

Master-Bio - 180/09

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Abou Bekr Belkaïd -Tlemcen-
Faculté des sciences de la nature et de la vie, de la terre et l'Univers
Département de Biologie



Inscrit Sous le N° :
Date le 04-09-2011
Co: 1105



Laboratoire de recherche

« Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique »

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master ;
Option « Biochimie Appliqué »

Thème

Optimisation de l'action de l'insuline sur les hépatocytes en culture

Présenté par :

M^{elle} Belhadj Ilhem



Soutenu devant le jury :

M ^{me} BOUCHERIT Z.	Maitre de conférences	Présidente	Université de Tlemcen
M ^r BEDRANE A.	Maître assistant	Promoteur	Université de Tlemcen
M ^{me} BENMANSOUR M.	Maître assistant	Examinateur	Université de Tlemcen

Remerciements

Avant tout, Je remercie Dieu d'avoir donné à l'homme le pouvoir de raisonner et d'exploiter les vérités de l'univers.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury :

En premier lieu, je tiens à remercier Monsieur **Bedrane A**, chargé de cours au département de biologie, faculté des sciences, Université Abou Bakr Belkaid – Tlemcen-, pour avoir accepté de diriger et suivi ce travail avec disponibilité, patience et bienveillance.

J'exprime également ma profonde reconnaissance et mes respects à Madame **Boucherit Z**, maitre de conférences au département de biologie, faculté des sciences, Université Abou Bakr Belkaid –Tlemcen- pour avoir participer à la direction de ce travail.

Je tiens à remercier M^{elle} **Benmansour M**, Maître assistante au département de biologie, faculté des sciences, Université Abou Bakr Belkaid –Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner et discuter ce travail.

Je remercie aussi toute personne ayant contribué à la réalisation de ce modeste travail, en particulier à Monsieur **Azzi R**, Maître assistant au département de biologie, faculté des sciences, Université d'Abou Bakr Belkaid –Tlemcen-, pour leur conseils et leur gentillesse. M^{elle} **Benariba N.**, Maître assistante au département de biologie, faculté des sciences, Université d'Abou Bakr Belkaid –Tlemcen-, pour leur aide précieuse,

En dernier lieu, je remercie mes parents et ma famille de leurs amours, leurs soutiens, leurs encouragements et leur affection durant toutes ces années d'études.

Résumé

Ce travail présente une étude effectuée au sein de laboratoire « Antibiotiques Antifongiques : Physicochimie, Synthèse et Activité Biologique » sur la recherche des effets de l'insuline sur la captation de glucose par des coupes de foie isolées de rats Wistar dans un milieu d'incubation KRBA 4% contenant de glucose 0.54g/l, en présence de différentes concentrations d'insuline.

L'effet de l'insuline sur la cinétique de captation du glucose par les coupes fines de foie a été suivi à 0, 30, 45, 60 et 90 minutes d'incubation à 37°C, à des concentrations de : 1, 10, 50, 100, 200, 300 μ U/ml.

Les résultats obtenus montrent un effet maximal de captation de glucose extra cellulaire après addition de l'insuline de l'ordre de 300 μ U/ml.

L'insuline montre un effet stimulateur sur la captation du glucose au niveau de foie isolé de rats Wistar de laboratoire car les cellules seules sont capables de consommer le glucose en absence d'insuline. Cette captation significative ($p < 0.01$) dite basale est de l'ordre de 0.04g/l (7.40 %).

Mots clés : Diabète, Coupe de foie isolés, transport du glucose.

Sommaire

1^{ère} Partie : Synthèse bibliographique

1. Introduction	1
2. Structure de l'insuline	3
3. Biosynthèse.....	3
4. Régulation de l'insulinosécrétion.....	5
4.1. Rôle des nutriments dans l'insulinosécrétion	6
4.2. Rôle des ions.....	7
5. Régulation hormonale rapide de la sécrétion de l'insuline	8
6. Actions physiologiques de l'insuline.....	9
6.1. Effet sur le foie	9
6.2.Effet sur le tissu adipeux.....	10
6.3.Effet sur le muscle strié	10
7. Culture cellulaire	10

2^{ème} Partie : Partie expérimentale

Matériels et méthodes

I. Analyse biologique	15
1. Les animaux	15
2. L'effet de l'insuline sur la captation du glucose par des coupes fines de foie	15
2.1. Préparation du milieu d'incubation KRBA	15
2.2. Isolement des coupes de foie de rats.....	16
2.3. Incubation des coupes de foie.....	17
2.4. Dosage du glucose	18

II. Analyses statistiques.....	21
--------------------------------	----

Résultats et interprétation

1. Captation du glucose par des coupes de foie	23
1.1. Consommation basale de glucose	23
1.2. Effet d'insuline sur la captation du glucose par les coupes fines de foie.....	24

Discussion.....	33
------------------------	-----------

Conclusion générale	35
----------------------------------	-----------

Références bibliographiques	36
--	-----------

Liste des figures

Figure 01: Schéma structurelle d'insuline	3
Figure 02: Biosynthèse de l'insuline	4
Figure 03: Stimulation de la sécrétion d'insuline par la voie dépendant des canaux K sensibles à l'ATP	5
Figure 04: Schéma récapitulatif du mode opératoire de l'incubation des coupes de foie	20
Figure 05: Concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0.54 g/l du glucose en absence et en présence des coupes de foie.	24
Figure 06 : Concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0.54 g/l du glucose en présence de 1 μ U/ml d'insuline pendant 0, 30, 45, 60, 90 min.	26
Figure 07: Concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0.54 g/l du glucose en présence de 10 μ U/ml d'insuline pendant 0, 30, 45, 60, 90 min.	27
Figure 08 : Concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0.54 g/l du glucose en présence de 50 μ U/ml d'insuline pendant 0, 30, 45, 60, 90 min.	28
Figure 09 : Concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0.54 g/l du glucose en présence de 100 μ U/ml d'insuline pendant 0, 30, 45, 60, 90 min.	29
Figure 10 : Concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0.54 g/l du glucose en présence de 200 μ U/ml d'insuline pendant 0, 30, 45, 60, 90 min.	30
Figure 11 : Concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0.54 g/l du glucose en présence de 300 μ U/ml d'insuline pendant 0, 30, 45, 60, 90 min.	31

Liste des tableaux :

Tableau 1: Préparation du KRB 16

Tableau 2: Concentrations d'insuline, ajoutées au milieu d'incubation contenant des coupes de foie 18

Tableau 3 : Concentration de glucose restant dans le milieu après incubation en présence des différentes concentrations d'insulines dans un milieu d'incubation KRBA4% (0.54g/l Glu)..... 24

Tableau 04: Concentration de glucose capté par les coupes de foie en présence des différentes concentrations d'insulines dans un milieu d'incubation KRBA4% (0.54g/l Glu) 25

Tableau 05 : Taux de glucose capté par les coupes de foie en présence des différentes concentrations d'insulines dans un milieu d'incubation KRBA4% (0.54g/l Glu). 25

1. Introduction :

Le diabète sucré est une maladie liée à une défaillance des mécanismes biologiques de régulation de la glycémie. Il s'agit d'une maladie chronique due à une carence ou à un défaut d'utilisation de l'insuline. Cette carence ou ce défaut entraîne une hyperglycémie, ce qui a de multiples conséquences néfastes [OMS, 2002].

En pratique, on distingue le diabète insulino-dépendant (diabète de type 1) marqué par une carence absolue en insuline et le diabète non insulino-dépendant (diabète de type 2).

Ainsi, on distingue les sujets normaux, les sujets hyper glycémiques non diabétiques (glycémie entre 1,10 et 1,25 g/L à jeun), les diabétiques (glycémie supérieure ou égale à 1,26 g/L à jeun, ou glycémie supérieure à 2 g/L à la 2^{ème} heure de l'hyperglycémie provoquée par voie orale) et les intolérants au glucose (glycémie comprise entre 1,40 et 2 g/L à la 2^{ème} heure de l'hyperglycémie provoquée par voie orale) [Sachon et al, 2004].

Selon l'OMS, le nombre de diabétiques en Algérie était estimé à plus de 5 millions [Association d'aide aux diabétiques Tlemcen, 2006].

Le diabète de type 1 est une forme de diabète sucré qui apparaît le plus souvent de manière brutale chez l'enfant ou chez le jeune adulte. Il se caractérise par une polyurie, une polydipsie et un polyphagie. Il a aussi pour conséquence un amaigrissement, une hyperglycémie supérieure à 2 g/L avec parfois présence d'acétone dans les urines.

Le diabète de type 1 est dû à une destruction auto-immune des cellules insulino-sécrétrices dites cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques [OMS, 2002]. L'hyperglycémie apparaît lorsqu'il ne reste plus que 10 à 20% de cellules B fonctionnelles. Le processus auto-immun responsable d'une «insulite» pancréatique se déroule sur de nombreuses années (5 à 10 ans voire plus, avant l'apparition du diabète) [Grimaldi, 1999]. De plus, des facteurs environnementaux sont probablement à l'origine du déclenchement du processus auto-immunitaire, qu'il s'agisse de facteurs nutritionnels, toxiques ou viraux. Le déclenchement de processus auto-immun de destruction des cellules β est contrôlé par des facteurs génétiques et environnementaux.

Le diabète type 2 est la forme de diabète la plus répandue représentant près de 90% des cas diagnostiqués. Ce type de diabète se manifeste communément à l'âge adulte [OMS, 2002].

C'est une maladie chronique et évolutive dans le temps. Le diabète de type 2 est caractérisé par une altération de l'insulinosécrétion et des anomalies des effets de l'insuline sur ses tissus cibles (insulinosensibilité), les anomalies métaboliques fondamentales qui précèdent le diabète de type 2 sont les insulino-résistances musculaire et hépatique. [Halimi et al, 1999].

L'hyperglycémie chronique est associée à des complications à long terme, touchant en particulier les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins [Fontbonne et Simon ; 2004]. Ils sont de deux types : des complications aiguës qui sont très répandues chez le diabète de type 1 (hypoglycémie, hyperglycémie) et d'autres chroniques qui se trouvent surtout chez le diabète de type 2 (rétinopathie, néphropathie, neuropathie, **maladies** cardio vasculaire) [Capet et al, 1999].

Plusieurs thérapeutiques sont à la disposition : Un régime alimentaire bien équilibré [Gin et Rigalleau, 1999] et une activité physique qui améliore l'hémoglobine glyquée et la composition corporelle [CIANGURA Cécile, 2010].

Le traitement du diabète de type I fait appel à l'injection quotidienne d'insuline. Le diabète de type 2 nécessite une prise en charge médicamenteuse et cela par l'intervention des antidiabétiques oraux qui sont classés selon leur mode d'action en trois catégories :

Les sulfamides hypoglycémisants SH (sulfonylurées) ; Ils stimulent la sécrétion d'insuline par les cellules B des îlots de Langerhans du pancréas, en particulier en réponse au glucose [Halimi et al ; 1999].

Les biguanides ; Elles améliorent la sensibilité des tissus cibles à l'insuline endogène ou exogène [Larger, 1998].

Les inhibiteurs des α -glucosidase ; Inhibent le dernier stade de la digestion des sucres [Grimaldi, 1999; Duron Et Heurtier, 2006].

2. Structure de l'insuline :

L'insuline est une hormone polypeptidique formée, après élimination du peptide C par hydrolyses, de deux chaînes de 21 et 30 acides aminés, reliées par deux ponts disulfures (Fig.1). Elle est sécrétée par les cellules β des îlots pancréatiques du pancréas et exerce un effet normoglycémiant. Elle fait partie du groupe des peptides appelés IGF (Insuline like Growth Factor). [Raisonnier et coll., 2004 ; De Meyts, 2004].

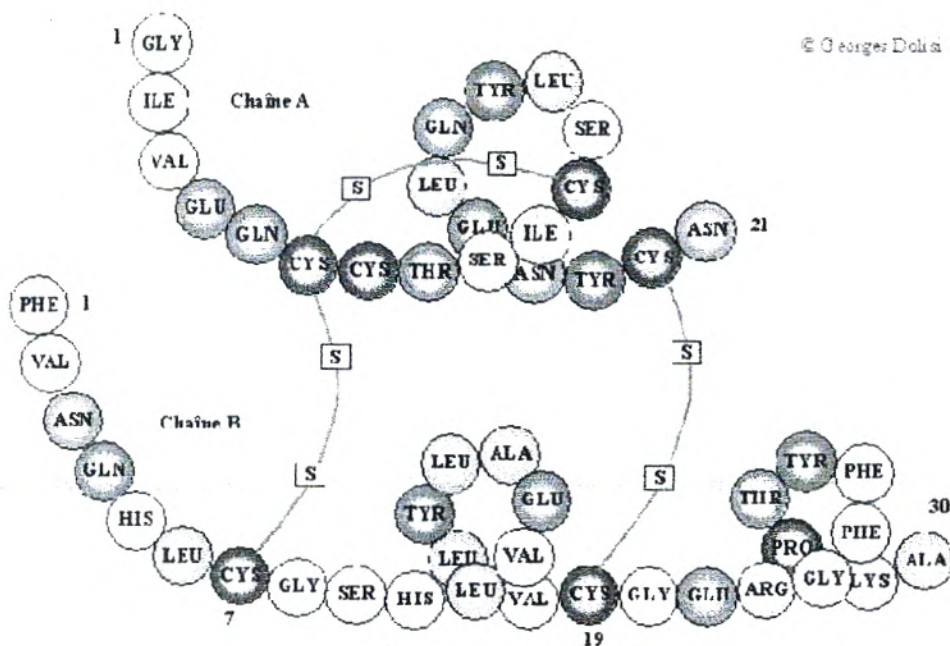


Figure 1: Schéma structurelle d'insuline. [Raisonnier et coll., 2004].

3. Biosynthèse

L'insuline est produite dans les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. La biosynthèse de l'insuline s'amorce dans le noyau des cellules β , à partir de l'information contenue dans le code génétique, située sur le chromosome 11. La cellule β fabrique en premier un produit peu différencié, qui est une macromolécule : la pré-pro-insuline. Cette protéine, qui représente le produit de traduction de l'ARN messager de l'insuline, est constituée de pro-insuline agrandie d'une séquence peptidique supplémentaire de 2500 Da attachée sur l'extrémité aminotermine de la chaîne A. La pro-insuline est synthétisée dans les ribosomes attachés au réticulum endoplasmique rugueux, sous le contrôle de la concentration des cellules β en calcium et glucose. Les ponts disulfures se forment, donnant sa structure définitive à la

pro-insuline, qui s'accumule dans les citernes du réticulum endoplasmique rugueux (RER). La vitesse de cette étape serait rapide, de l'ordre d'une minute. La pro-insuline est composée de deux chaînes A et B de la molécule d'insuline et d'un troisième polypeptide, le peptide C (33 acides aminés) qui relie l'extrémité aminotermine de la chaîne A à l'extrémité carboxyterminale de la chaîne B. La synthèse se fait dans le cytoplasme, dans des régions riches en RER. La pro-insuline est ensuite transportée dans l'appareil de Golgi en moins d'une demi-heure. Là commence sa conversion en insuline pour se poursuivre dans les granules de stockage : l'étape de conversion, aboutissant à la formation d'insuline et de peptide C, résulte d'actions enzymatiques (trypsine, carboxypeptidase B et probablement chymotrypsine) localisées à la face interne de la membrane du granule. Après leur formation, les granules de stockage augmentent de densité et renferment des inclusions semblables à des cristaux d'insuline entourées de peptide C. Le zinc contenu dans la cellule β favorise la formation d'hexamères d'insuline et de pro-insuline, en même temps qu'il protège l'insuline des attaques enzymatiques. (Fig.2). [Bertolotti, 2001 et Menard et al, 1999.]

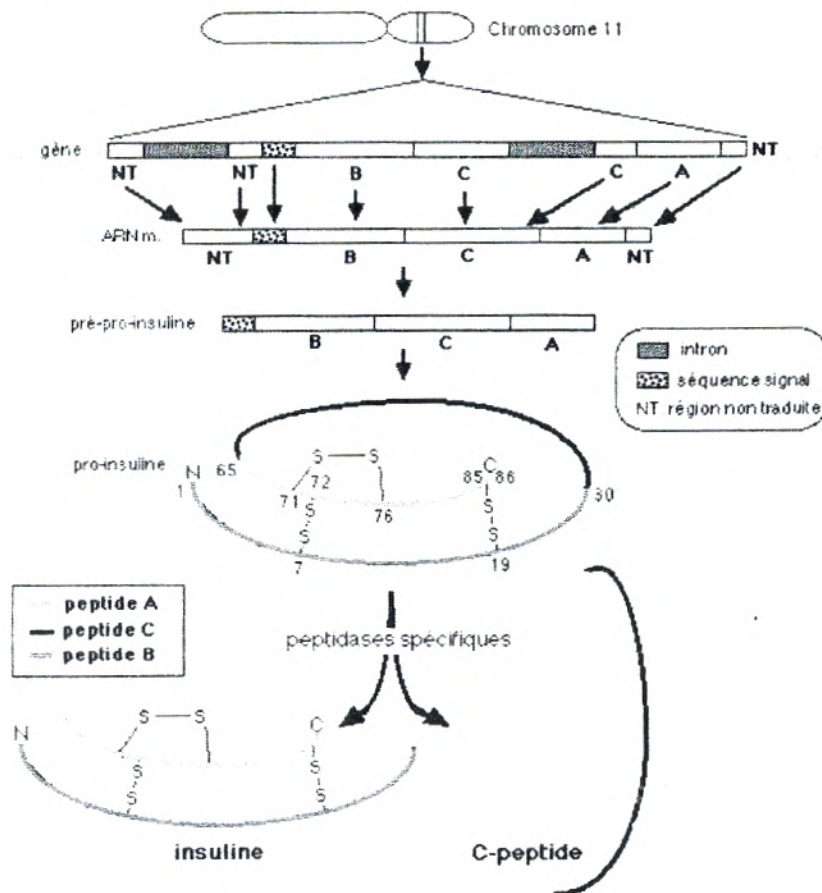


Figure 2: Biosynthèse de l'insuline [Bertolotti, 2001 et Menard et al, 1999.]

4. Régulation de l'insulinosécrétion :

La sécrétion d'insuline est contrôlée par différents substrats comme le glucose, les acides aminés (arginine, leucine, lysine), les acides gras et les corps cétoniques. C'est l'augmentation des niveaux plasmatiques de ces substrats qui stimule la libération d'insuline. Certaines hormones peuvent aussi agir sur la libération d'insuline. Ainsi, le glucagon, l'adrénaline, l'hormone de croissance et les glucocorticoïdes, lesquels à l'opposé de l'insuline ont des actions hyperglycémiantes, réduisent la libération d'insuline [Capeau J, 2003; Baudin, 2001].

La régulation physiologique de l'insulinosécrétion est sous la dépendance des nutriments et des ions. Elle est modulée par des hormones d'action rapide et d'autres facteurs à plus long terme (Fig.3).

La première étape du catabolisme implique l'enzyme glucokinase, entraînant la glycolyse et la production d'ATP. L'augmentation du rapport ATP/ADP provoque la fermeture des canaux potassiques sensibles à l'ATP (K^+ ATP). La fermeture de ces canaux entraîne une accumulation intracellulaire de K^+ , entraînant une dépolarisation membranaire, ouvrant les canaux calciques voltage-dépendants. Le Ca^{2+} entre alors massivement dans la cellule. L'augmentation de Ca^{2+} dans la mitochondrie induit la sécrétion de l'insuline [Annicotte, 2004].

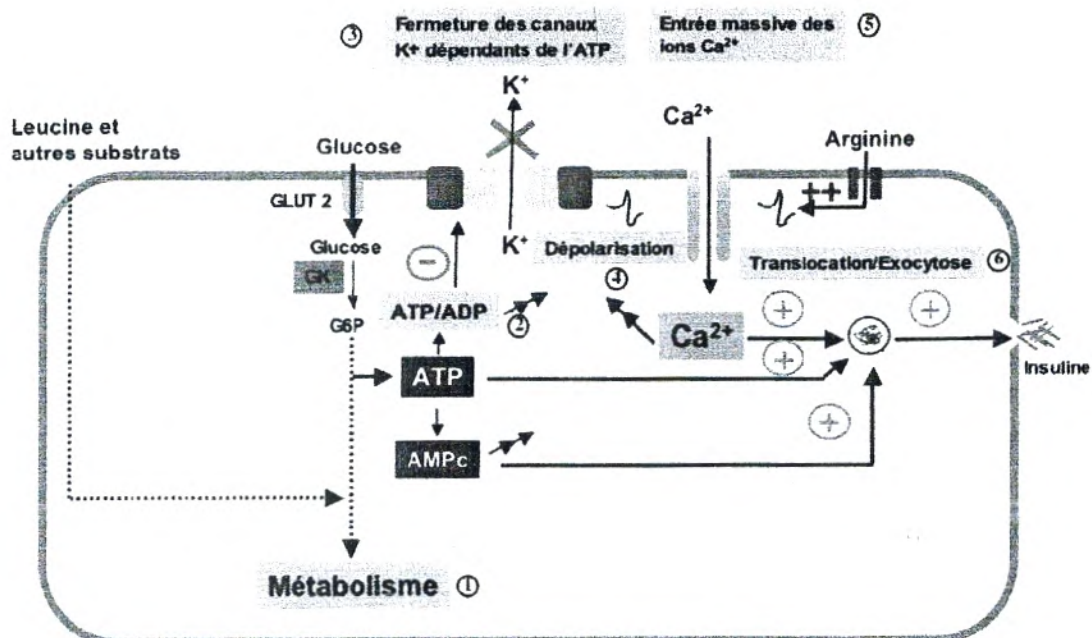


Figure 3: Stimulation de la sécrétion d'insuline par la voie dépendant des canaux K^+ sensibles à l'ATP. GK : glucokinase ; 1 à 6 : les différentes étapes du couplage stimulus-sécrétion.

4.1. Rôle des nutriments dans l'insulinosécrétion :

4.1.1. Rôle de glucose

Le glucose représente l'agent insulino-stimulant le plus puissant. Le débit est étroitement lié à la concentration glucosée du plasma qui se manifeste pour des concentrations glucosées comprises entre 0,80 et 5 g/l. Le glucose stimule puissamment la synthèse de l'hormone qui se déroule en 2 phases: un premier pic précoce et intense, qui dure environ 3 minutes; une seconde phase durable et ascendante. A chaque instant, la cellule β ajuste sa sécrétion au taux de glucose plasmatique, maintenant un taux glycémique stable.

Le glucose pénètre dans la cellule grâce à une molécule appelée « transporteur du glucose » [Brozinick JT, 2007]. Une fois dans la cellule, le glucose tient un double rôle. Un rôle énergétique par son métabolisme oxydatif aboutissant à la synthèse d'ATP, qui serait utilisé dans la libération de l'insuline et un rôle de signal de la sécrétion d'insuline. [Perlemuter et al., 2003].

4.1.2. Acides aminés

Suite aux travaux pilotes de Floyd et al, [Floyd JC et al, 1966], l'effet insulinotrope de certains acides aminés est connu depuis plusieurs décennies. La L-leucine est le premier acide aminé dont le mode d'action en tant qu'agent insulinotrope fut attentivement exploré [Malaise WJ, 1986]. En bref, il fut d'abord établi que les effets de la L-leucine sur différents paramètres métaboliques et ioniques étaient parfaitement compatibles avec l'idée que son action insulinotrope était étroitement liée à sa capacité d'agir comme nutriment dans les cellules insulaires. D'autres acides aminés augmentent la sécrétion d'insulines telles, que l'arginine, la lysine, la phénylalanine, la valine et la méthionine [Sener A, 1988].

Cependant, le mécanisme d'action des acides aminés est mal élucidé mais explique en partie qu'un repas mixte élève moins la glycémie qu'un repas glucidique. Enfin, l'action stimulante des acides aminés sur la sécrétion d'insuline semble se produire non pas sur la biosynthèse mais plutôt lors de l'émiocytose des granules d'insuline [Malaise WJ, 2002].

4.1.3. Acides gras

Un repas riche en lipide provoque une élévation du taux plasmatique des acides gras libres (AGL) induisant une augmentation de la réponse insulinoque au glucose [Perlemuter L, 2003]. Les acides gras sont des substrats énergétiques majeurs de la cellule β des îlots

pancréatiques [Sener A, 1988, Roden M, 1996] ils stimulent l'insulinosécrétion en présence de concentrations normales ou élevées de glucose sanguin.

Néanmoins, les effets insulinosécréteurs des acides gras sont faibles par rapport à leur contribution au métabolisme oxydatif des cellules β . Les acides gras utilisés par les cellules β ont plusieurs origines: les acides gras libres circulants, les acides gras contenus dans les lipoprotéines circulantes (les cellules β possèdent des récepteurs des LDL qui leur permettent de capter les lipoprotéines circulantes) [Gruppung AY, 1997] et les acides gras contenus dans les triglycérides stockés dans la cellule β . Des expériences récentes ont montré que l'exposition des cellules β à court terme (quelques heures) aux AGL potentialise la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, tandis que l'exposition à long terme (plusieurs jours) inhibe la sécrétion d'insuline en réponse au glucose [Girard J, 2003].

In vivo, la sécrétion rapide d'insuline en réponse au glucose est la même chez le rat nourri ou à jeun, alors que la sécrétion tardive est diminuée chez le rat nourri. L'une des différences entre les deux groupes d'animaux est que la concentration en AGL est beaucoup plus élevée chez le rat à jeun [Malaisse WJ, 2002]. De plus, si l'on injecte un agent antilipolytique (acide nicotinique) au rat à jeun, afin de diminuer la concentration en AGL avant la perfusion de glucose, la sécrétion tardive d'insuline en réponse au glucose est supprimée. Si la concentration en AGL est maintenue par perfusion de triglycérides et d'héparine, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose est restaurée. L'effet potentialisateur à court terme des acides gras sur l'insulinosécrétion en réponse au glucose est probablement dû à une augmentation de la concentration d'acyl-CoA dans le cytosol. En effet, ceux-ci stimulent l'exocytose, soit directement, soit après formation de diacylglycérol, un stimulateur de la protéine kinase C (PKC) [Girard J., 2000].

4.2. Rôle des ions

Les ions constituent des éléments primordiaux dans la libération de l'insuline et la régulation de l'insulinosécrétion. Le glucose, sur la membrane plasmique de la cellule β , pénètre facilement dans la cellule grâce à l'action d'une protéine favorisant l'entrée de ce sucre (transporteur de Glucose: Glut-2). Ce glucose va être phosphorylé par une glucokinase (GK).

Le Glucose 6 Phosphate (G6P) produit est engagé dans deux voies de métabolisme importantes, la voie des pentoses phosphates et la voie de la glycolyse. Les résultats de ces voies métaboliques se traduisent par une élévation d'ATP intracellulaire qui inhibe alors les canaux K-ATP dépendants situés au niveau de la membrane cellulaire. Ainsi, la fermeture de

ces canaux est accompagnée d'une dépolarisation des cellules qui permet l'ouverture de canaux Ca^{2+} .

Le calcium intracellulaire va alors augmenter et se fixer sur la calmoduline pour former un complexe provoquant la phosphorylation de protéines du cytosquelette et des microfilaments. Ces modifications vont favoriser la migration des grains contenant l'insuline vers la membrane de la cellule β . Il y a ensuite fusion et exocytose vers le courant circulatoire. De plus, les cellules peuvent recevoir des informations mettant en jeu des enzymes membranaires (phospholipase C = PLC) qui stimulées par PIP₂, donnent l'Inositol triphosphate (IP₃) provoquant la libération du calcium contenu dans les organites du cytoplasme. Il se forme alors le complexe calmoduline- Ca^{2+} qui favorise l'exocytose de l'insuline.

5. Régulation hormonale rapide de la sécrétion de l'insuline :

A l'état physiologique, trois hormones sont inhibitrices et trois autres sont stimulantes de la sécrétion d'insuline.

5.1. Hormones inhibitrices

L'insuline a une action de rétrocontrôle sur sa propre sécrétion. Tout excès d'insuline met au repos la cellule β et inversement. Cette action semble avoir un effet majeur pour équilibrer le fonctionnement des cellules β chez le diabétique. L'adrénaline (comme les autres catécholamines) a un puissant effet inhibiteur sur la synthèse et la sécrétion de l'insuline sans que le mécanisme en soit réellement connu. La somatostatine bloque la sécrétion d'insuline et de glucagon. Elle diminue l'insulinémie de base, ainsi que la libération d'insuline provoquée par le glucose. Ceci est dû à une action directe de l'hormone sur la cellule β .

L'amyline peut inhiber la sécrétion d'insuline induite par le glucose par le pancréas de rat perfusé, il inhibe l'insulinosécrétion induite par des secrétagogues qui interagissent à différents niveaux du couplage stimulus-sécrétion de la cellule β [SALAS M et al, 1995].

5.2. Hormones stimulantes

Les agents cholinergiques stimulent la sécrétion d'insuline; cet effet semblable à celui du nerf pneumogastrique est inhibé par les atropiniques; elle est impliquée dans la réponse insulinique de la prise d'aliments.

Le glucagon a chez l'homme un effet insulino-sécréteur qui paraît dépendre de la concentration en glucose du milieu extracellulaire. Le glucagon, dont on connaît la puissance d'action hyperglycémiant, équilibre en sorte ses actions.

Certaines hormones gastro-intestinales sont stimulantes: le polypeptide pancréatique sécrété par les cellules endocrines dans les îlots pancréatiques mais dont le rôle physiologique est imparfaitement connu; le GIP (Gastric Inhibiting Peptide) qui est responsable du pic précoce d'insulinosécrétion. Il agit en synergie avec le glucose. Ou bien encore le GLP-1 (Glucagon-Like Peptide-1) qui est un polypeptide à effet anorexigène sécrété par le tractus digestif au cours de la prise alimentaire. Le GLP-1 a deux actions importantes. D'abord, il stimule la sécrétion d'insuline et inhibe la sécrétion de glucagon et inhibe ainsi la production de glucose hépatique et abaisse le taux de glucose dans le sang [HOLST J. H ; 1994].

6. Actions physiologiques de l'insuline

L'insuline stimule le processus anabolique et la mise en réserve de l'énergie. Elle agit essentiellement sur trois organes cibles et sur le métabolisme glucidique et lipidique des divers tissus périphériques. Son action métabolique générale s'exerce en favorisant l'entrée de certains substrats dans les cellules et en agissant sur le métabolisme cellulaire de ces substrats [Idelman S, 2000].

6.1. Effet sur le foie

Le foie est le siège de la néoglucogénèse [Joffre M, 2003]. Le glucose y est produit à partir de précurseurs issus du catabolisme protidique et lipidique. L'insuline stimule la synthèse de la glucokinase, qui est une hexokinase spécifique du foie, favorisant la formation de G6P et sa transformation en glycogène (ce qui accroît son effet hypoglycémiant) ou son utilisation (glycolyse). Elle stimule aussi la lipogénèse hépatique et inhibe l'effet cétogène du glucagon, Elle possède également sur les protides une action à la fois anabolique et anti-catabolique. De plus, des études ont mis en question l'insulino-sensibilité du foie en mettant en évidence que la production hépatique de glucose diminuait lentement quand l'insulinémie systémique, et non portale, augmentait [Bergman RN., 2000].

Les Glut 2, présents dans le foie et les cellules β pancréatiques, sont régulés par la glycémie et non par l'insuline [Milburn JL Jr, 1993]. Le glucose est transformé ensuite en G6P dont les trois voies métaboliques (glycolyse, voie des pentoses phosphates et glycogénogénèse) sont stimulées par l'insuline. De plus, en stimulant la lipogénèse, l'insuline

augmente la cholestérolémie. Enfin sur les protéines, l'insuline exerce un double effet anabolique et anti catabolique [Timmerman KL, 2008, González-Sánchez JL, 2007].

6.2. Effet sur le tissu adipeux

Le tissu adipeux constitue le principal réservoir d'énergie de l'organisme et la source des AGL. Par ailleurs, ces derniers, dont la diminution de concentration plasmatique est fortement corrélée à la suppression de la production hépatique de glucose, sont connus pour stimuler la gluconéogenèse [Van Kempen AA, 2006]. Enfin l'insuline diminue la libération des AGL par le tissu adipeux en inhibant la lipolyse et favorisant la lipogenèse [Mittelman SD, 2000]. Ainsi, le mode de contrôle de la production hépatique de glucose par l'insuline peut être d'une part indirect, par la régulation de la libération des acides gras non estérifiés à partir des adipocytes et d'autre part, direct, via la néoglucogenèse.

6.3. Effets sur le muscle strié (squelettique et cardiaque)

L'insuline stimule le transport du glucose par l'intermédiaire des transporteurs du glucose. Parmi les différentes formes de transporteurs aujourd'hui identifiés (Glut 1 à Glut 6), seul le Glut 4, présent principalement dans les muscles et le tissu adipeux, voit son activité et sa synthèse accrues par l'effet de l'insuline [Scheepers A, 2004, Ishiki M, 2005]. Les Glut 1 ubiquitaires sont, pour l'essentiel, régulés par la concentration du glucose assurant ainsi un apport énergétique aux tissus dont la fourniture en glucose est vitale (système nerveux, placenta en particulier [Wiernsperger NF, 2005]).

L'insuline stimule la synthèse du glycogène par stimulation de l'hexokinase, mais elle stimule surtout la glycolyse. Elle inhibe la protéolyse et la lipolyse musculaires et favorise le transport actif de certains acides aminés à travers la membrane cellulaire [Idelman S, 2000].

7. Culture cellulaire :

Les procédés de cultures cellulaires in vitro ont permis aux biologistes d'étudier la prolifération cellulaire et caractérisé le rôle d'insuline et leur signalisation avec des différentes concentrations ainsi que d'effectuer les manipulations génétiques nécessaire.

La culture de tissus est le terme général englobant le prélèvement de cellules, tissus ou organes d'un animal ou d'une plante et leur placement ultérieur dans un environnement artificiel conduisant à leur croissance. Cet environnement est généralement constitué de récipients de

cultures appropriés en verre ou en plastique contenant un milieu liquide ou semi-solide qui apporte les nutriments essentiels à la survie et à la croissance. [John Ryan, 2007].

Bien que la culture de cellules animales ait été réussie pour la première fois par Ross Harrison en 1907, il a fallu attendre la fin des années 1940 pour voir apparaître plusieurs développements qui ont rendu la culture cellulaire largement disponible comme outil pour les scientifiques. Tout d'abord, le développement des techniques, telles que l'utilisation de trypsine pour retirer les cellules des récipients de culture, nécessaires pour obtenir des lignées cellulaires cultivées en continu (comme les cellules HeLa). À l'aide de ces lignées cellulaires, les scientifiques ont pu développer des milieux de culture cellulaire standardisés chimiquement définis facilitant énormément la culture de cellules. [John Ryan, 2007].

On obtient des cultures cellulaires par des différentes voies : Lorsque les cellules sont prélevées chirurgicalement d'un organisme et placées dans un environnement de culture approprié, elles se fixent, se divisent et prolifèrent. C'est ce qu'on appelle une **Culture primaire**. Il existe deux méthodes de base pour faire cela. Dans la première, pour les Cultures d'explants, de petits morceaux de tissus sont fixés sur un récipient de culture traité et baignés dans du milieu de culture. Après quelques jours, des cellules individuelles se déplacent de l'explant de tissus vers la surface du récipient de culture ou le substrat où elles commencent à se diviser et proliférer. Dans la deuxième, méthode la plus généralement utilisée, ce processus est accéléré en ajoutant des enzymes de digestion (protéolytiques), telles que le mélange de la trypsine -EDTA ou la collagénase, à des fragments de tissus pour dissoudre le ciment maintenant les cellules ensemble. Ceci crée une suspension de cellules individuelles qui sont placées dans des récipients de culture contenant un milieu de culture pour les laisser pousser et se diviser. Cette méthode est appelée Digestion enzymatique. [John Ryan, 2007].

Lorsque les cellules dans le récipient de culture primaire ont poussé et couvert tout le substrat de culture disponible, elles doivent être repiquées pour leur donner de la place afin d'avoir une croissance continue. Cela se fait généralement en les retirant aussi délicatement que possible du substrat avec des enzymes. Ces enzymes sont utilisées pour rompre les liaisons protéiques liant les cellules au substrat. Certaines lignées cellulaires peuvent être récoltées en grattant délicatement les cellules du fond du récipient de culture.

Une fois libérées, les cellules en suspension peuvent être divisées et placées dans de nouveaux récipients de culture [John Ryan, 2007].

Deux systèmes de base de culture cellulaire sont utilisés pour cultiver des cellules. Ils sont essentiellement basés sur l'aptitude des cellules à pousser attachées sur un substrat traité (systèmes de culture mono-couche) ou à flotter librement dans le milieu de culture (systèmes de culture en suspension).

Les cultures mono-couches ou stationnaires sont généralement cultivées dans des boîtes, flacons T, flacons roulants ou plaques multi puits traités pour la culture de cellules, et son principe est lié à l'affinité des cellules pour un support puisque la plupart appartiennent à des tissus solides organisés.

Les cultures en suspension sont généralement cultivées:

1. Dans des flacons Spinner (rotation magnétique) ou dans des Erlenmeyers agités dans lesquels les cellules sont activement gardées en suspension dans le milieu;
2. Dans des récipients de culture stationnaires comme les flacons T et les bouteilles dans lesquels, bien qu'elles ne soient pas maintenues en agitation, les cellules sont incapables de se fixer fermement au substrat.

La méthode d'isolement d'hépatocytes adultes par perfusion in situ d'une solution de collagénase a été appliquée à divers espèces, y compris l'homme, et a permis d'obtenir des quantités importantes de cellules avec une excellente viabilité, les hépatocytes en suspension peuvent être séparés en sous-populations en fonction de leur densité ou de leur volume, la survie prolongée des hépatocytes n'est possible que s'ils sont maintenus en culture, attachés à un support.

Les cultures en suspension est surtout utilisés pour la culture en masse à des fins industrielles, pour la virologie et la biotechnologie, aboutissant à la production des substances biologiques.

De nombreuses lignées cellulaires, surtout celles dérivées de tissus normaux, sont considérées comme adhérentes, c'est-à-dire qu'elles poussent uniquement lorsqu'elles s'adhèrent à un substrat.

Les cellules adhérentes nécessitent également un bon substrat pour la fixation et la croissance. Le verre et les plastiques spécialement traités sont les substrats les plus utilisés.

Cependant, des facteurs d'adhérence, comme le collagène, la gélatine, la fibronectine et la laminine, peuvent être utilisés pour recouvrir les substrats afin d'améliorer la croissance et la fonction des cellules normales dérivées de cerveau, vaisseaux sanguins, rein, foie, peau, etc. **[John Ryan, 2007]**.

Il est important de fournir aux cellules la température appropriée, un bon substrat pour la fixation et le milieu de culture correct. La plupart des cellules de mammifère nécessitent 36° à 37°C.

Le milieu de culture est le facteur le plus important et le plus complexe à gérer. En plus de satisfaire aux besoins nutritionnels des cellules, le milieu de culture doit également posséder tous les facteurs de croissance nécessaires, réguler le pH et l'osmolarité, et fournir les gaz essentiels (O₂ et CO₂). La partie "nourriture" du milieu de culture est constituée d'acides aminés, vitamines, sels minéraux et glucides. Ils permettent aux cellules de construire de nouvelles protéines et autres composants essentiels à la croissance et aux fonctions et apportent l'énergie nécessaire au métabolisme. **[John Ryan, 2007]**.

Les facteurs de croissance et hormones aident à réguler et contrôler la vitesse de croissance des cellules et leurs caractéristiques fonctionnelles. Pour cultiver des cellules fonctionnelles normales, les sérums sont souvent remplacés par des facteurs de croissance spécifiques.

Enfin, l'osmolarité du milieu de culture est importante car elle aide à réguler le flux de substances qui entrent et sortent de la cellule. Elle est contrôlée par l'addition ou la soustraction de sels dans le milieu de culture. L'évaporation du milieu de culture dans les récipients de culture ouverts (boîtes, etc.) conduit rapidement à une augmentation de l'osmolarité,

Les cultures cellulaires fournissent de bons systèmes de modèles pour étudier : **[John Ryan, 2007]**.

- la biologie et la biochimie cellulaires de base,
- les interactions entre les cellules et les agents induisant des maladies,
- les effets des médicaments sur les cellules,
- le processus et le déclenchement du vieillissement.

Notre objectif est d'étudier d'une part, la cinétique de captation de glucose par des cellules en culture sous l'effet de l'insuline à différentes concentrations et d'autre part, d'estimer la concentration d'insuline capable de fournir une captation de glucose maximale voire optimale.

Pour ce faire, une étude dose réponse (effet du nombre de cellules, variation de la concentration en glucose et celle de l'insuline) est prévue.

On utilise le KRBA (Krebs-Ringer Bicarbonaté Albuminé) comme milieu d'incubation pour les coupes de foie isolé.

Les coupes de foie sont incubées pendant 1 heure 30 minutes, à 37°C sous agitation dans des boîtes de culture cellulaire en polyéthylène.

Des prélèvements dans le milieu d'incubation sont effectuées 30, 45 min, 1 heure, 1 heure 30 minutes à fin de faire un dosage enzymatique de glucose.

Notre étude expérimentale réalisée au sein du laboratoire « Antibiotique, Antifongique, Synthèse et Activité Biologique » du département de biologie moléculaire et cellulaire qui comporte : La recherche de l'effet de différentes concentrations d'insuline sur la captation du glucose par des coupes de foie isolées de rats « Wistar » en fonction de temps.

I. Analyse biologique :

1. Les animaux :

Dans ce travail, nous avons utilisé des rats blancs (*Rattus norvegicus*) variété *Wistar* de sexe mâle et femelle âgés de 3 à 6 mois ayant un poids de 170 à 250g.

Les rats sont maintenus dans les conditions favorables d'élevage (au niveau de l'animalerie du département de biologie, faculté des sciences, université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen).

Ces animaux sont nourris avec un aliment complet sous forme de granulés fabriqués par l'O.N.A.B. Remchi Wilaya Tlemcen. Il est composé de maïs, tourteaux de soja, issus de meunerie, plus un complexe minéralo- vitaminiques.

L'eau et l'aliment leur sont fournis ad libitum.

2. L'effet de l'insuline sur la captation du glucose par des coupes fines de foie :

2.1. Préparation du milieu d'incubation KRBA

KRBA (Krebs-Ringer Bicarbonaté Albuminé) est constitué des solutions mères isotoniques au sérum, qui tentent à reproduire la composition du milieu extracellulaire, afin de s'assurer l'intégrité métabolique des coupes de foie isolés lors de l'incubation.

Ce milieu est préparé à partir du KRB (Krebs-Ringer Bicarbonaté) à pH 7.4 et de l'albumine Bovine.

Tableau 1: Préparation du KRB

N°	Solutions mères isotoniques au sérum	Concentration [M]	Concentration [g/L]	Volume nécessaire (ml)
01	Na Cl	0.154	9	1000
02	Ca Cl ₂	0.110	12.2	15
03	KCl	0.154	11.5	40
04	KH ₂ PO ₄	0.154	21.1	10
05	MgSO ₄	0.154	38.2	10
06	NaHCO ₃	0.154	13	210

Le KRB est conservé à 4°C. On prépare à partir du KRBA 4% : le KRBA 4% glucosé à 0.54 g/l (3mM).

Remarque :

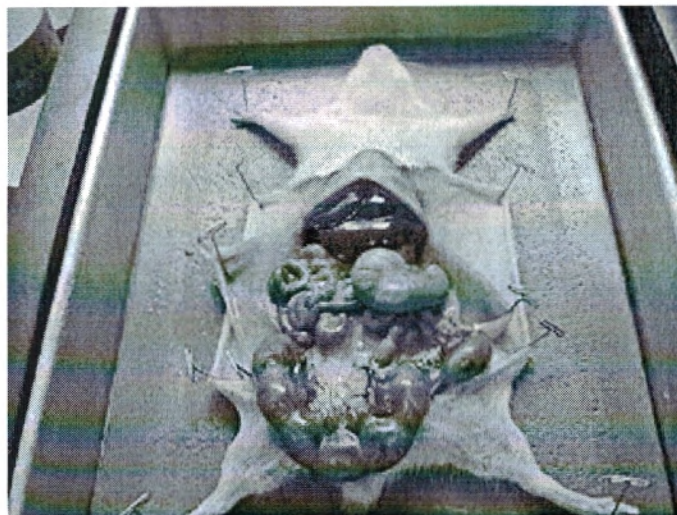
le KRBA 4% est utilisé comme milieu d'incubation de nos coupes de foie ; tandis que le KRBA 1 % est utilisé juste pour le lavage.

2.2. Isolement des coupes de foie de rats

2.2.1. Les rats et dissection

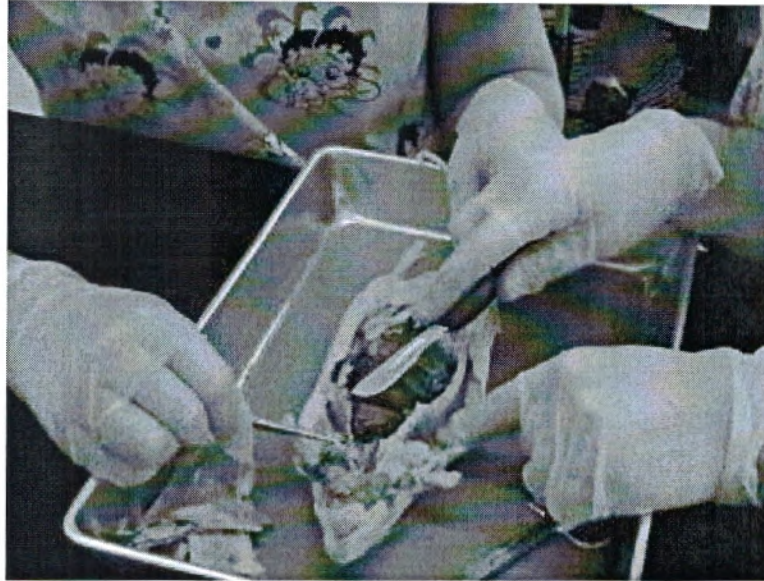
Nous avons utilisé des rats Wistar mâles âgés de 6 mois ayant un poids moyen de 180g.

Les rats sont maintenus à nourris. Ils sont sacrifiés par dislocation cervicale et disséqués.



2.2.2. Récupération de foie et lavage ;

Le foie est rapidement prélevé, déposé dans une boîte de pétri en polyéthylène contenant du sérum physiologique (NaCl 9g/l), nettoyé des vaisseaux sanguins et caillot de sang et puis pesé et découpé en petits morceaux par des lames sous forme de coupes très fines d'environ 1mm d'épaisseur.



2.2.3. Lavage et isolement des coupes de foie

- ❖ On découpe le foie en petits morceaux, on obtient un mélange de tranches de foie.
- ❖ Les coupes cellulaires récupérées est lavée 3 à 4 fois avec 10 ml de KRBA 1% ;
- ❖ A la fin de l'opération de lavage, les coupes cellulaires sont déposées dans le volume nécessaire à notre expérience.

2.3. Incubation des coupes de foie

Au cours de cette étape, nous avons utilisé des boîtes de cultures cellulaires (polyéthylène). Les coupes fines de foie sont mises à incuber dans différents intervalles de temps (30 min, 45minutes, 1heure, 1heure 30minutes) à 37°C sous agitation.

Dans chaque puits, nous avons 1g de suspension avec 2 ml de KRBA 4% contenant du glucose 0.54g/l (3mM).

Les différentes concentrations d'insuline, sont ajoutées aux puits expérimentaux et sont mentionnées dans le tableau ci-dessus.

Remarque : 1- L'insuline utilisée est une solution d'insuline humaine bio synthétique à 100UI/ml (Actrapide **HM, MOVO Nordisk**).

2- Deux témoins sont utilisés :

- ❖ le milieu d'incubation KRBA 4% contenant du glucose (0.54g/l) est incubé en absence des coupes de foie.
- ❖ 1g de coupes cellulaires sont incubées dans le milieu d'incubation KRBA4% contenant du glucose (0.54g/l) en absence d'insuline.

On prend 10 μ l de chaque puits de milieu d'incubation pour faire le dosage enzymatique du glucose restant dans ce milieu.

Tableau 2: Concentrations d'insuline, ajoutées au milieu d'incubation contenant des coupes de foie.

Extraits	Concentrations	KRBA4%+ Glucose 0.54g/l (ml)	Coupe de foie (g)
Témoins		2	KRBA1%
		2	
Insuline	1 μ UI/ml	2	1
	10 μ UI/ml	2	1
	50 μ UI/ml	2	1
	100 μ UI/ml	2	1
	200 μ UI/ml	2	1
	300 μ UI/ml	2	1

2.4. Dosage du glucose

Le dosage du glucose en incubation est un dosage spectrophotométrique enzymatique, à l'aide de Kit de Prochima, selon la méthode de **Trinder [1969]**.

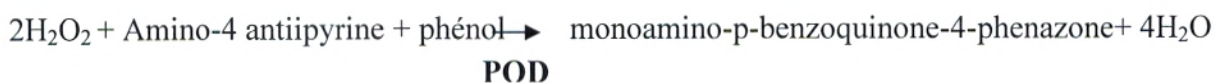
Principe

En présence de glucose-oxydase (GOD), le glucose est oxydé en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier, en présence de peroxyde (POD) et phénol, oxyde un chromogène (4-aminoantipyrine) incolore en un colorant rouge à structure quinoneimie.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de glucose.



GOD: Glucose Oxydase



POD : Peroxydase.

Méthode de dosage

	Blanc	Etalon	Dosage
Solution du travail	1ml	1ml	1ml
Sérum			10µl

On mélange, et on attend 10 mn à température ambiante. Puis on lit la densité optique de dosage à 520 nm (DOD) contre la densité optique de l'étalon (DOE).

Calcul :

$$\text{Taux de glucose} = (\text{DOD}/\text{DOE}) \times 1\text{g/l.}$$

Les teneurs en glucose sont exprimées en g/l et les variations de la glycémie sont exprimées en pourcentage.

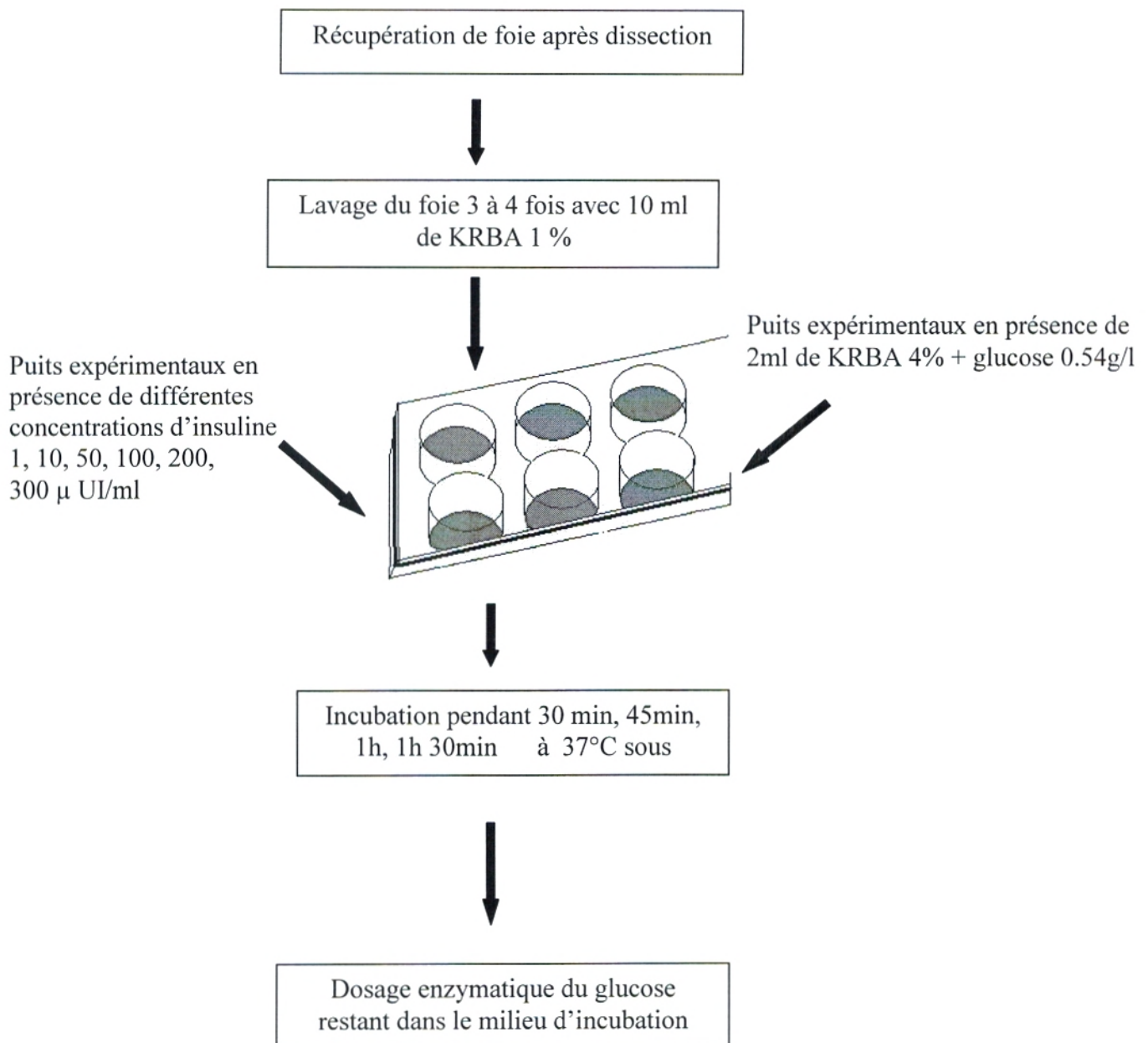


Figure 04: Schéma récapitulatif du mode opératoire de l'incubation des coupes de foie.

3. Analyses statistiques

Les calculs statistiques sont souvent utiles aux biologistes pour la détermination des valeurs normales ou plus exactement des valeurs de référence. Comme pour l'évaluation de précision et l'exactitude d'analyse.

3.1. La moyenne

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_i x_i$$

3.2. La variance

$$V_x = \frac{1}{n} \sum_i (x_i - \bar{x})^2$$

3.3. L'écart-type

$$\sigma_x = \sqrt{V_x}$$

3.4. L'erreur standard de la moyenne (Sm)

$$S_m = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

3.5. Test de Student

Dans les études biologiques il est important de savoir si deux échantillons d'individus ou encore deux ou plusieurs séries de résultats d'expériences ou d'observations doivent être considérés comme réellement différents. On a impliqué ce test à but pour comparer deux moyennes

- En cas de petits échantillons (n_1 et/ou $n_2 < 30$).

$$\sigma^2 = \sigma_1^2 + \sigma_2^2 = \frac{\sum(x-m_1)^2 + \sum(x-m_2)^2}{n_1+n_2-2} \Leftrightarrow \sigma^2 = \frac{n_1\sigma_1^2 + n_2\sigma_2^2}{n_1+n_2-2}$$

Dans ces conditions. La variance standard de la différence des moyennes est :

$$S_d^2 = \sigma^2 \left[\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right]$$

Pour comparer les deux moyennes on applique le teste de Student, à ν degrés de liberté qui dépend de la taille de l'échantillon :

$$\nu = d.l.l = n_1 + n_2 - 2$$

$$t_e = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{\sigma^2 \left[\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right]}}$$

Si le t calculé ou expérimentale est plus élevé que t_ν de la table de Student, la différence entre les moyennes des deux échantillons est significative [Schwartz D, 1992 ; Amotte M, 1971].

La valeur de « t » nous donne le degré de signification « p » lu sur la table de Student. La différence entre deux moyennes est :

Peu significative : $P < 0.05$ (*);

Significative : $P < 0.01$ (**);

Très significative : $P < 0.001$ (***);

Hautement Significative : $P < 0.0001$ (****).

1. Captation du glucose par des coupes de foie :

Cette étude est réalisée, in vitro, sur des tranches de foie isolées à partir des rats Wistar.

L'effet de la captation ou consommation du glucose par des coupes de foie a été évalué en absence ou en présence d'insuline à des concentrations (1, 10, 50, 100, 200, 300 μ UI/ml) et temps d'incubations variables (30, 45min, 1h, 1h 30min).

1.1. Consommation basale de glucose :

La figure **05** représente la concentration de glucose dans le milieu d'incubation (KRBA 4% avec 3mM) , en absence et en présence des coupes de foie incubées pendant 1 heure 30 minutes. Ces essais nous ont permis de vérifier l'état métabolique de nos cellules isolées et leur bon fonctionnement.

Les résultats obtenus montrent une diminution significative du glucose restant dans le milieu d'incubation en présence des coupes de foie par rapport au témoin (milieu d'incubation avec 0.54g/l du glucose en absence des coupes de foie), ce qui montre que les coupes de foie ont une consommation basale du glucose relativement importante, qui peut se faire en absence d'insuline de l'ordre de **7.40%**, soit **0.04g/l** du glucose dans le cas de milieu d'incubation 0.54g/l.

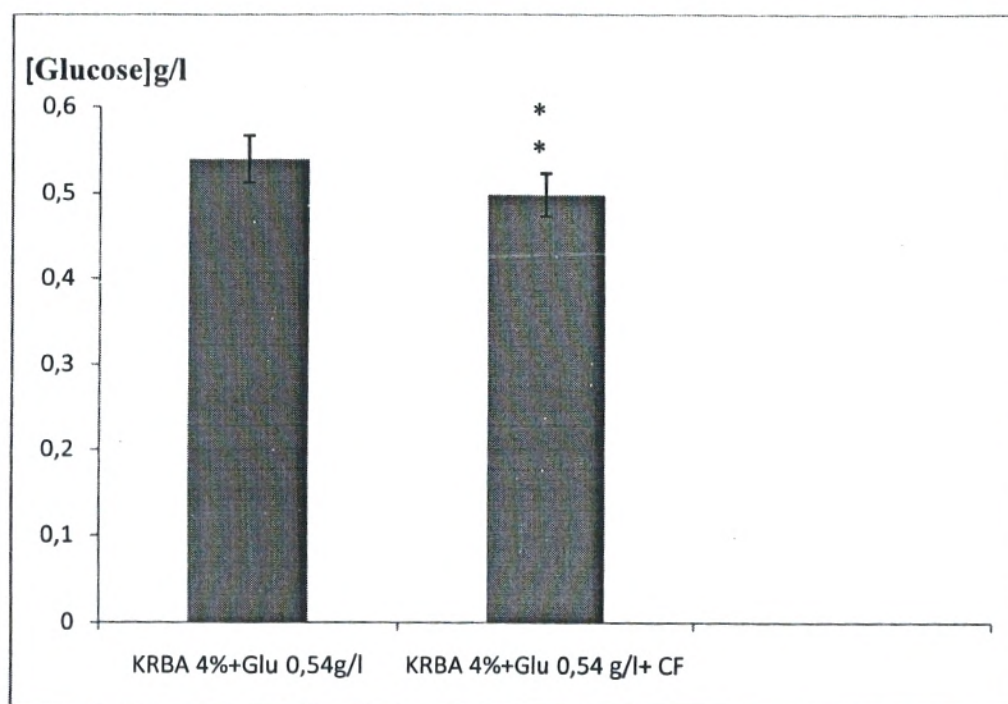


Figure 05: concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0.54 g/l du glucose en absence et en présence des coupes de foie.

1.2. Effet d'insuline sur la captation du glucose par les coupes fines de foie

Tableau 03 : Concentration de glucose restant dans le milieu après incubation en présence des différentes concentrations d'insulines dans un milieu d'incubation KRBA4% (0.54g/l Glu).

Insuline (μ UI/ml)	Glucose restant dans le milieu après incubation g/l \pm SEM				
	0 min	30 min	45min	1h	1h 30min
1	0.54 \pm 0.03	0.52 \pm 0.02	0.53 \pm 0.03	0.52 \pm 0.06	0.52 \pm 0.05
10	0.54 \pm 0.02	0.50 \pm 0.03	0.50 \pm 0.02	0.49 \pm 0.03	0.52 \pm 0.04
50	0.54 \pm 0.04	0.48 \pm 0.06	0.47 \pm 0.02	0.47 \pm 0.03	0.47 \pm 0.02
100	0.54 \pm 0.05	0.47 \pm 0.05	0.46 \pm 0.05	0.45 \pm 0.03	0.47 \pm 0.04
200	0.54 \pm 0.06	0.46 \pm 0.04	0.45 \pm 0.04	0.43 \pm 0.04	0.45 \pm 0.05
300	0.54 \pm 0.03	0.42 \pm 0.05	0.42 \pm 0.02	0.41 \pm 0.05	0.45 \pm 0.06

Tableau 04: Concentration de glucose capté par les coupes de foie en présence des différentes concentrations d'insulines dans un milieu d'incubation KRBA4% (0.54g/l Glu).

Insuline (μ UI/ml)	Glucose capté par les coupes de foie (g/l)				
	0 min	30 min	45min	1h	1h 30min
1	0.00	0.02	0.01	0.02	0.02
10	0.00	0.04	0.04	0.05	0.02
50	0.00	0.06	0.07	0.07	0.07
100	0.00	0.07	0.08	0.09	0.07
200	0.00	0.08	0.09	0.11	0.09
300	0.00	0.12	0.12	0.13	0.09

Tableau 05 : Taux de glucose capté par les coupes de foie en présence des différentes concentrations d'insulines dans un milieu d'incubation KRBA4% (0.54g/l Glu).

Insuline (μ UI/ml)	Taux de glucose capté par les coupes de foie (%)				
	0 min	30 min	45min	1h	1h 30min
1	0.00	0.00	1.85	3.70	3.70
10	0.00	7.40	7.40	9.25	3.70
50	0.00	11.11	12.96	12.96	12.96
100	0.00	12.96	14.81	16.66	12.96
200	0.00	14.81	16.66	20.37	16.66
300	0.00	22.22	22.22	24.07	16.66

CF: coupes de foie.

SEM: l'erreur standard de la moyenne.

Glu : Glucose.

Les figures qui suivent représentent l'effet de l'insuline à différentes concentrations sur la consommation du glucose restant dans le milieu d'incubation 0.54g/l en fonction de temps (0, 30, 45, 60, 90 min) par apport aux témoins.

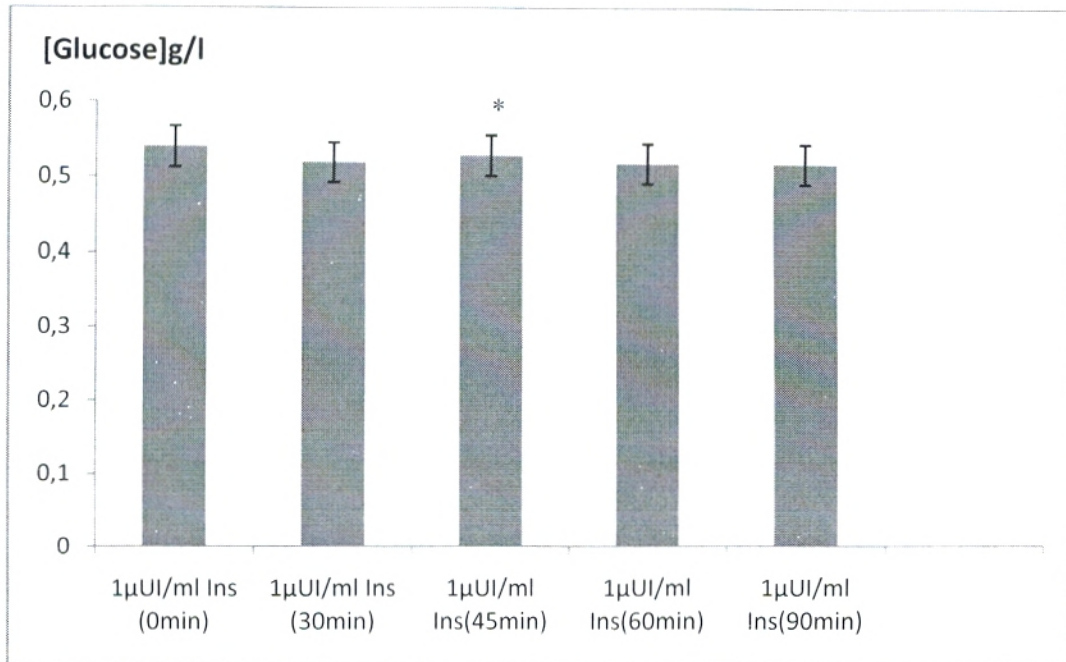


Figure 06 : concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0.54 g/l du glucose en présence de 1 μ U/ml d'insuline pendant 0, 30, 45, 60, 90 min.

En présence d'insuline (**Figure 06**), il a été remarqué que la consommation du glucose restant est plus ou moins fixe et, il n'y a pas de changement significatif important à la concentration d'insuline de 1 μ U/ml dans le milieu d'incubation en présence de 0.54g/l de glucose à 30, 45 minutes, et 1 heure d'incubation.

Cette augmentation peu significative (**P < 0.05**) est observée à 45minutes d'incubation avec un taux de captation de **1.85%** seulement.

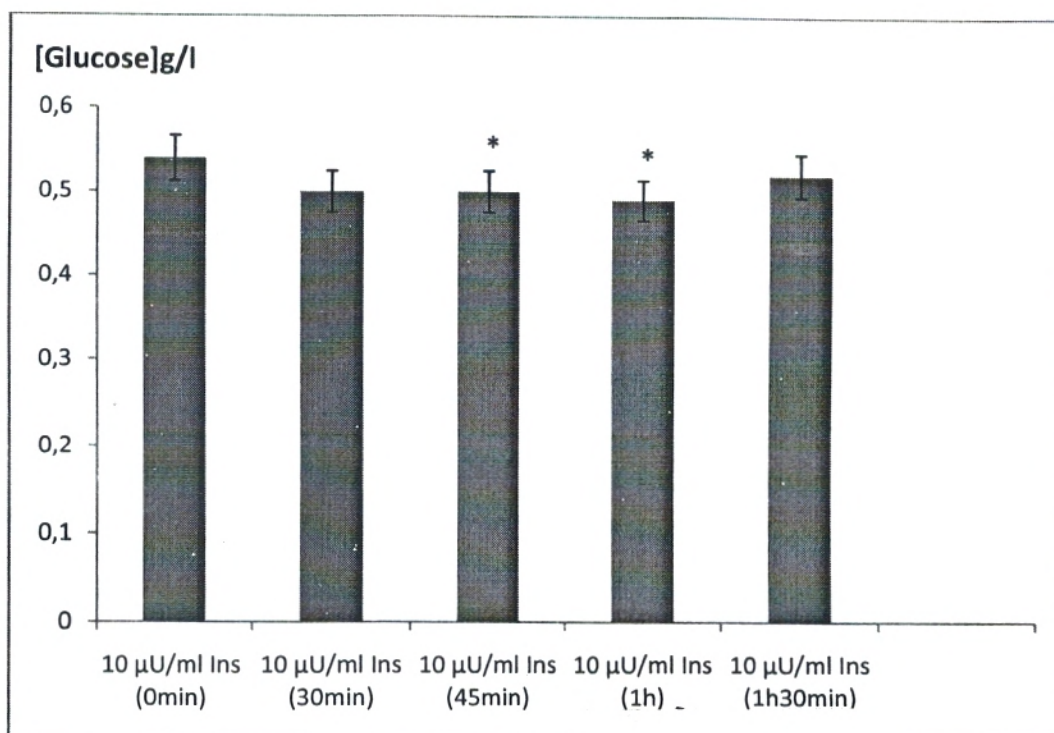


Figure 07 : concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0.54 g/l du glucose en présence de 10µU/ml d'insuline pendant 0, 30, 45, 60, et 90 minutes d'incubation.

En présence d'insuline (**Figure 07**), il a été remarqué que la consommation du glucose restant augmente faiblement à la concentration d'insuline de 10µU/ml dans le milieu d'incubation en présence de 0.54g/l de glucose à 30, 45 minutes, et 1 heure d'incubation.

Cette augmentation est peu significative ($p < 0.05$) avec un taux de captation de **7.40%** pendant 45minutes et de **9.25%** pendant 1 heure d'incubation

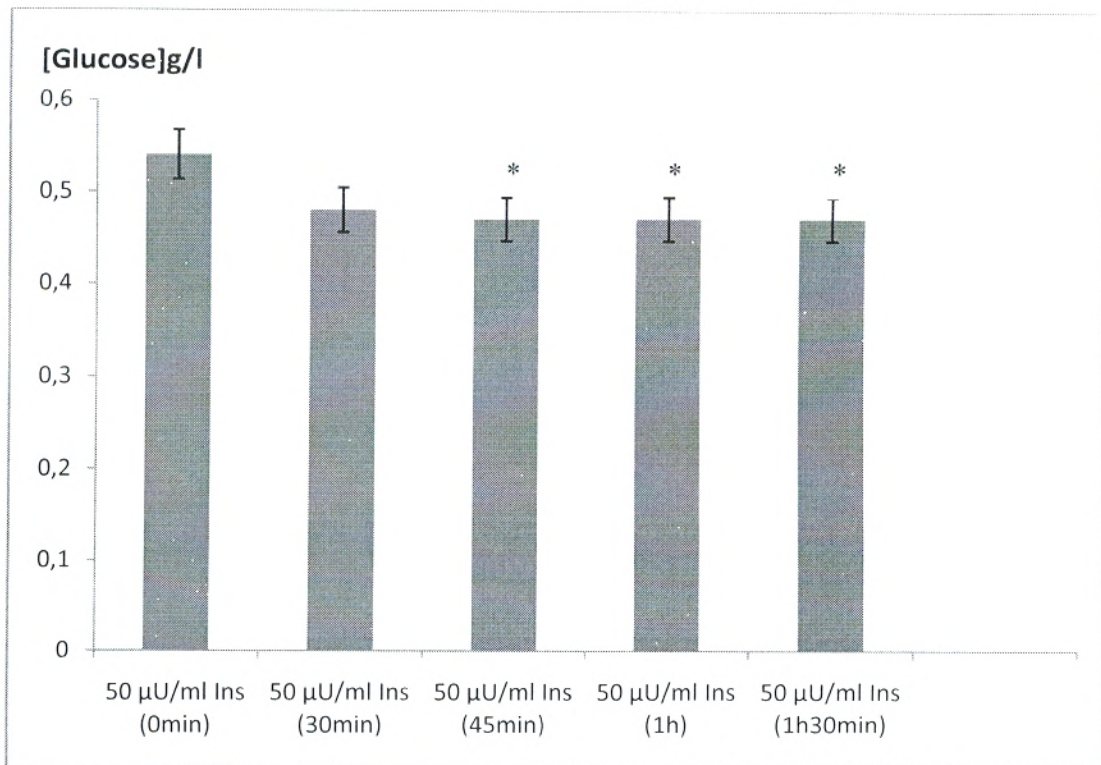


Figure 08: concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0.54 g/l du glucose en présence de 50µU/ml d'insuline pendant 0, 30, 45, 60, et 90 minutes d'incubation.

La figure 08 montre que la consommation du glucose restant augmente progressivement à la concentration d'insuline de 50µU/ml dans le milieu d'incubation (0.54g/l de glucose) à 30, 45 minutes, et 1 heure d'incubation, ce qui confirme que à cette concentration, l'insuline favorise la pénétration du glucose dans les coupes de foie.

Cette augmentation est peu significative ($p < 0.05$) avec un taux de captation d'environ 12.96% pendant 45minutes et 1 heure d'incubation.

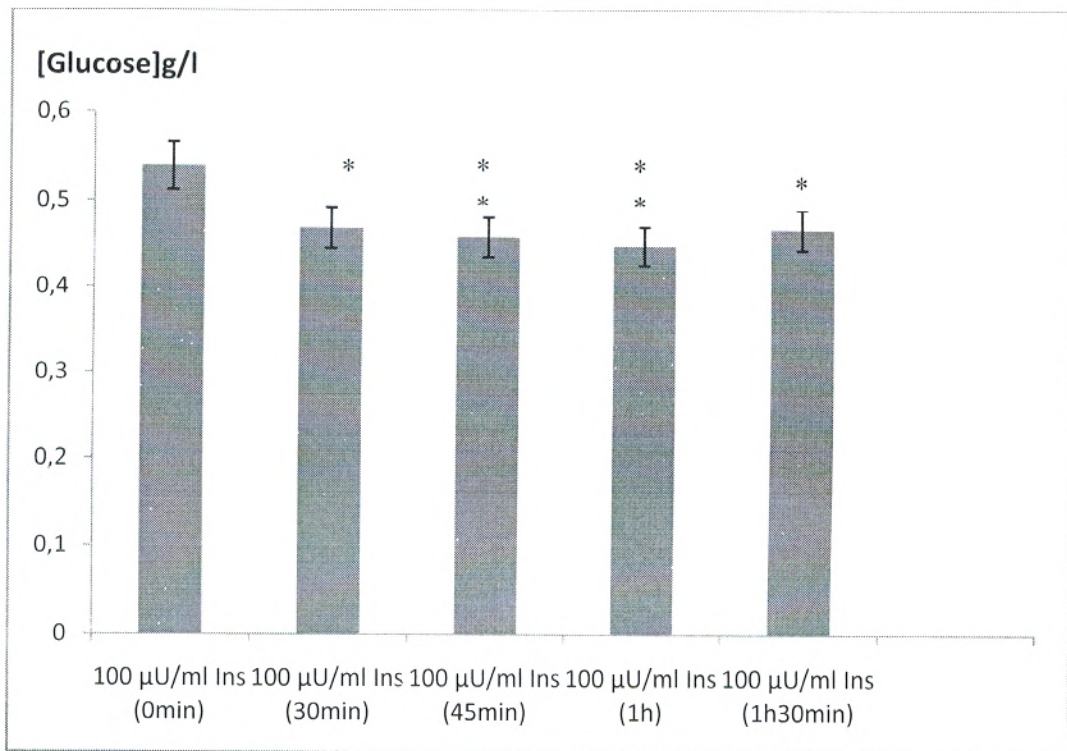


Figure 09 : concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0.54 g/l du glucose en présence de 100μU/ml d'insuline pendant 0, 30, 45, 60, et 90 minutes d'incubation.

En présence d'insuline (**Figure 09**), il a été remarqué que la consommation du glucose restant devient plus prononcée à la concentration de 100μU/ml dans le milieu d'incubation, glucose 0.54g/l à 30, 45 minutes, 1 heure d'incubation.

Cette augmentation est significative ($p < 0.01$) avec un taux de captation de **12.96%**, **14.81%** et **16.66%** pendant 30, 45 et 60 minutes d'incubation respectivement.

Par contre lorsqu'on prolonge l'intervalle du temps jusqu'à 1 heure 30minutes d'incubation, on remarque que la consommation du glucose restant est peu significative ($p < 0.05$), avec un taux de captation d'environ **12.96 %** par rapport au témoin.

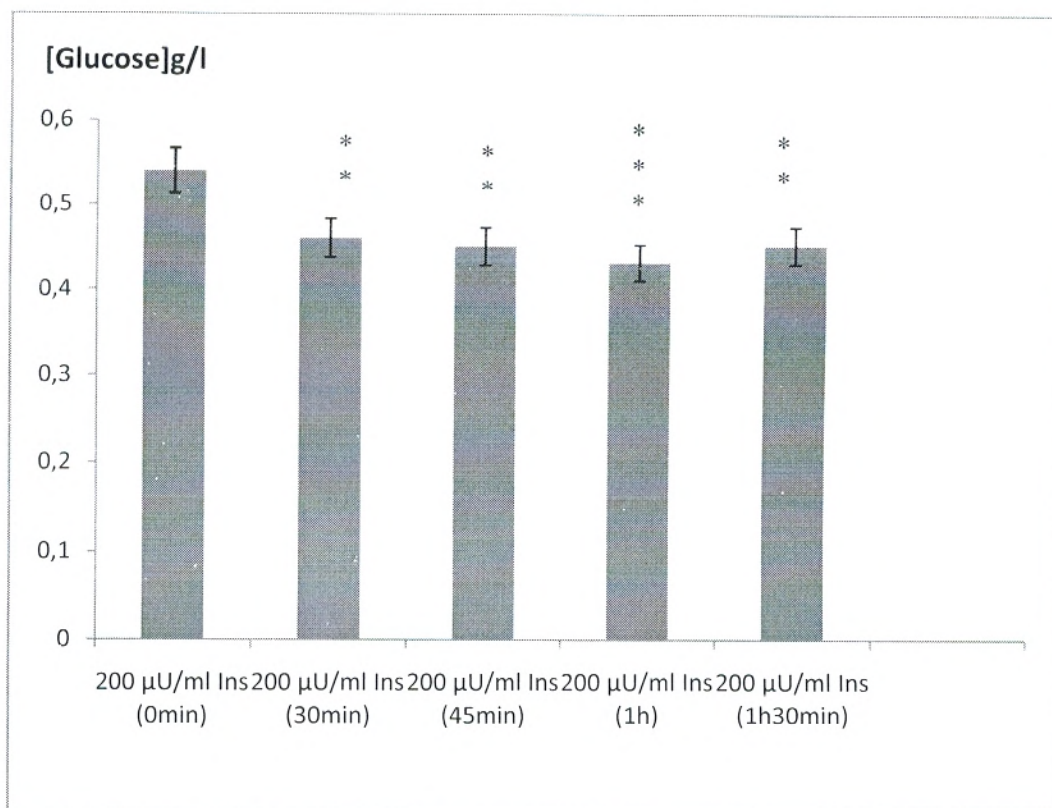


Figure 10 : concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0.54 g/l du glucose en présence de 200μU/ml d'insuline pendant 0, 30, 45, 60, et 90 minutes d'incubation..

En présence d'insuline (**Figure 10**), il a été remarqué que la consommation du glucose restant augmente proportionnellement à la concentration d'insuline de 200μU/ml dans le milieu d'incubation avec 0.54g/l de glucose à des temps d'incubation de 30, 45 minutes, et 1 heure, ce qui confirme que l'insuline active la pénétration du glucose dans les coupes de foie.

Cette augmentation est significative ($p < 0.01$) avec un taux de captation de **14.81 %** pendant 30 minutes, **16.66%** pendant 45minutes et 16.66% pendant 1h 30min, et est très significative ($p < 0.001$) avec un taux de captation de **20.37%** pendant 1heure d'incubation.

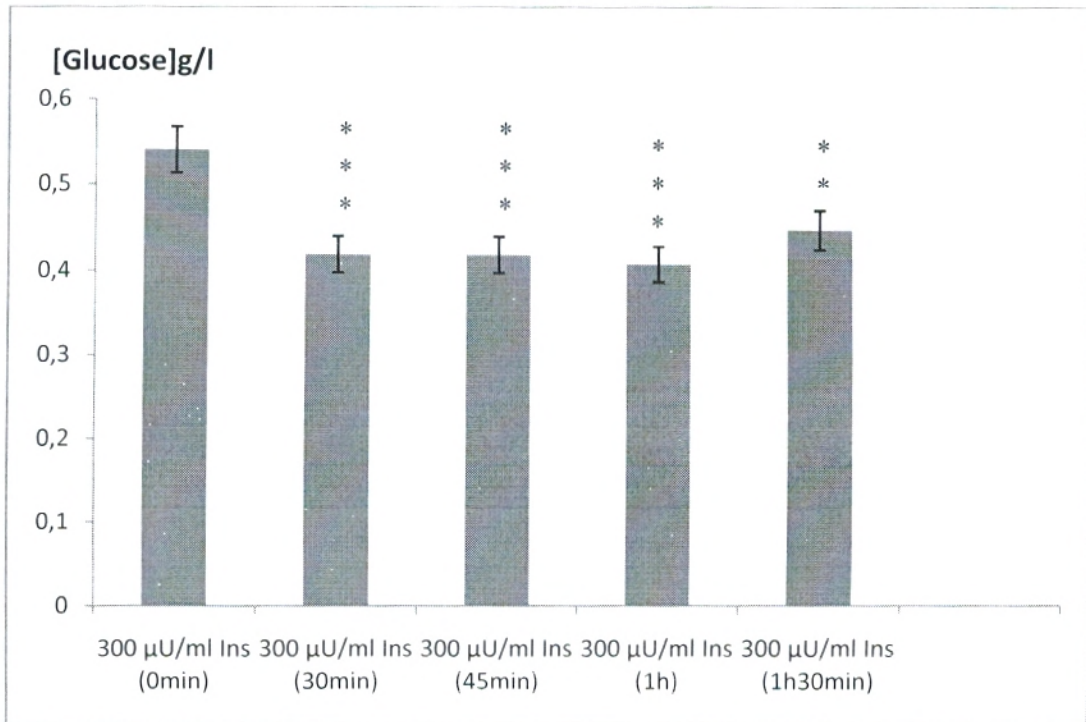


Figure 11 : concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0.54 g/l du glucose en présence de 300µU/ml d'insuline pendant 0, 30, 45, 60, et 90 minutes d'incubation.

En présence d'insuline (**Figure 11**) à la concentration d'insuline 300µU/ml il a été remarqué que la consommation du glucose devient très prononcée.

Cette augmentation est très significative ($p < 0.001$) avec un taux de captation de **22.22%** pendant 30 minutes et **22.22%** pendant 45minutes et de **24.07%** pendant 1 heure.

Par ailleurs, nous remarquons que la consommation du glucose restant devient significative à 1 heure 30minutes d'incubation avec un taux de captation d'environ **16.66%**.

Dans le milieu d'incubation contenant 0.54g/l de glucose et pendant 1heure 30minutes d'incubation, nous notons que l'effet de l'insuline à 300 μ U/ml favorise beaucoup la captation de glucose de manière assez importante.

On peut conclure que l'insuline agit sur la captation du glucose au niveau des coupes fines de foie à partir de 50 μ U/ml après 45minutes d'incubation.

Les hépatocytes représentent un modèle cellulaire de choix pour tester l'effet de l'insuline sur la captation du glucose. En effet, ces cellules interviennent d'une manière très importante dans le métabolisme glucidique, entre autre dans le stockage du glucose sous forme de glycogène qui sera par la suite libéré en fonction des besoins énergétiques de la cellule.

Les résultats obtenus dans nos expérimentations, montre qu'il y a un effet net de l'insuline sur la captation de glucose par les coupes de foie isolées de rats Wistar, dans le milieu réactionnel contenant 0.54 g/l du glucose.

Nous avons choisi le milieu à 0.54g/l pour pouvoir examiner l'entrée du glucose dans les coupes de foie dans un milieu normo glycémique.

Au niveau de foie, l'entrée du glucose à travers la membrane cytoplasmique est contrôlée par l'insuline [Capeau, 2003].

La diminution du glucose (**Figure 05**) observées dans les puits témoins (milieu réactionnelle contenant les coupes de foie isolés sans insuline), est due selon [Antoine B et al, 1997 ; Guerre-Millo M, 1995], au transport basal du glucose par le biais de transporteurs non insulino dépendant. Il a été montré que c'est le transporteur Glut 2.

Ce transporteur est présent à la membrane de toutes les cellules sécrétant du glucose dans la circulation sanguines épithélium intestinale, tissu rénale proximal, les hépatocytes. Le transporteur Glut 2 a une affinité plus faible pour le glucose mais dans la capacité de transport est la plus grande.

Le transporteur Glut 2 apparait jouer deux rôles essentiels, d'importances relatives variables chez l'homme et la souris. Chez l'homme, il est indispensable à la fonction des cellules ayant secrété du glucose dans la circulation sanguine. Le glucose non secrété étant détourné vers l'accumulation de glycogène. Chez la souris outre ce rôle, il permet au glucose d'entrée dans les cellules insulino-sécrétrices et est donc impliqué dans la réponse insulinique du glucose [Antoine B et al, 1997].

En absence d'insuline, on remarque que la concentration du glucose dans le milieu d'incubation diminue de 0.54 à 0.50 g/l (**P < 0.01**).

L'addition de l'insuline dans le milieu d'incubation en concentrations croissantes, provoque plus ou moins une diminution relative de la concentration du glucose restant dans le milieu, ce qui confirme le bon fonctionnement de nos cellules.

En effet, seule la dose 100, 200, 300 μ U/ml d'insuline provoque une diminution assez importante de la concentration du glucose 0.54g/l dans le milieu réactionnel de nos essais et cette diminution est proportionnelle aux temps d'incubation.

Par contre, la dose de 1, 10, 50 μ U/ml provoque une faible diminution du taux de glucose restant dans le milieu, ceci peut s'expliquer par une insensibilisation des récepteurs à l'insuline d'après. **Freychet et al, 2002.**

La captation du glucose par les coupes de foie après 1heure 30minutes d'incubation, semble plus faible, ceci serait probablement dû à une saturation des sites récepteurs de l'insuline dans un premier temps ou à une diminution de leur nombre présents sur les membranes des hépatocytes, et peut être aussi, un début d'un affaiblissement des coupes de foie.

L'effet de l'insuline sur la captation du glucose par des coupes de foie isolées de rats Wistar est confirmé dans la littérature, notamment les travaux de :

Hamza Cherif Ibtissem et Chenini Fatima Zohra, 2006 ; ont isolés les hépatocytes des rats Wistar et étudié l'effet de l'insuline in vitro avec les concentrations de : 0.05, 0.025, 0.0125 UI/ml dans un milieu KRBA 4% + Glu 0.54g/l, ont obtenus une augmentation de la captation du glucose au niveau des hépatocytes, avec un taux de **18.51%, 20.83%, 18.98%** respectivement.

Kholkhal Fatima, 2008 ; à étudié l'effet de l'insuline sur les coupes de foie isolées de rats Wistar. L'auteur montre qu'il existe une augmentation significative (**p<0.01**) de la captation de glucose à une concentration de l'insuline de 100 μ U/ml dans un milieu KRBA 4%+ Glu 0.54g/l avec un taux de captation d'environ **19.60%** pendant 30minutes, et **27.45%** pendant 1heure d'incubation. A 500 μ U/ml d'insuline, un taux de captation de glucose de **23.53%** pendant 30minutes, et de **25.5%** pendant 1heure d'incubation.

Le diabète reste jusqu'à ce jour une affection très compliquée dont le traitement est basé sur l'administration de l'insuline et les hypoglycémifiants oraux.

Pour remédier à ce problème de santé publique, de nombreux travaux tentent de trouver des alternatives à partir d'extrait de plantes médicinales. Le même objectif est réalisé dans notre laboratoire de recherche, d'antibiotiques, antifongique, physico-chimie et synthèse biologique.

Les biomolécules active de plantes médicinales supposées avoir un effet anti-hyperglycémifiants sont confrontées à l'effet de l'insuline sur des cellules en culture.

A la lumière des résultats préliminaires obtenus, nous pouvons conclure que les concentrations de l'insuline qui ont un effet anti hyperglycémifiant à court terme, corrigeraient les désordres métaboliques glucidiques (hyperglycémie), stimuleraient la captation du glucose à partir de la concentration d'insuline de 50 $\mu\text{U/ml}$ sur 1 gramme de tissu hépatique en présence de 0.54 gramme de glucose (KRBA à 4 %).

L'activité maximale de l'insuline sur la captation de glucose est observée à une concentration de 300 $\mu\text{U/ml}$ entre 30 et 60 minutes d'incubation.

En définitive, ce travail s'il fixe des résultats certains, ouvre des perspectives et des pistes de recherche,

- Il serait intéressant de refaire ces expérimentations sur un nombre d'animaux plus important (in vitro) et sur des cellules en culture proprement dite pour confirmer nos résultats.
- Tester l'effet de l'insuline sur une durée plus longue.
- Etudier in vitro l'action de l'insuline sur les cellules β pancréatiques isolées et sur les tissus périphériques insulinosensible isolés (muscles et tissu adipeux) ;
- Evaluer l'effet combiné de l'insuline avec d'autres antidiabétiques.

1. **Association d'aide aux diabétiques Tlemcen; 2006.** Sidi Cheker.Tlemcen.
2. **Annicotte J S ; 2004.** Etude des fonctions pancréatiques du récepteur nucléaire orphelin Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1) et du facteur de transcription E2F1. Thèse de Doctorat en Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie, l'Université Strasbourg 1 (Louis Pasteur) : 31-55.
3. **Baudin G; 2001.** biologie du diabète: Imagerie fonctionnelle et métabolique. Médecine Nucléaire ; 25.2: 55-60.
4. **Bertolotti A, Ron D, 2001,** "Alterations in an IRE1-RNA complex in the mammalian unfolded protein response." *J Cell Sci* 114(Pt 17):3207-12.
5. **Bergman RN. 2000.** Non-esterified fatty acids and the liver: why is insulin secreted into the portal vein? *Diabetologia.*; 43(7):946-52.
6. **Brozinick JT Jr, Berkemeier BA, Elmendorf JS. 2007,** "Actin"g on GLUT4: membrane & cytoskeletal components of insulin action. *Curr Diabetes Rev.*; 3(2):111-22.
7. **Capeau J; 2003.** Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance. *Med Sci (Paris)*; 19 (8-9): 834-839.
8. **Capet F, Debaillie R, Tafforeau J et Van Oyen H; 1999.** Situation Actuelle et Eléments pour le Développement d'une Politique de Santé : diabète épidémiologie. *CROSP* ; 19 : 1-12 ; 27-28.
9. **De Meyts P; 2004.** Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *Bioessays*; 26(12): 1351-1362.
10. **Duron F et Heurtier A ; 2006.** Epidémiologie, clinique et traitement des diabètes. *Endocrinologie. DCEM1 - Examen National Classant 2006 – 2007, Université Paris-VI*; 232 : 239-299.
11. **Fontbonne A et Simon D ; 2004.** Epidémiologie du diabète. In *Diabète de type II*, coordonné par Grimaldi A. EMC référence, Elsevier, Paris : 23-44.
12. **Floyd JC, Fajans SS, Conn JW, 1966.** Stimulation of insulin secretion by amino acids. *J Clin Invest*; 45: 1487-1502.
13. **Grimaldi A ; 1999.** Diabétologie. Questions d'internat. *CHU-PS* : 15-23 ; 99-129.
14. **González-Sánchez JL, Serrano-Ríos M.** Molecular basis of insulin action. *Drug News Perspect.* 2007; 0(8):527-31.

15. **Girard J. 2003**, Rôle des acides gras libres dans la sécrétion et l'action de l'insuline: mécanismes de la lipotoxicité. M/S : médecine sciences. Volume 19, numéros 8-9.
16. **Gruppig AY, Cnop M, Van Schravendijk C, Hannaert J, Van Berkel T, Pipeleers D. 1997**, Low density lipoprotein binding and uptake by human and rat islet β -cells. *Endocrinology*; 138: 4064-8.
17. **Gin H et Rigalleau V; 1999**. Diététique et Diabetes. *Encycl Med Chir (E.M.C)* ; Elsevier, Paris ; Endocrinologie- Nutrition 10-366-R-10.
18. **Halimi S et coll. ; 1999**. traitement médicamenteux du diabète de type 2. Agence françaises de sécurité des produits de santé. recommandation de bonne pratique : 13-19.
19. **Halimi S et coll. ; 1999**. traitement médicamenteux du diabète de type 2. Agence françaises de sécurité des produits de santé. recommandation de bonne pratique :13-19.
20. **HOLST J. H.; 1994** Glucagonlike peptide 1: a newly discovered gastrointestinal hormone 1994, vol. 107, n°6, pp. 1848-1855.
21. **Idelman S, Verdetti J, 2000**. Endocrinologie et communications cellulaires. Collection Grenoble Sciences.
22. **Ishiki M, Klip A. 2005**, Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners. *Endocrinology*. 146(12):5071-8.
23. **John Ryan, Ph.D. 2007**. Introduction à la culture de cellules animales Bulletin technique Corning Incorporated Printed in E.U. 6/05 KP 5M CLS-AN-042 Français.
24. **Joffre M. 2003**, Cours de maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie. Université de Poitiers.
25. **Larger E ; 1998**. Mécanismes d'action des antidiabétiques oraux. *Médecine Thérapeutique*, Paris ; Hors Série: 97- 102.
26. **Malaise WJ. 2002**, Acides aminés et insulinosécretion. *Mèdecine/Sciences éditons Flammarion*, journées de diabétologie.
27. **Ménard S, Valagussa P, Pilotti S, Biganzoli E, Boracchi P, Casalini P, Tomasic G, Marubini E, Colnaghi MI, Cascinelli N, Bonadonna G, 1999**. Benefit of CMF treatment in lymph node-positive breast cancer overexpressing HER2. *Proc Am Soc Clin Oncol.*; 18:257.
28. **Malaise WJ, 1986**. Branched-chain amino and keto acid metabolism in pancreatic islets. *Adv Enzyme Regul*; 25:203-17.

29. **Milburn JL Jr, Ohneda M, Johnson JH, Unger RH, 1993.** Beta-cell GLUT-2 loss and non-insulin-dependent diabetes mellitus: current status of the hypothesis. *Diabetes Metab Rev.*; 9(3):231-6.
30. **Mittelman SD, Bergman RN. 2000,** Inhibition of lipolysis causes suppression of endogenous glucose production independent of changes in insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*; 279(3):E630-7.
31. **OMS (Organisation Mondiale de la Santé) ; 2002.** Diabète sucré. Aide mémoire ; N°138.
32. **Perlemuter L, Sélam JL, Collin de l'Hortet. 2003,** Diabète et maladies métaboliques. Edition Masson 4^{ème} édition..
33. **Raisonnier A, Kottler M L et Wright F; 2004.** Réserves Energétiques. Objectifs au cours de Biochimie PCEM2 Biochimie métabolique et Régulations C1 2003 – 2004. Université Paris-VI : 37-38.
34. **Roden M, Price TB, Perseghin G, et al. 1996,** Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest*; 97: 2859-2865.
35. **SALAS M; SILVESTRE R.A; GARCIA-HERMIDA O ; FONTELA T ; RODRIGUEZ-GALLARDO J; MARCO J ; 1995,** Effet Inhibiteur de l'amyline sur l'insulino-sécrétion en réponse a des stimuli non glucosés. Etude sur le pancréas perfusé de rat, Vol. 21, N°4, Pp. 269-273.
36. **Sachon C, Cornet P et Grimaldi A ; 2004.** Diagnostic du diabète. In Diabète de type II, coordonné par Grimaldi A. EMC référence, Elsevier, Paris : 83-101.
37. **Sener A, Blachier F, Raschaert. 1988,** Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release. Comparison with lysine-induced insulin secretion. *Endocrinology*, , 124: 2558-2567.
38. **Scheepers A, Joost HG, Schürmann A, 2004.** The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPENJ Parenter Enteral Nutr.*; 28(5):364-71.
39. **Timmerman KL, Volpi E. 2008,** Amino acid metabolism and regulatory effects in aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.*; 11(1):45-9.
40. **Van Kempen AA, van der Crabben SN, Ackermans MT, Endert E, Kok JH, Sauerwein HP. 2006,** Stimulation of gluconeogenesis by intravenous lipids in preterm infants: response depends on fatty acid profile. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*; 290(4):E723-30.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 41. Wens Johan, Patricia Sunaert, Frank Nobels, Luc Feyen, Paul Van Crombruggen, Bastiaens H, Royen P, V, 2007.** Diabète sucré de type 2. Recommandation de bonne pratique. Société Scientifique de Médecine Générale (SSMG), 02 : 3-72.
- 42. Wiernsperger NF, 2005.** Is non-insulin dependent glucose uptake a therapeutic alternative? Part 2: Do such mechanisms fulfil the required combination of power and tolerability? Diabetes Metab; 31(6):521-5.