

Aliments et nutriments

Les protéines de sardine atténuent l'hyperglycémie et le stress oxydant chez le rat diabétique de type 2

Sardine proteins mitigate hyperglycemia and oxidative stress in type 2 diabetic rat

Nora BENAICHETA¹, Fatima Zohra LABBACI, Malika BOUCHENAK, Farida Ouda BOUKORTT

Laboratoire de Nutrition Clinique et Métabolique, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université d'Oran1. BP 1524 El M'Naouer, 31000 Oran, Algérie.

Reçu le 26 novembre 2014, Révisé le 22 mars 2015, Accepté le 9 avril 2015

¹ Auteur correspondant : nbenaicheta@gmail.com (BENAICHETA Nora)

Résumé Introduction. Le diabète s'accompagne d'un stress oxydant favorisant le développement de la maladie. **Objectif.** L'effet des protéines de sardine (PS) est déterminé sur l'équilibre glycémique, et le statut antioxydant chez des rats présentant un diabète de type 2. **Matériel et méthodes.** Des rats mâles consomment un régime hyperlipidique (RH) pendant 5 semaines, suivi de l'injection d'une faible dose de streptozotocine. Les rats diabétiques (n = 24) sont répartis en 4 groupes et sont soumis à un régime à 20% de caséine (CAS) ou de PS associées à 5 ou 30% de lipides (RH-CAS ou RH-PS), pendant 28 jours. **Résultats.** Une réduction du glucose sérique, de l'HbA1c et de l'insulinémie est notée chez le groupe PS vs CAS. De plus, l'indice HOMA-IR diminue chez le groupe PS vs CAS associé à 5 ou 30% de lipides. Des concentrations élevées en substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) sont notées avec RH au niveau du cœur et des reins. Les teneurs en carbonyles sont augmentées au niveau de tous les organes chez le groupe RH-CAS vs CAS, alors que les PS entraînent une diminution des teneurs en TBARS et en carbonyles au niveau des tous les organes. Chez le groupe RH-CAS vs CAS, l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxidase (GPx) est réduite au niveau de tous les organes, et celle de la catalase (CAT) au niveau du foie et des reins. De plus, l'activité de la SOD et de la GPx est réduite au niveau des reins chez le groupe RH-PS vs PS, alors que les PS

augmentent l'activité de toutes les enzymes tissulaires, quelle que soit la teneur en lipides dans le régime. **Conclusion.** Les PS améliorent l'équilibre glycémique et atténuent les marqueurs du stress oxydant en stimulant l'activité des enzymes antioxydantes tissulaires.

Mots clés : Rat, régime hyperlipidique, protéines de sardine, diabète de type 2, stress oxydatif, enzymes antioxydantes

Abstract Introduction. Diabetes is accompanied by oxidative stress favoring the disease development. **Objectives.** This study was undertaken to investigate the effect of sardine proteins on glycemic control and antioxidant status, in type 2 diabetic rats. **Material and Methods.** Male rats fed with high fat diet (HF, 30% lipids) for 5 weeks, and injected intraperitoneally with low dose of streptozotocin, were used. Diabetic rats (n=24) were divided into 4 groups and fed casein (CAS) or sardine proteins (SP) combined with 5 or 30% lipids, for 28 days. **Results.** Serum glucose, HbA1c and insulinemia decreased in SP vs CAS. In CAS-HF vs CAS, high values were observed in *thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)* of heart and kidney and in carbonyls of all tissues. In contrast, SP lowered TBARS and carbonyls in all tissues. In CAS-HF vs CAS, decreased activity was observed in superoxide dismutase (SOD), glutathion reductase (GSSH-Red), glutathione peroxidase (GPx), and catalase (CAT) in liver and kidney. In SP-HF vs SP, SOD and GPx activities were reduced in kidney. In contrast, SP with 5 or 30% lipids increased SOD, GPx, GSSH-Red and CAT activities in all tissues. **Conclusion.** SP improve glycemic control and attenuate oxidative stress by increasing antioxidant enzymes activities.

Key words: Rat, high fat diet, sardine proteins, type 2 diabetes, oxidative stress, antioxidant enzymes

Introduction

Le diabète sucré, en particulier le diabète de type 2 (DT2), l'un des facteurs de risque des maladies cardiovasculaires (MCV), représente un enjeu majeur de santé publique. Sa prévalence a augmenté de façon exponentielle au cours des 20 dernières années et selon les prévisions de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 350 millions de personnes dans le monde seront touchées par cette pathologie en 2020 [1]. Cette prévalence augmente en raison d'une prédisposition génétique couplée à une modification rapide du mode de vie.

Les phénomènes physiopathologiques menant au DT2 et aux MCV peuvent être modulés par le régime alimentaire. En effet, les acides gras polyinsaturés oméga-3 et les protéines de poisson ont des effets bénéfiques sur plusieurs facteurs de

risque des MCV. Plusieurs études ont été effectuées afin d'observer les effets de la protéine de poisson sur le métabolisme de l'insuline et du glucose. Il a été démontré, notamment, que la consommation des protéines de morue améliore la sensibilité du muscle à l'insuline, chez des patients insulino-résistants [2] et augmentent l'absorption du glucose, chez des rats normoglycémiques [3]. Ce phénomène a été également observé chez des rats obèses [4]. De plus, des études ont rapporté que les protéines de sardine entraînent une réduction de la glycémie et de l'HbA1c chez des rats rendus diabétiques par injection de streptozotocine [5].

De nombreuses études suggèrent que le diabète s'accompagne d'un stress oxydant qui favorise le développement de la maladie, en perturbant l'insulino-sécrétion, en favorisant l'insulino-résistance et les complications cardiovasculaires

qui y sont associées. Ce stress oxydant est dû à une rupture de l'équilibre entre les molécules oxydantes et les systèmes de défense antioxydants [6]. En effet, il a été montré que l'hyperglycémie induit la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO) *via* plusieurs mécanismes : auto-oxydation du glucose, voie des polyols, glycation avancée des protéines [7]. Ces ERO réagissent sur les molécules lipidiques, protéiques, glucidiques et nucléiques, à l'origine des complications dégénératives de la maladie [8]. A ce jour, très peu d'études se sont intéressées aux effets des protéines de poisson sur le stress oxydatif accompagnant le diabète. Celle qui existe rapporte l'effet bénéfique des protéines de poisson sur le stress oxydatif, chez des rats hypertendus et diabétiques [9].

Dans cette optique, l'objectif de cette étude est donc d'examiner si les protéines de sardine purifiées sont susceptibles d'atténuer les perturbations de l'homéostasie glucidique ainsi que le stress oxydatif chez des rats présentant un diabète de type 2.

Matériel et méthodes

Préparation des protéines de sardine

Les protéines de sardine sont isolées à partir des filets de sardine selon la méthode de Undeland *et al.*, (2002) [10]. Cent g de farine de sardine délipidée sont dilués dans 1 L d'eau distillée glacée. Le pH est ajusté à 10,8 avec de la soude (2N), sous agitation, afin de solubiliser les protéines. Le mélange est centrifugé à 4°C à 10.000 x g, pendant 40 min afin d'éliminer les composés non solubles. Le culot contenant les protéines est récupéré et séché à l'étuve à 45°C, pendant 2 jours. Les protéines sont broyées, pesées et conservées dans un bocal hermétiquement fermé au frais. Les protéines purifiées contiennent 92% de protéines, 0,2% de lipides et 4,8% de sels minéraux.

Animaux et régimes

Des rats mâles de souche Wistar (Institut Pasteur, Alger) (n = 24), pesant 260±25 g sont utilisés dans cette étude. Les animaux sont maintenus dans une animalerie dans des conditions environnementales standard (23±1°C, 55±5% d'humidité

et un cycle de lumière de 12h jour/nuit) et sont soumis à un régime standard (ONAB) (Office National de l'aliment de Bétail, Oued Tlalat, Oran). Les conseils pour la protection et l'utilisation des animaux de laboratoire sont suivis [11].

Le diabète est induit par un régime hyperlipidique contenant 30% de lipides dont 67% d'acides gras saturés provenant du beurre, combinés à 20% de caséine pendant 5 semaines. A la fin de cette période, une injection intrapéritonéale d'une faible dose de streptozotocine (STZ) (35 mg/kg de poids corporel (PC)) diluée dans du tampon citrate (0,05 mol/L, pH 4,5) est administrée aux rats. L'hyperglycémie est confirmée 48 heures après injection de STZ, sur un prélèvement sanguin effectué au niveau de la veine de la queue en utilisant un glucomètre (Glucotrend, Meylan, Germany). Les rats diabétiques sélectionnés sont, ensuite, répartis en 4 groupes de 6 rats chacun et reçoivent pendant 28 jours des régimes contenant 20% de caséine ou de protéines de sardine, combinées soit à 5% d'un mélange d'huiles (huile de tournesol 0,1% ; olive 3,9% ; noix 1%) (CAS, PS) ou à 30% de lipides (beurre) (RH-CAS, RH-PS).

La composition pondérale des régimes est présentée dans le Tableau I. Les régimes et l'eau sont donnés à volonté.

Prélèvement des échantillons sanguins et des organes

Après 28 jours d'expérimentation, les 4 groupes de rats sont anesthésiés, après 12 h de jeûne, par injection intrapéritonéale d'une solution de chloral à 10% (300 mg/kg PC). Le sang est prélevé par ponction de l'aorte abdominale dans des tubes contenant 0,1% d'EDTA-Na₂ et centrifugé à 1000 x g pendant 20 min à 4°C. Le sérum est récupéré. Les organes (foie, cœur, reins) sont soigneusement prélevés, rincés avec une solution fraîche de NaCl à 0,9% et pesés. Le sérum et les organes sont conservés à -70°C.

Analyses biochimiques

Détermination du glucose, insuline, hémoglobine glycosylée (HbA1c) et indice HOMA-IR

La teneur en glucose est déterminée par méthode enzymatique (Kit Spinreact, Spain). Le dosage de

l'insuline s'effectue selon une technique immuno-enzymatique (kit EIA, Spi-Bio, France). L'HbA1c est déterminée par méthode chromatographique sur microcolonne (kit Biosystem, Spain). Après préparation de l'hémolysat, la fraction labile est éliminée. Les hémoglobines sont retenues par une résine échangeuse de cations. L'HbA1c est spécifiquement éluée après élimination par lavage de la fraction HbA1a+b, et quantifiée par spectrophotométrie à 415 nm. La proportion d'HbA1c est donnée en pourcentage de l'hémoglobine totale dans l'échantillon. L'Homeostasis model assessment (HOMA-IR) permet de mettre en évidence une insulino-résistance périphérique. Il est calculé par la formule suivante : [Glycémie (mmol/L) x Insulinémie (µU/mL)]/22,2 [12].

Tableau I. Composition pondérale et énergétique des régimes (g/kg de régime)

Composition	CAS	PS	RH-CAS	RH-PS
Caséine ¹	200	-	200	-
Protéine de sardine	-	200	-	200
Saccharose ²	50	50	50	50
Amidon ³	590	590	340	340
Cellulose ¹	50	50	50	50
Vitamines ⁴	20	20	20	20
Sels minéraux ⁷	40	40	40	40
Huiles ⁶ (olive ⁷ , tournesol ⁸ , noix ⁹)	50	50	-	-
Beurre ¹⁰	-	-	300	300
Energie (MJ)	15,92	15,92	21,15	21,15

Les régimes sont donnés sous forme de poudre. ¹Prolabo, Paris, France. ²Enasucré, Sfiseef, Algérie ³ONAB, sidi Bel Abbés, Algérie. ⁴UAR 200 (Villemoisson, 91360, Epinay/Orge, France). Composition du mélange vitaminique(mg/kg) : rétinol, 12; inositol, 300; cyanocobalamine, 0,1; acide ascorbique, 1600; dl-α-tocophérol, 340; ménadione, 80; acide nicotinique, 200; acide para-aminobenzoïque, 100; acide folique,10; biotine,0,6. ⁵UAR 205 B (Villemoisson, 91360, Epinay/Orge, France). Composition du mélange minéral (g/kg de régime) : Ca, 4 ; K, 2,4 ; Mg, 0,4; Fe, 0,12 ; éléments (traces) : Mn, 0,032 ; Cu, 0,005 ; Zn, 0,018 ; Co, 0,00004 ; I, 0,00002, complété à 40000 avec la cellulose. ⁶Le mélange d'huile est constitué de : 3,9% d'huile d'olive, 1% d'huile de tournesol, et 1% d'huile de noix avec un rapport n-6 /n-3=7. ⁷Huile d'olive, IFRI, Bejaïa, Algérie. ⁸Cevital, Bejaïa, Algérie. ⁹Cauvin, France. ¹⁰Beurre en vrac, Oran, Algérie.

Dosage du cholestérol total et triglycérides du foie et du sérum

Les lipides totaux du foie sont extraits avec un mélange chloroforme : méthanol (2 : 1, v : v) selon la technique de Delsal (1944) [13]. Les

concentrations en cholestérol total (CT) et en triglycérides (TG) du sérum et de l'extrait lipidique du foie sont déterminées par méthode colorimétrique enzymatique (kits Spinreact, Espagne). La lecture se fait à une longueur d'onde λ = 500 nm.

Détermination des marqueurs du stress oxydatif

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

La peroxydation lipidique au niveau tissulaire est déterminée par la mesure des TBARS, selon la technique de Salih *et al.*, 1987 [14]. Les homogénats tissulaires sont préparés à raison de 100 mg de tissu broyé dans 1,5 mL d'acide trichloracétique (TCA) à 10%. Le milieu réactionnel contient 0,25 ml d'homogénat, 0,25 mL d'acide thiobarbiturique (TBA) (0 ,02 M) et 10 µL du buthylhydroxytoluène (BHT à 1 µg/mL d'éthanol). L'incubation dans des tubes à vis bouchés se fait à 100°C pendant 30 min. Les tubes sont placés dans un bain glacé pendant 45 min. La concentration en TBARS est mesurée à 532 nm et les résultats sont exprimés en µmol/g de tissu. La concentration en TBARS est déterminée par la formule suivante : C (µmoles de MDA /g) = densité optique x 10⁴ x pesée⁻¹ x volume TCA x 0,641 x 1/2 dilution.

Dosage des dérivés carbonylés tissulaires

Le dosage des dérivés carbonylés tissulaires se fait selon la méthode de Levine *et al.*, (1990) [15] en utilisant le 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH). 100 mg de tissu sont homogénéisés dans 2,4 mL de tampon incubés pendant 15 min à température ambiante et ensuite centrifugés à 11000 x g. Dans 2 tubes, sont déposés 100 uL d'homogénat ou 100µL de sérum. Dans l'un des tubes, sont ajoutés, soit 0,5 mL d'HCl (2,5 M) (blanc échantillon), soit 0,5 mL de DNPH (10 mM) (à l'abri de la lumière). L'incubation se fait pendant 1h à température ambiante à l'obscurité en agitant toutes les 10-15 min. 0,5mL d'acide trichloroacétique (TCA) à 20% est ajouté dans chaque tube. Après homogénéisation, les tubes sont centrifugés à 11000 x g, 3 min à 20°C. Le surnageant est éliminé et le culot (contenant le DNPH, seulement) est lavé 3 fois avec 1 mL d'un mélange éthanol-acétate d'éthyle (1 : 1, v : v), puis centrifugé. Le surnageant

est éliminé à chaque fois. Les protéines précipitées sont dissoutes dans 0,6 mL d'une solution de guanidine 6M et incubées 15 min à 37°C. Une centrifugation à 11000 x g pendant 3 min, permet d'éliminer les débris insolubles. Un spectre d'absorption est réalisé entre 250 et 300 nm et la différence de DO entre blanc (traité avec HCl) et échantillon est estimée. Le contenu en dérivés carbonylés est calculé en utilisant un coefficient d'absorption molaire $\epsilon = 22000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Les concentrations en protéines totales sont déterminées par la méthode de Lowry *et al.*, (1951) [16].

Détermination de l'activité des enzymes antioxydantes tissulaires

L'activité de la superoxyde dismutase (SOD), de la glutathion peroxydase (GPx) et de la glutathion réductase (GSSH-Red) est déterminée par méthode enzymatique (Kits Cayman Chemical Compagny). L'activité de la catalase est mesurée selon la méthode de Aebi, (1974) [17] par mesure du taux de décomposition du H_2O_2 à une longueur d'onde égale à 420 nm.

Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ erreur standard ($M \pm ES$) de 6 rats par groupe. Après analyse de variance (ANOVA), la comparaison des moyennes entre les 4 groupes de rats diabétiques est réalisée par le test LSD, à l'aide du logiciel STATISTICA (Version 6.0, Statsoft, USA). Les moyennes sont considérées comme significativement différentes lorsque $P < 0,05$. *PS vs CAS, *RH-PS vs RH-CAS, #RH-PS vs PS, #RH-CAS vs CAS.

Résultats

Glucose sérique, insulínémie, HbA1c et HOMA-IR

Le régime hyperlipidique associé à la CAS comparé au régime normolipidique induit une augmentation de 37% de l'indice HOMA-IR. Par ailleurs, le régime hyperlipidique associé aux protéines de sardine comparé au régime contenant 5% de lipides entraîne une

augmentation du glucose sérique (+87%) et de l'insulínémie (+106%), ainsi que de l'indice HOMA-IR (+132%).

Tableau II. Glucose sérique, insulínémie, HOMA-IR et HbA1c

Composition	CAS	PS	RH-CAS	RH-PS
Glucose sérique (mmol/L)	21,35 $\pm$ 2,83	7,75 $\pm$ 0,41*	23,15 $\pm$ 1,71	14,49 $\pm$ 2,07#
Insuline (ng/ml)	1,69 $\pm$ 0,13	0,82 $\pm$ 0,25*	1,92 $\pm$ 0,14	1,69 $\pm$ 0,13#
HOMA-IR	36,88 $\pm$ 1,94	10,73 $\pm$ 2,54*	50,54 $\pm$ 4,14#	24,90 $\pm$ 1,50#
HbA1c (%)	12,41 $\pm$ 1,73	7,36 $\pm$ 0,36*	11,70 $\pm$ 1,51	8,32 $\pm$ 0,84*

Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ ES de 6 rats par groupe. La comparaison des moyennes est réalisée par le test LSD (Least significant difference test)* PS vs CAS, RH-PS vs RH-CAS, # RH-CAS vs CAS, # RH-PS vs PS.

Les protéines de sardine montrent une diminution significative du glucose sérique, du taux d'HbA_{1c} et de l'indice HOMA-IR, quelle que soit la teneur en lipides dans le régime (5% ou 30%). De plus, la concentration sérique en insuline diminue de 51% chez le groupe PS vs CAS (Tableau II).

Teneurs sériques et hépatiques en cholestérol total (CT) et triglycérides (TG)

Les concentrations sériques et hépatiques en CT et en TG sont augmentées significativement chez les rats consommant le régime hyperlipidique, comparé à ceux soumis au régime normolipidique. A l'inverse, une diminution significative des teneurs en CT et TG est observée chez le groupe PS vs CAS associé à 5% ou 30% de lipides dans le régime (Tableau III).

Tableau III. Concentrations sériques et hépatiques en CT et TG

	CAS	PS	RH-CAS	RH-PS
Sérum				
TC (mmol.L ⁻¹)	3,18 $\pm$ 0,37	1,90 $\pm$ 0,12*	4,71 $\pm$ 0,73#	2,51 $\pm$ 0,44*#
TG (mmol.L ⁻¹)	1,75 $\pm$ 0,22	1,06 $\pm$ 0,20*	3,51 $\pm$ 0,43#	1,97 $\pm$ 0,58*#
Foie				
TC (μ mol.g ⁻¹)	17,00 $\pm$ 1,05	12,28 $\pm$ 1,25*	29,92 $\pm$ 1,21#	16,01 $\pm$ 1,15*#
TG (μ mol.g ⁻¹)	24,15 $\pm$ 1,55	16,50 $\pm$ 3,70*	35,65 $\pm$ 2,33#	19,89 $\pm$ 1,30*#

Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ ES de 6 rats par groupe. La comparaison des moyennes est réalisée par le test LSD (Least significant difference test)* PS vs CAS, RH-PS vs RH-CAS, # RH-CAS vs CAS, # RH-PS vs PS.

Teneurs tissulaires en TBARS

Le RH vs le régime normolipidique, quelle que soit la protéine associée, entraîne une augmentation significative des concentrations en TBARS au

niveau du cœur et des reins. De plus, ces teneurs sont 1,4-fois plus élevées au niveau du foie chez le groupe RH-CAS.

Les PS, combinées à 5 ou 30 % de lipides, diminuent significativement ces concentrations au niveau du foie (-41% et -59%, respectivement), du cœur (-37% et -33%, respectivement) des reins (-54% et -38%, respectivement) (Fig. 1).

Teneurs tissulaires en carbonyles

Les teneurs en carbonyles sont augmentées significativement de 22%, 102% et 67% au niveau du foie, du cœur et des reins, respectivement, chez le groupe RH-CAS comparé au groupe CAS. Les protéines de sardine comparées à la caséine entraînent une diminution significative des teneurs en carbonyles au niveau de tous les organes, quelle que soit la teneur en lipides dans le régime (5 ou 30% de lipides) (Fig. 2).

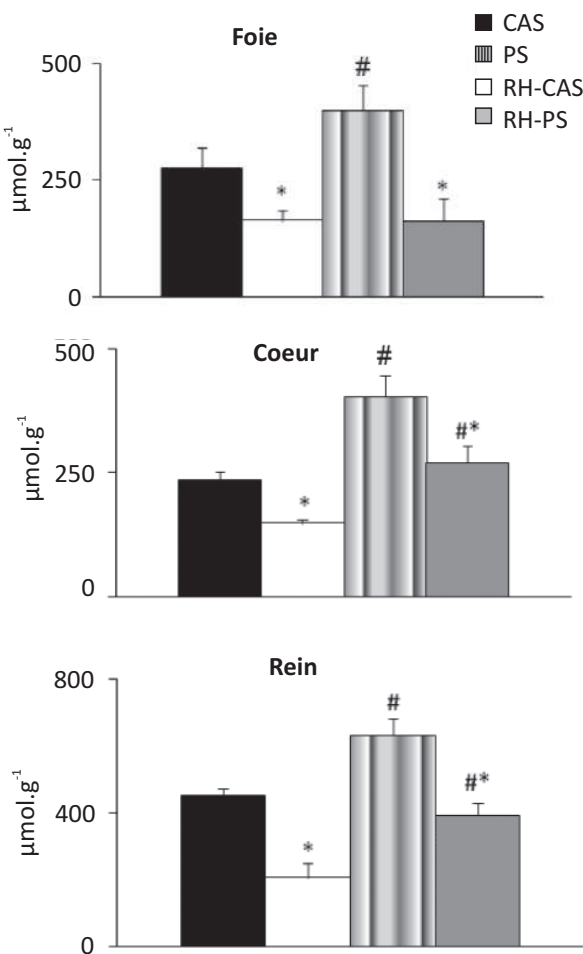


Fig. 1. Teneurs tissulaires en substances réactives à l'acide thiobarbiturique
Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ ES de 6 rats par groupe. La comparaison des moyennes est réalisée par le test LSD (Least significant difference test)* PS vs CAS, RH-PS vs RH-CAS, # RH-CAS vs CAS, # RH-PS vs PS.

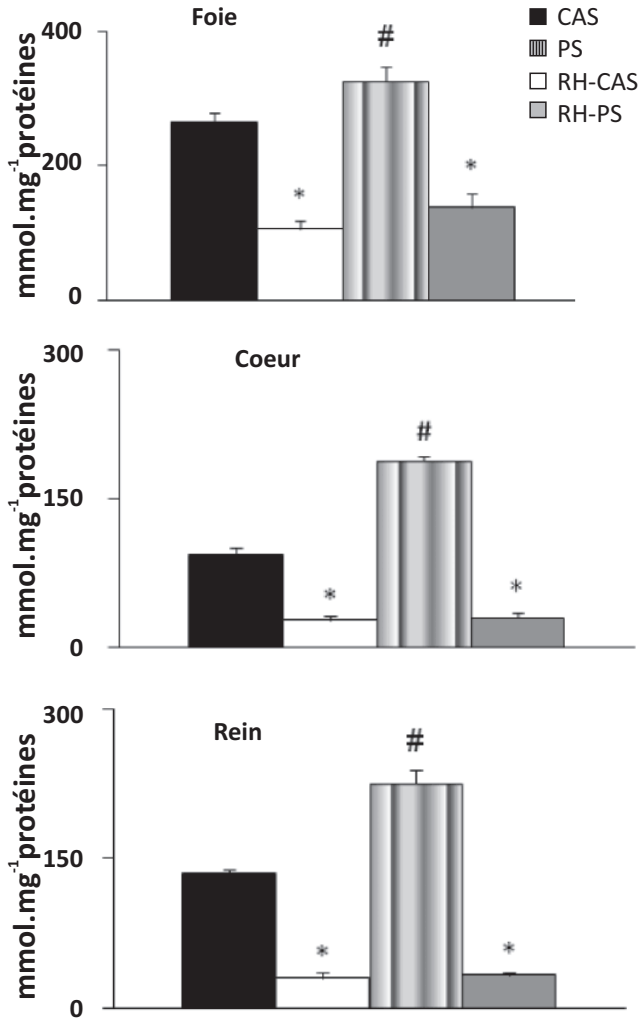


Fig. 2. Teneurs tissulaires en carbonyles
Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ ES de 6 rats par groupe. La comparaison des moyennes est réalisée par le test LSD (Least significant difference test)* PS vs CAS, RH-PS vs RH-CAS, # RH-CAS vs CAS, # RH-PS vs PS.

Activité des enzymes antioxydantes au niveau du foie, du cœur et des reins

L'activité de la SOD est diminuée significativement au niveau du foie (-47%), du cœur (-27%) et des reins (-32%), chez RH-CAS vs CAS. Par ailleurs, chez le groupe RH-PS vs PS, l'activité de la SOD est réduite de 56% au niveau des reins. Inversement, cette activité est augmentée significativement au niveau du foie (+58%), du cœur (+93%) et des reins (+63%), chez le groupe PS vs CAS. D'autre part, chez RH-PS vs RH-CAS, l'activité de la SOD augmente au niveau du foie (+194%) et du cœur (+28%) (Fig.3). Une diminution significative de l'activité de la GPx est observée au niveau du foie (-65%) et des reins (-25%), chez RH-CAS vs CAS. De même, cette activité est diminuée au niveau du rein (-20%), chez le

groupe RH-PS vs PS. Une augmentation significative de la GPx est notée au niveau du foie (+79%), du cœur (+51%) et des reins (+50%), chez le groupe PS vs CAS, et chez le groupe RH-PS vs RH-CAS, foie (+424%), cœur (+73%) et reins (+81%) (Fig. 3).

L'activité de la GSSH-Red diminue au niveau du foie (-39%), du cœur (-29%) et des reins (-39%), chez le groupe RH-CAS vs CAS. En revanche, cette activité augmente chez le groupe consommant les PS, quelle que soit la quantité de lipides dans les régimes, au niveau du foie et des reins (Fig. 3).

L'activité de la catalase est diminuée significativement au niveau du foie (-33%) et du cœur (-51%), chez le groupe RH-CAS vs CAS, alors que celle des reins ne montre aucune différence significative. En revanche, l'activité de la catalase est augmentée significativement au niveau du foie (+41%), du cœur (+98%) et des reins (+74%), chez le groupe PS vs CAS. Par ailleurs, chez le groupe RH-PS vs RH-CAS, l'activité de la catalase est augmentée au niveau du foie (+99%), du cœur (+184%) et des reins (+48%) (Fig. 3).

Discussion

Le but de ce travail est d'évaluer si les protéines de sardine peuvent améliorer les marqueurs de l'hyperglycémie et le stress oxydatif chez des rats présentant un diabète de type 2. Dans cette étude, le DT2 est induit par l'ingestion d'un régime hyperlipidique, pendant 5 semaines, suivi de l'injection d'une faible dose de STZ. La pathogenèse du DT2 est caractérisée par l'insulino-résistance et la dysfonction des cellules β pancréatiques [18].

Les résultats montrent que les protéines de sardine ont un effet hypoglycémiant, indiquant ainsi leur rôle bénéfique sur l'hyperglycémie. Ces résultats concordent avec ceux de Hurley *et al.*, (1995) [19] et Lavigne *et al.*, (2000) [3] qui rapportent que la consommation des protéines de poisson, en l'occurrence la protéine de morue, améliore la sensibilité du muscle à l'insuline et augmente l'absorption du glucose, chez des rats normoglycémiques. Ce phénomène a été également observé chez des rats obèses [4] et chez l'homme [2]. En effet, dans ce travail, l'effet hypoglycémiant noté serait probablement directe-

ment lié à la composition en acide aminés des protéines. Joydeep *et al.*, (2012) [20] ont rapporté une diminution de la glycémie avec l'administration de taurine, chez des rats rendus diabétiques par l'alloxane. En effet, la protéine de sardine est riche en taurine [21], ce qui permet d'expliquer l'effet hypoglycémiant de ces protéines. De plus, l'apport en arginine pourrait également favoriser une meilleure régulation glycémique [22], par l'intermédiaire de l'oxyde nitrique (NO) qui influence la captation du glucose. D'autre part, la composition des protéines de sardine en méthionine, en cystéine et en glycine [23] peut être responsable de cet effet. Sutochama *et al.*, (2002) [24] ont rapporté que l'administration de l'alanine, la glycine, l'acide aspartique et l'acide glutamique diminuent la glycémie, chez des patients diabétiques de type 2.

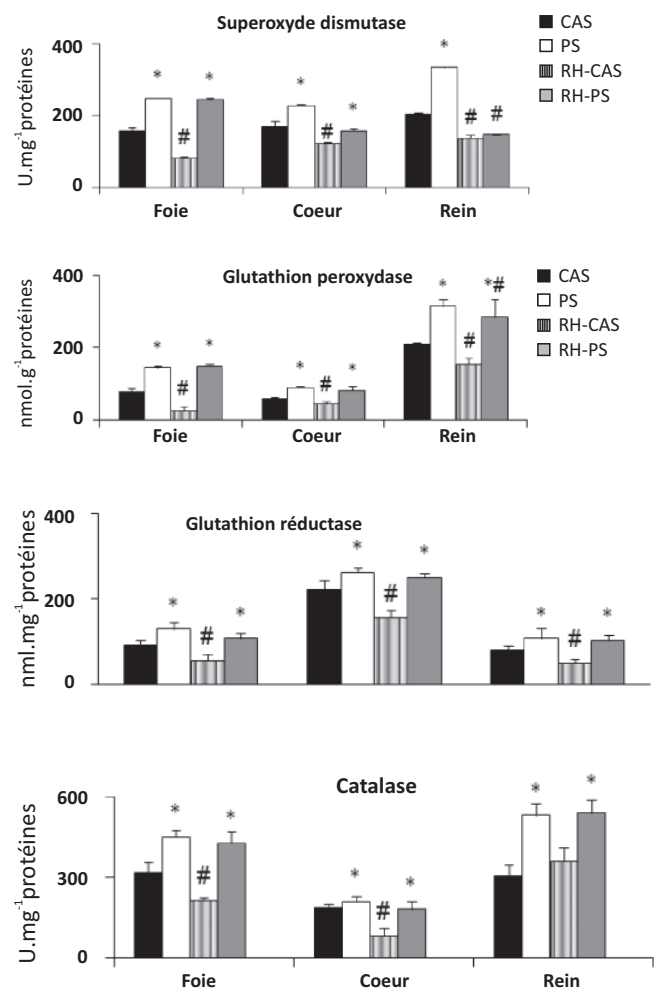


Fig. 3. Activité des enzymes antioxydantes tissulaires
Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ ES de 6 rats par groupe. Après ANOVA, la comparaison des moyennes est réalisée par le test LSD (Least significant difference test) * PS vs CAS, RH-PS vs RH-CAS, # RH-CAS vs CAS, # RH-PS vs PS.

Par ailleurs, les protéines de sardine entraînent une réduction de l'insulinémie et une amélioration de l'insulino-résistance, par augmentation de l'indice HOMA-IR. Ces résultats sont en accord avec ceux de Lavigne *et al.*, (2000) [3] et Tremblay *et al.*, (2003) [4]. L'effet protecteur des protéines de sardine pourrait probablement être lié à l'augmentation de la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques, essentiellement le muscle [4], et par la diminution de la sécrétion de l'insuline pancréatique ou par l'augmentation de l'extraction hépatique de l'insuline [3]. De plus, nos résultats indiquent une diminution de l'HbA1c, chez les rats consommant les protéines de sardine, quelle que soit la teneur en lipides (5 ou 30% de lipides). Ces résultats sont en accord avec nos travaux antérieurs [5] montrant une diminution de l'HbA1c, chez des rats rendus diabétiques par la streptozotocine.

Le diabète s'accompagne également d'une dyslipidémie, caractérisée par une hypercholestérolémie et une hypertriglycéridémie. Nos résultats révèlent que la consommation d'un régime hyperlipidique entraîne une augmentation des teneurs en cholestérol et en triglycérides sériques et hépatiques. Des résultats similaires sont observés par Choi *et al.*, (2007) [25] et Jang *et al.*, (2008) [26]. À l'inverse, les PS entraînent une hypocholestérolémie qui pourrait être liée à la diminution de la synthèse endogène de cholestérol et l'inhibition de son absorption au niveau intestinale [27]. De plus, comparée à la caséine, la composition des protéines de sardine en taurine, en méthionine, en cystéine et en glycine [21] est faible, et la diminution du rapport lysine/arginine [23] laisse suggérer l'effet hypocholestérolémiant des protéines de sardine. Par ailleurs, les PS induisent une hypotriglycéridémie, résultant probablement d'une diminution de la synthèse hépatique des TG. En effet, le faible taux de synthèse des TG est positivement corrélé avec leur taux de circulation. Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres auteurs [28,29].

Le stress oxydatif induit par le diabète est associé à une réduction du statut antioxydant, d'où une augmentation des effets délétères dus aux radicaux libres [30]. En effet, les systèmes de défense antioxydante enzymatiques, tels que la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase et non enzymatiques (glutathion,

vitamines C et E) sont altérés au cours du diabète [6].

Une augmentation des concentrations en TBARS et carbonyles est notée au niveau du foie, du cœur et des reins, chez les rats soumis à un régime hyperlipidique. Cependant, les protéines de sardine entraînent une diminution de la concentration en TBARS, qui sont les marqueurs de la peroxydation lipidique les plus utilisés. Une diminution des concentrations tissulaires en carbonyles est aussi notée. Ces résultats sont probablement dus à une inhibition de la génération des radicaux libres oxygénés, secondaire à la réduction de la glycémie et de la glycation de l'hémoglobine avec les protéines de sardine.

Une augmentation de l'activité de la SOD, la GPx, la GSSH-Red et la CAT est notée au niveau du foie, du cœur et des reins, chez les rats consommant les protéines de sardine, quel que soit le contenu en lipides (5 ou 30%). Ces résultats concordent avec ceux de nos travaux précédents [9] rapportés chez le rat hypertendu rendu diabétique par la STZ.

Conclusion

Chez le rat diabétique, le régime hyperlipidique induit une hyperglycémie associée à une augmentation de l'indice HOMA-IR et de l'HbA1c. De plus, une augmentation des marqueurs du stress oxydatif et une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes sont notées. Cependant, les protéines de sardine diminuent l'hyperglycémie, l'insulinémie, l'indice HOMA-IR et le taux d'HbA1c, rendant compte d'une amélioration de l'homéostasie glucidique. De même, les protéines de sardine atténuent le stress oxydatif en stimulant l'activité des enzymes antioxydantes.

Ainsi, les protéines de sardine pourraient ouvrir de nouvelles perspectives de recherche de substances protectrices contre les dommages métaboliques et oxydatifs induits par le diabète.

Remerciements

Cette étude a été financée par la Direction Générale de la Recherche Scientifique et du Développement Technologique (DGRS-DT) du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (MESRS).

Conflit d'intérêts

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêt par rapport à cette étude.

Références

1. Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27:1047-53.
2. Ouellet V., Marois J., Weisnagel S.J., Jacques H. Dietary cod protein improves insulin sensitivity in insulin-resistant men and women: a randomized controlled trial. *Diabetes Care* 2007;30:2816-21.
3. Lavigne C., Marette A., Jacques H. Cod and soy proteins compared with casein improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278:491-500.
4. Tremblay F., Lavigne C., Jacques H., Marette A. Dietary cod protein restores insulin-induced activation of phosphatidyl inositol 3-kinase/Akt and GLUT4 translocation to the T-tubules in skeletal muscle of high-fat-fed obese rats. *Diabetes* 2003;52:29-37.
5. Mellouk Z., Ait Yahia D., Boukortt F.O., Benai-cha N., Madani Z., Bouchenak M. Dietary sardine (*Sardina pilchardus*) protein attenuates hyperglycemia and hyperlipidemia and ameliorates tissue morphology changes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metab Funct Res Diab* 2009;2:45-54.
6. Maritim AC., Sanders RA., Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Molec Toxicol* 2003;17:24-38.
7. Bonnefont-Rousselot D., Beaudeux J.L., Théron P., Peynet J., Legrand A., Delattre J. Diabète sucré, stress oxydant et produits de glycation avancée. *Ann Pharm Fr* 2004; 62:147-57.
8. Rains J.L., Jain S.K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med* 2011;50:567-75.
9. Boukortt F.O., Girard A., Prost J., Ait Yahia D., Bouchenak M., Belleville J. Fish protein improves the total antioxidant status of streptozotocin-induced diabetes in spontaneously hypertensive rats. *Med Sci Monit* 2004;10:397-404.
10. Undeland I., Kelleher S.D., Hultin H.O. Recovery of functional proteins from herring (*Clupea harengus*) light muscle by an acid or alkaline solubilization process. *J Agric Food Chem* 2002;50:7371-9.
11. Council of European Communities. Council instructions about the protection of living animals used in scientific investigations. *Off J Eur Communities (JO86/609/CEE)* 1986; L358:1-28.
12. Matthews D.R., Hosker J.P., Rudenski A.S., Naylor B.A., Treacher D.F., Turner R.C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9.
13. Delsal J. Nouveau procédé Down regulation d'extraction des lipides du sérum par le méthylal. Application aux microdosages du cholestérol, des phosphoaminolipides et des protéines. *Bull Soc Chim* 1944; 26: 99-105.
14. Salih A.M., Smith D.M., Price J.F., Dawson L.E. Modified extraction 2-thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation. *Poult Sci* 1987; 66:1483-8.
15. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Clement I., Lenz A.G. *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186:464-78.
16. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
17. Aebi H. Methods of Enzymatic Analysis. Seconded. Verlagchemie, Weinheim, Germany, 1974;673-84.
18. Kahn S.E., Hull R.L., Utzschneider K.M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006;444:840-6.
19. Hurley C., Galibois I., Jacques H. Fasting and postprandial lipid and glucose metabolisms are modulated by dietary proteins and carbohydrates : Role of plasma insulin concentrations. *J Nutr Biochem* 1995;6:540-6.
20. Joydeep D., Vandana V., Parames C., Sil P.C.

- Taurine exerts hypoglycemic effect in alloxan-induced diabetic rats, improves insulin-mediated glucose transport signaling pathway in heart and ameliorates cardiac oxidative stress and apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012;258:296-8.
21. Shirai N., Terayama M., Takeda H. Effect of season on the fatty acid composition and free amino acid content of the sardine "*Sardinops melanostictus*". *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol* 2002;131:387-93.
22. Flynn NE., Meininger CJ., Haynes TE. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomed Pharmacother* 2002;56:427-38.
23. Spielmann J., Noatsch A., Brandsh C., Stangl GL., Eder K. Effect of various dietary arginine and lysine concentrations on plasma and liver cholesterol concentrations in rats. *Ann Nutr Metab* 2008;53:223-33.
24. Sutochama KN., Lakshmi S., Punitham R., Arokiasamy T., Sukuman B., Ramakishman S. Effect of oral supplementation of free amino acids in type 2 diabetic patients. A Pilot clinical trial. *MedSci Monit* 2002;8:131-7.
25. Choi I., Seog H., Park Y., Kim Y., Choi H. Suppressive effects of germinated buckwheat on development of fatty liver in mice fed with high-fat diet. *Phytomed* 2007;14:563-7.
26. Jang A., Srinivasan P., Lee NY., Song HP., Lee JW., Lee M. Comparison of hypolipidemic activity of synthetic gallic acid-linoleic acid ester with mixture of gallic acid and linoleic acid on high-fat diet induced obesity in C57BL/6 Cr Slc mice. *Chem Biol Interact* 2008;174:109-117.
27. Hosomi R., Fukunaga K., Arai H., Kanda S., Nishiyama T., Yoshida M. Fish protein decreases serum cholesterol in rats by inhibition of cholesterol and bile acid absorption. *J Food Sci* 2011;76;4:116-21.
28. Boukourt FO., Girard A., Prost J., Belleville J., Bouchenak M. Les protéines de poisson modulent le métabolisme des triglycérides ainsi que les activités de la triglycéride lipase hépatique et des lipoprotéines lipases tissulaires, chez le rat spontanément hypertendu (SHR) et le SHR diabétique. *Arch Mal Cœur*; 2006;99:727-31.
29. Demonty I., Deshaies Y., Lamarche B., Jacques H. Cod protein lowers the hepatic triglyceride secretion rate in the rat. *J Nutr*; 2003; 133: 1398-402.
30. Kumar G., Banu GS., Murugesan AG. Effect of Helicteresisora bark extracts on heart antioxidant status and lipid peroxidation in streptozotocin diabetic rats. *J App Biomed* 2008;6:89-95.