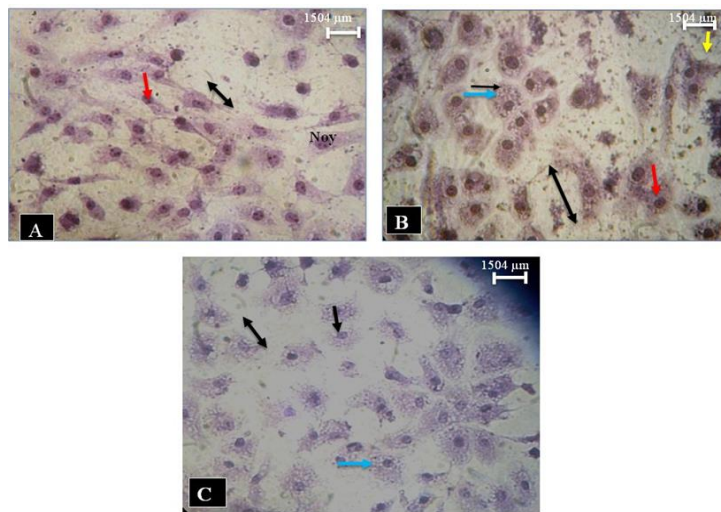


Fig. 2. Cardiomyocytes de *Rattus norvegicus*, en culture *Témoins* (A), soumis à 10 UI/mL d'insuline pendant 6 h (B) et ceux soumis à l'insuline puis traités à l'extrait aqueux de *Globularia alypum* (*Ga*) (C) fixés au Bouin aqueux et colorés au MGG.

↔ Taille des cardiomyocytes, → condensation de chromatine, → vacuolisation cytoplasmique, → nombre de nucléole, → bourgeonnement membranaire.

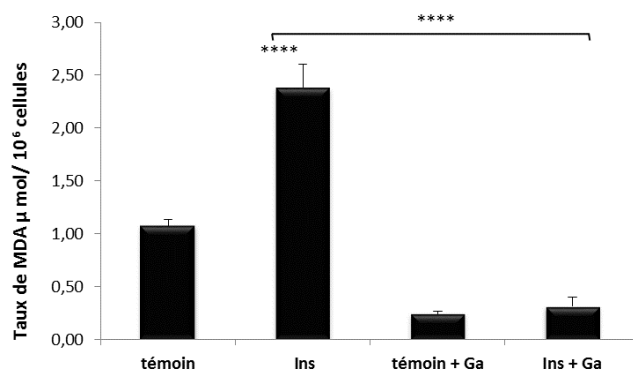


Fig. 3. Evaluation des taux de MDA (µmole / 10⁶ cellules) contenus dans les compartiments intracellulaires des cardiomyocytes de, *Rattus norvegicus*, en culture.

Ins : Cardiomyocytes soumis à 10 UI/mL d'insuline pendant 6h. *Témoin + Ga* : Cardiomyocytes traités à l'extrait aqueux de *Globularia alypum*. *Ins + Ga* : soumis à 10 UI/mL d'insuline pendant 6h puis traités à l'extrait de *Globularia alypum* pendant 24h. Les valeurs représentent les moyennes de six déterminations et sont affectées de l'écart type. **** $P < 0,000$ *Ins* vs *Témoins* ; *Ins + Ga* vs *Ins*.

Par ailleurs, les résultats ont indiqué une diminution des taux de MDA dans le lot de cellules témoins soumis à *Ga* comparativement à leurs témoins correspondants ($0,73 \pm$

0,03 vs $0,86 \pm 0,08 \mu\text{mole}/10^6$ cellules).

Par ailleurs, les cardiomyocytes soumis à l'insuline puis traités par l'extrait aqueux de *Ga* pendant 24h ont montré une diminution significative du taux de NO, comparé à leurs témoins correspondants. Le taux de NO contenu dans le compartiment cellulaire des témoins soumis à *Ga* est comparable à celui des témoins (Fig. 4).

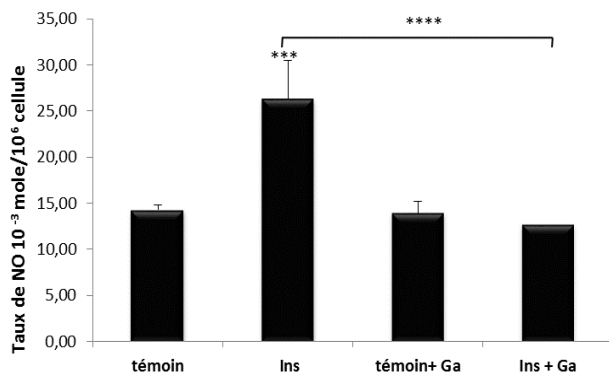


Fig. 4. Evaluation des taux de monoxyde d'azote ($\times 10^{-3}$ $\mu\text{mole}/10^6$ cellules) contenus dans les compartiments intracellulaires des cardiomyocytes, de *Rattus norvegicus*, en culture

Ins : Cardiomyocytes soumis à 10 UI/mL d'insuline pendant 6h. *Témoin + Ga* : Cardiomyocytes traités à l'extrait aqueux de *Globularia alypum*. *Ins + Ga* : soumis à 10 UI/mL d'insuline pendant 6h puis traités à l'extrait de *Globularia alypum* pendant 24h. Les valeurs représentent les moyennes de six déterminations et sont affectées de l'écart type. * $P \leq 0,01$ pour *Ins* vs témoins. **** $P < 0,0001$ *Ins + Ga* vs *Ins*.

Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase

Une diminution hautement significative de l'activité de la catalase est notée dans les compartiments intracellulaires des cardiomyocytes de *Rattus norvegicus* après 48 h d'incubation puis soumis à l'insuline pendant 6 h par rapport à leurs témoins correspondants. Par ailleurs, les cardiomyocytes soumis à l'insuline puis traités à l'extrait aqueux de *Ga* pendant 24 h ont montré une augmentation hautement significative de l'activité de la catalase comparativement aux témoins correspondants (Fig. 5) et elle est 2-fois plus élevée chez les témoins soumis à *Ga* par rapport à leurs témoins correspondants.

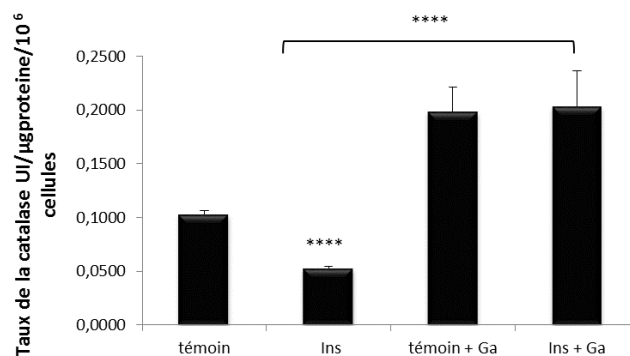


Fig. 5. Evaluation l'activité enzymatique de la catalase (Cat) (UI/min /mg) dans les compartiments intracellulaires des cardiomyocytes, de *Rattus norvegicus*, en culture.

Ins : Cardiomyocytes soumis à 10 UI/mL d'insuline pendant 6h. *Témoin + Ga* : Cardiomyocytes traités à l'extrait aqueux de *Globularia alypum*. *Ins + Ga* : soumis à 10 UI/mL d'insuline pendant 6h puis traités à l'extrait de *Globularia alypum* pendant 24h. Les valeurs représentent les moyennes de six déterminations et sont affectées de l'écart type. **** $P < 0,0001$ pour *Ins* vs témoins et *Ins + Ga* vs *Ins*.

Discussion

L'étude in vitro, réalisée sur les cardiomyocytes de *Rattus norvegicus* incubés pendant 48h puis soumis pendant 6h à une dose de 10 UI/mL d'insuline a montré une diminution significative du taux de prolifération par rapport aux témoins correspondants. Ces résultats rejoignent les travaux de Smail *et al.*, (2012) réalisés sur les fibroblastes adventitiels de *Psammomys obesus* soumis à la même dose d'insuline [19]. Cette diminution du taux de prolifération cellulaire serait en relation avec une augmentation de la mort cellulaire via le processus apoptotique, observé morphologiquement via l'apparition d'oncose, de condensation de la chromatine périnucléaire et du bourgeonnement membranaire [19-20]. Selon Chi *et al.*, (2000), l'apoptose serait favorisée par l'activation des voies des caspases et celle de Bax dépendante qui diminuent l'expression du récepteur de l'insuline, entraînant ainsi une diminution de la captation de glucose[21].

Carayannopoulos *et al.*, (2000), rapportent que l'augmentation de l'apoptose est aussi le résultat d'une diminution de l'expression des récepteurs d'IGF-1

et qui serait liée à une diminution de l'absorption du glucose en rapport avec l'insulinorésistance [22]. L'addition de l'extrait de *Ga* semble améliorer le taux de survie des cardiomyocytes soumis à 10 UI/mL d'insuline et serait en faveur d'une réduction du processus apoptotique. En effet, nos résultats ont montré une augmentation significative des taux de prolifération. Selon Berdja *et al.*, (2016), les polyphénols contenus dans *Brassica rappa* augmentent les taux de la MAPKp38 (Mitogene activated protein kinases) et diminuent ceux de ERK1/2 (Extracellular signal-regulated Kinases) impliquées respectivement dans la différenciation et la prolifération ; elles induisent aussi la diminution du cytochrome c, marqueur de l'apoptose *via* la voie intrinsèque mitochondriale [23]. Dans notre étude, les résultats ont montré une exacerbation des taux de MDA au niveau du compartiment intracellulaire des cardiomyocytes incubés pendant 48 h et soumis à une dose élevée d'insuline à raison de 10 UI/mL pendant 6h, confirmant qu'une situation d'insulinotoxicité induit l'installation d'un stress oxydant marqué. Ces résultats rejoignent ceux des travaux d'Uma & Ishwarlal, (2008) qui ont noté une augmentation des taux de MDA dans l'hépatocyte des rats rendus diabétiques [24]. Par ailleurs, l'administration de l'extrait aqueux de *Ga* a induit une diminution significative de MDA. Ces résultats rejoignent de nombreuses études notamment celle de Cai *et al.*, (2003) qui a montré que l'administration du resvératrol (polyphénol) (10mg/kg) aux rats témoins induit une diminution de 16 % du taux de MDA contenus dans le foie, alors que son administration aux rats diabétiques induit une diminution significative de 60 % [25]. D'après Ramesh & Pugalendi, (2006), la concentration élevée de MDA est un indice suggérant une forte peroxydation lipidique au niveau hépatique, suite à l'injection de streptozotocine (STZ) qui est un agent chimique induisant un diabète par la destruction des cellules beta du pancréas. Cette augmentation de la concentration du taux de MDA peut être due à la diminution des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, comme l'acide ascorbique et le tocophérol, lesquels jouent un rôle majeur dans l'inhibition de la peroxydation lipidique [26]. Selon Vertuani *et al.*, (2004), l'augmentation du taux de MDA joue un rôle très important dans l'altération de la γ -glutamylcystéine synthétase (γ -GCS), enzyme responsable de la synthèse du glutathion [27]. L'estimation du NO contenu dans le compartiment intracellulaire des cardiomyocytes, soumis à une insulinotoxicité, a indiqué une augmentation significative. En revanche, une diminution tout aussi significative est observée dans les cellules soumises à l'insuline puis incubées en présence de l'extrait aqueux de *Ga*. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Smail, (2011) effectués sur le fibroblaste aortique de *Psammomys*

obesus, soumis à la même dose d'insuline [19,28] et ceux de Chien *et al.*, (2005) qui ont montré chez les patients diabétiques des concentrations élevées de NO par rapport aux patients non diabétiques [29]. De même, une augmentation de la production du NO est observée dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine, après l'administration de l'insuline à une dose élevée de 10000 nM [30]. Dans des conditions normales, les cellules endothéliales protègent contre la dysfonction endothéliale en produisant des facteurs vasoactifs notamment le NO et ce afin de maintenir le tonus vasculaire et d'empêcher la coagulation et l'inflammation [31-32]. Plusieurs résultats expérimentaux obtenus chez le rongeur ont indiqué également que le NO joue un rôle important dans la fonction endothéliale et dans la sensibilité à l'insuline. En effet, l'inhibition spécifique de la synthèse endothéliale du NO induit une insulinorésistance, ce qui suggère qu'une altération de la synthèse et/ou de la biodisponibilité du NO pourrait initier l'insulinorésistance [33-34]. Dans notre étude, l'activité enzymatique de la catalase des cardiomyocytes soumis à une dose élevée d'insuline est diminuée de façon très significative par rapport à celle des témoins correspondants, alors qu'une augmentation de la catalase est observée, suite au traitement par *Ga*.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Zabrodskaya *et al.*, (2007) et Subat *et al.*, (2007) [35-36] sur les cellules hépatiques des rats diabétiques et ceux de Sun *et al.*, (1999) et Kasdallah *et al.*, (2007) sur les cellules bêta des rats diabétiques. Cet état d'amélioration est observé, suite au traitement par le resvératrol à une dose de 10 mg/kg pendant cinq jours [37-38]. Selon Wang *et al.*, (2012), l'hyperinsulinémie entraîne la libération de ROS (Reactive oxygen species) par la phosphorylation oxydative mitochondriale à travers l'augmentation de l'expression des UCP (uncoupling Protein), de la NADPH oxydase (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxidase) et de la diminution du rapport ATP ADP, entraînant l'installation d'un stress oxydatif [39]. Ces mêmes auteurs rapportent que le Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) est une protéine régulatrice qui intervient dans le mécanisme antioxydant et qui est stimulée dans le cas d'un stress aigu. Cette protéine, une fois activée, subit la translocation nucléaire liée à une autre protéine sMAF, agirait sur le gène cible ARE (antioxydant responsive element) et induirait l'expression de protéines anti-oxydantes. Selon Bock, (2012), dans le cas d'une hyperinsulinémie, Nrf2 est inhibée par la Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), induisant ainsi sa dégradation, ce qui favorise l'accumulation de ROS au niveau cellulaire [39].

Conclusion

L'administration d'une dose supraphysiologique d'insuline, à raison de 10 UI/mL durant 6h sur le cardiomyocyte de *Rattus norvegicus*, induit l'installation d'un stress oxydatif par des variations de quelques marqueurs du stress oxydatif, tels que le MDA, le NO et la catalase, menant à l'apoptose et à l'apoptose. Après administration de l'extrait aqueux de *Globularia alypum*, la situation d'insulinotoxicité est réduite suite à une amélioration de la survie cellulaire via l'amélioration de l'homéostasie du système redox intracellulaire.

Conflit d'intérêt

Aucun

Références

- Kahn CR. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type 2 diabetes. *Diabetes* 1994 ; 43:1066-84.
- Porte D. Cells in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 1991 ; 40:166-80.
- Assimakopoulos-Jeannet F., Jeanrenaud B. The Hormonal and metabolic basis of experimental obesity. *Clin Endocrinol Metab* 1976; 5:337-65.
- Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 1996; 45:3-10.
- Ruderman NB., Saha AK., Vavvas D., Witters LA. Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol* 1999; 276: 1-18.
- Polonsky KS., Sturis J., Bell GI. Non-insulin dependent diabetes mellitus: a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. *N Engl J Med* 1996; 334:777- 83.
- Kristal AR. Brassica vegetables and prostate cancer risk: a review of the epidemiologic evidence. *Pharm Biol* 2002; 40:55-8.
- Jouad H., Maghrani M., Eddouks M. Hypoglycaemic effect of *Rubus fruticosus* L. and *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2002; 81:351-6.
- Allali H., Benmehdi H., Dib MA., Tabti B., Ghalem S., Benabadji N. Phytotherapy of diabetes in west Algeria. *Asian J Chem* 2008; 4: 2701-10.
- Baba Aissa F. Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. Edition Librairie moderne - Rouiba, Alger (1999).
- Bellakhdar J., Claisse R., Fleurentin J., Younos C. Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. *J Ethnopharmacol* 1991; 35 : 123-43.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Meth Enzymol* 1999; 299: 152-78.
- Djouahri A, Boudarene L, Benseradj F *et al.* In vitro synergistic/antagonistic antibacterial and anti-inflammatory effect of various extracts/essential oil from cones of *Tetra-clinis articulata* (Vahl) Masters with antibiotic and anti-inflammatory agents. *Ind Crops Prod* 2014;56: 60–66.
- Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol* 1995; 28:25–30.
- Council of European Communities. Council instructions about the protection of living animals used in scientific investigation. Official J 1987 L358 of 18-12-1986; *Corrigendum Official J.* L117 of 05-05-1987.
- Heat RL., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 1968 ; 125:189-198.
- Grand F., Guitton J., Goudable J. Optimisation des paramètres du dosage des nitrites et nitrates sériques par la technique de Griess. *Ann Bio Clin* 2001 ; 59:559-65.
- Claiborne A. Catalase activity. In CRC, Hand book of Methods for Oxygen Radical Research Ed. RA Greenwald, CRC Press, Boca Raton 1985; 283-284.
- Smail L., Berdja S., Neggazi S., Hamlat N., Boumaza S., Sahraoui H, *et al.* Impact of the glucolipototoxicity in vivo and insulinotoxicity inducing fibroblaste aortic of sand rat (*Psammomys obesus*). *Diab Metab* 2012; 3:3-11.
- Berdja S., Smail L., Othmani K, Neggazi S., Hamlat N., Boumaza S., *et al.* Impact of glucotoxicity induced in vivo and in vitro in *Psammomys obesus*. *J Diab Mellitus* 2012; 2:59-71.
- Chi MY., Pingsterhaus JM., Carayannopoulos MO. Decreased glucose transporter expression triggers Bax-depe receptor.ndent apoptosis in the mouse murine blastocyst. *J Biol Chem* 2000 ; 275:40252-57.
- Carayannopoulos MO., Chi M., Cui M., Etal Y. GLUT 8 a glucose transporter responsible for insulin-stimulated uptake in the blastocyst. *Proc Nath Acad Sci.* 2000; 97: 7313-18.
- Berdja S., Smail L., Saka B., Neggazi S., Haffaf EM., Benazzoug Y., *et al.* Glucotoxicity Induced Oxidative Stress and Inflammation In Vivo and In Vitro in *Psammomys obesus*: Involvement of Aqueous Extract of *Brassica rapa rapifera*. *Evidence-Based Compl Alter Med* 2016; 6:1-14.
- Singh U., Jialal I. Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes. *Nutr Rev* 2008; 66: 646-57.

25. Cai YJ., Fang JG., Yang L. Inhibition of free radical induced peroxidation of rat liver microsomes by resveratrol and its analogues. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1637:31-8.
26. Ramesh B., Pugalendi KV. Antioxidant role of umbelliferone in STZ diabetic rats. *Life Sci* 2006; 79:306-10.
27. Vertuani S., Angusti A., Manfredini S. The antioxidants and pro-oxidants network: an overview. *Curr Cardiol Rev* 2004; 10:1677-94.
28. Mohajeri D., Amouoghli Tabrizi B., Doustar Y., Nazeri M.. Protective Effect of Turnip Root (*Brassica Rapa. L*) Ethanolic Extract on Early Hepatic Injury in Alloxanized Diabetic Rats. *Aus J Basic Appl Sci* 2011; 5:748-56.
29. Chien WY., Yanng KD., Eng HL., Hu YH., Lee PY., Wang ST., Wang PW. Increased plasma concentration of nitric oxide in type 2 diabetes but not in non diabetic individuals with insulin resistance. *Diab Metab* 2005; 31:63-8.
30. Zeng G., Quon MJ. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1996 ; 98:894–898.
31. Gimbrone MA. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1995; 75: 67-70.
32. Loscalzo J. Nitric oxide and vascular disease. *N Engl J Med* 1995; 333:251-3.
33. Duplain H., Burcelin R., Sartori C., Cook S., Egli M., Lepori M., et al. Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2001; 104: 342-5.
34. Guarino MP., Correia NC., Lutt WW., Macedo MP. Insulin sensitivity is mediated by the activation of the ACH/ NO/ c GMP pathway in rat liver. *Am J Physiol Gastrointestinal Liver Physiol* 2004;287:527-32.
35. Zabrodskaia SV., Kubyshin VL. , Lapshina EA. Bryszewska M., Reiter RJ., Zavodnik IB. Melatonin attenuates metabolic disorders due to streptozotocin induced diabetes in rats. *Eur J Pharmacol* 2007; 569:180-7.
36. Subat T., Qun L., Faye L., Lopez J.R. Catalase alleviates cardiomyocyte dysfunction in diabetes: role of AKT, Forkhead transcriptional factor and silent information regulator 2. *Life Sci* 2007; 81:895-905.
37. Sun G., Xia J., Xu J., Allenbrand B., Simonyl A., Rudeen PK., Sun AY. Dietary supplementation of grape polyphenols to rats ameliorates chronic ethanol-induced changes in hepatic morphology without altering in hepatic lipids. *J Nutr* 1999; 129:1814-9.
38. Kasdallah-Grissa A., Mornagui B., Aouani E., Hammami M., El May M., Gharbi N., et al. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life Sci* 2007; 80:1033-9.
39. Wang X., Ling T., Chun X. Redox-regulating role of insulin: The essence of insulin effect. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 349:111-27.