

# Effet protecteur de *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) et de *Sclerocarya birrea* [(A. Rich.) Hochst.] (Asclepiadaceae) sur les cellules $\beta$ pancréatiques INS-1.

E. N. H. YOUL<sup>1,2</sup>, Mo. OUEDRAOGO<sup>1</sup>, Mu. OUEDRAOGO<sup>1</sup>, C. GNOULA<sup>1</sup>,  
I. P. GUISSOU<sup>1</sup>, R. MAGOUS<sup>2</sup>, G. CROS<sup>2</sup>, C. OIRY<sup>2</sup>

## Résumé

*Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) et *Sclerocarya birrea* [(A. Rich.) Hochst.] (Asclepiadaceae) sont deux plantes utilisées en médecine traditionnelle au Burkina Faso dans le traitement du diabète. L'objectif de notre travail a été d'étudier les effets protecteurs des extraits hydro-éthanoliques (80 %) de fruits de *Moringa oleifera* (MO) et d'écorces de tronc de *Sclerocarya birrea* (SB), sur la viabilité et la fonctionnalité de la cellule bêta pancréatique, lors d'un stress oxydant induit par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La viabilité a été évaluée par la technique du [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide] (MTT) et la fonctionnalité par la mesure de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (8,3 mM). Nous avons montré que MO et SB à 10  $\mu$ g/mL et au bout de deux heures prévenaient partiellement l'altération de la viabilité induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'altération de la fonctionnalité était prévenue totalement par 10  $\mu$ g/mL de MO au bout d'une heure et 1  $\mu$ g/mL de SB au bout de deux heures. Ces résultats indiquent le potentiel de ces deux plantes dans la prévention du dysfonctionnement  $\beta$  cellulaire.

**Mots-clés :** *Moringa oleifera*, *Sclerocarya birrea*, cellules bêta pancréatiques, stress oxydant, diabète.

## Protective effect of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) and *Sclerocarya birrea* [(A. Rich.) Hochst.] (Asclepiadaceae) on INS-1 pancreatic $\beta$ -cells.

### Abstract

*Moringa oleifera* (Moringaceae) and *Sclerocarya birrea* (Asclepiadaceae) are two plants used in traditional medicine in Burkina Faso in the treatment of diabetes. The aim of our study was to investigate the protective effects of ethanol (80 %) extract of *Moringa oleifera* (MO) fruits and stem barks of *Sclerocarya birrea* (SB) on the viability and functionality of the pancreatic  $\beta$ -cells, during oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Viability was evaluated by the [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (MTT) colorimetric assay and functionality by the measurement of insulin secretion induced by glucose (8.3 mM). We showed that MO and SB (10  $\mu$ g/mL) after two hours partially prevented the alteration of viability induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50  $\mu$ M). The alteration of the functionality is completely prevented by 10  $\mu$ g/mL of MO after one hour, and 1  $\mu$ g/mL of SB after two hours. *Moringa oleifera* and *Sclerocarya birrea* protected  $\beta$  cell viability and functionality against oxidative stress induced exogenously. These results indicate the potential of these two plants in preventing  $\beta$ -cells dysfunction.

**Keywords:** *Moringa oleifera*, *Sclerocarya birrea*, pancreatic  $\beta$ -cells, oxidative stress, diabetes.

<sup>1</sup> Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie. UFR/SDS Université de Ouagadougou. 03 BP 7021 Ouagadougou 03 Burkina Faso.

<sup>2</sup> Laboratoire de Pharmacologie et Physiopathologie Expérimentales, Faculté de Pharmacie- 15 Avenue Charles Flahault BP 14 491 - 34093, Montpellier Cedex 5 France.

## Introduction

Dans le monde, environ 382 millions de personnes sont atteintes de diabète dont 20 millions en Afrique sub-saharienne. Dans les 20 prochaines années, le nombre de personnes atteintes de diabète dans cette région où la population a difficilement accès aux médicaments va presque doubler (5). Au Burkina Faso, la prévalence de cette pathologie est de 2,95 % avec des dépenses mensuelles de santé relatives par malade d'environ 33 268 F CFA (5). Les malades, outre l'aspect culturel ont alors recours à la médecine traditionnelle pour se soigner. Le stress oxydant joue un rôle prépondérant dans l'apparition du diabète de type 2. La cellule bêta pancréatique est particulièrement sensible au stress oxydant car elle n'exprime que faiblement les enzymes de détoxification. Ainsi, l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) pourrait constituer un facteur inducteur d'altérations précoces dans cette cellule. Par conséquent, le traitement par des plantes anti-oxydantes déjà utilisées en médecine traditionnelle par la population, pourrait protéger la cellule bêta des agressions oxydantes et constituerait ainsi une approche pharmacologique accessible dans la prévention du diabète de type 2. *Moringa oleifera* (Moringaceae) et *Sclerocarya birrea* (Asclepiadaceae) sont deux plantes fréquemment utilisées au Sénégal et au Burkina Faso dans le traitement du diabète de type 2 (3, 14) et reconnues comme possédant des propriétés anti-oxydantes (9,17). L'objectif de notre travail a été d'étudier les effets protecteurs de l'extrait de ces deux plantes de familles différentes *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) et de *Sclerocarya birrea* [(A. Rich.) Hochst.] (Asclepiadaceae), sur la viabilité et la fonction de sécrétion de la cellule bêta pancréatique, lors d'un stress oxydant induit de façon exogène.

## Méthodologie

### Substances chimiques

Le milieu de culture Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640, le sérum de veau foetal et le Phosphate Buffured Saline (PBS) provenaient de chez Lonza (Levallois Perret, France). Les autres réactifs ont été obtenus chez Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La détermination des concentrations d'insuline dans le surnageant cellulaire a été effectuée par un kit de test d'insuline Homogeneous Time Resolved Fluorescence (HTRF) provenant de chez Cis Bio International, Bagnols-sur-Cèze, France.

### Matériel végétal et préparation des extraits

Les fruits de *Moringa oleifera* et les écorces de tronc de *Sclerocarya birrea* ont été récoltés à Ouagadougou (Burkina Faso) au mois de Janvier 2010 et ont été authentifiés par le Laboratoire de botanique de l'Université de Ouagadougou. Les organes collectés ont été séchés puis réduits en fine poudre. La poudre de *Moringa oleifera* et de *Sclerocarya birrea* ont été extraits avec un mélange éthanol/eau (80/20) sous agitation pendant 48 heures à température ambiante. Les extraits obtenus ont été filtrés sur du papier whatman N°1, puis le solvant a été évaporé à 50° C sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi R-205, Flawil, Switzerland). L'extrait concentré a par la suite été séché à l'étuve à 55° C avant d'être utilisé pour l'étude.

## Culture cellulaire

Les cellules INS-1 sont une lignée cellulaire  $\beta$  insulino-sécrétrice provenant de tumeurs endocrinienne d'insulinome de rat, ayant une capacité de prolifération (2). Les cellules INS-1 insulino-sécrétrices ont été cultivées en atmosphère humide (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) dans du RPMI- 1640 supplémenté par 10% de sérum de veau foetal, 100 U/ml pénicilline, 100 mg/mL streptomycine, 2 mM L-glutamine, 10 mM d'Hepes, 1 mM de sodium pyruvate, 50 mM de 2-mercaptoethanol selon la méthode de ASFARI *et al.* (2). Les cellules ont été incubées dans des plaques de 24 puits (4.10<sup>5</sup> cellules par puits) pour la sécrétion d'insuline et des plaques de 96 puits (1.10<sup>5</sup> cellules par puits) pour les tests de viabilité. Après cinq jours de culture, les cellules ont été utilisées pour les différentes expériences.

## Test de sécrétion d'insuline

La sécrétion d'insuline par les cellules en culture a été induite par 8,3 mM glucose. Les cellules ont été prétraitées avec les extraits de MO, SB (1 et 10 µg/mL) ou le véhicule (contrôle) pendant une et deux heures. Elles ont ensuite été rincées puis incubées en présence d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 50 µM pendant une heure. A l'issue de ce temps, les surnageants de culture ont été collectés et gardés à -20° C pour le dosage d'insuline par la méthode de transfert de fluorescence (Homogeneous Time Resolved Fluorescence ou HTRF) selon les instructions du fabricant.

La technique de dosage HTRF utilise deux anticorps anti-insulines : l'un marqué avec l'euporium cryptate et l'autre avec le XL665. Lorsque les deux anticorps tagués se lient à une molécule d'insuline il y a un rapprochement des deux fluorophores ou sondes. L'émission produite par l'excitation d'une première sonde permet un transfert d'énergie suffisante pour exciter la seconde dont l'émission est quantifiée (*Fluorescence Resonance Energy Transfert*, FRET). La fluorescence mesurée est proportionnelle à la concentration d'insuline dans le milieu. Les expériences ont été effectuées en double et répétées trois fois.

## Test de viabilité cellulaire

Les cellules INS-1 ont été traitées comme précédemment dans le test d'insulino-sécrétion. La viabilité cellulaire a été déterminée par le test MTT. A l'issue de la période d'incubation, les cellules ont été rincées par du Krebs-Ringer tamponné au bicarbonate contenant 5 % d'albumine bovine (KRB/BSA). Les cellules ont ensuite été incubées dans du KRB/BSA contenant 5 mg/mL de MTT pendant trois heures en atmosphère humide à 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été rincées avec du Phosphate Buffered Saline (PBS) et les précipités intracellulaires de formazan dissous avec 50 µL de dimethylsulfoxyde (DMSO). L'absorbance du formazan intracellulaire réduit produit a été lu à 492 nm sur un lecteur de microplaque (Tecan, Lyon, France). Les expériences ont été effectuées en sextuple et répétées cinq fois.

## Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (n le nombre d'expériences varie 3-5). La comparaison statistique a été réalisée à l'aide du test t de Student avec un seuil de signification de 5 % (p < 0,05) au moyen du logiciel Graph Pad® version 6.

## Résultats

### Effets des extraits hydroéthanoliques de *Moringa oleifera* et de *Sclerocarya birrea* sur la viabilité des cellules INS-1 en présence d'un stress oxydant.

Le peroxyde d'hydrogène à 50  $\mu\text{M}$  a réduit de 50 % la viabilité cellulaire (figure 1A et 1B). Le prétraitement des cellules par MO et SB à 1 et 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pendant une heure ne prévient pas la mortalité cellulaire. Cependant un prétraitement de deux heures avec MO (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (figure 1A) et SB (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (figure 1B) préviennent partiellement la mortalité cellulaire induite par le stress oxydatif au peroxyde d'hydrogène. L'effet des deux plantes aux concentrations et temps testés sur la viabilité cellulaire en présence d'un stress oxydant ne sont pas significativement différents.

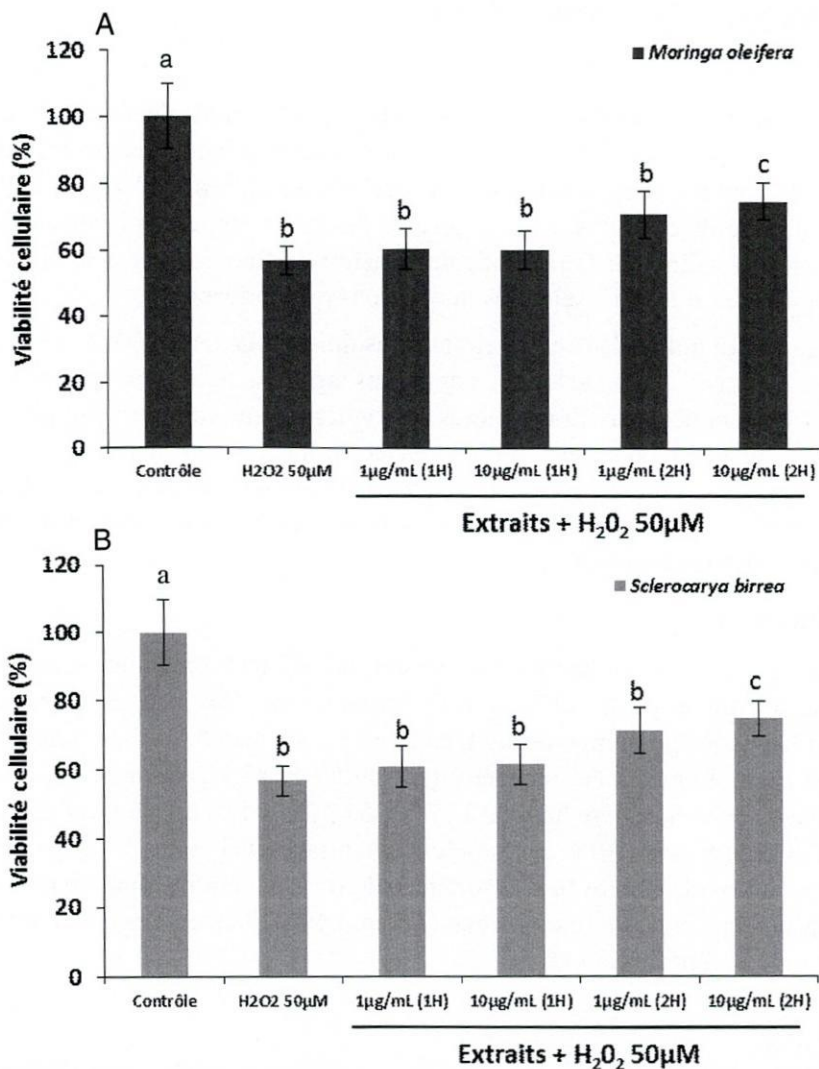
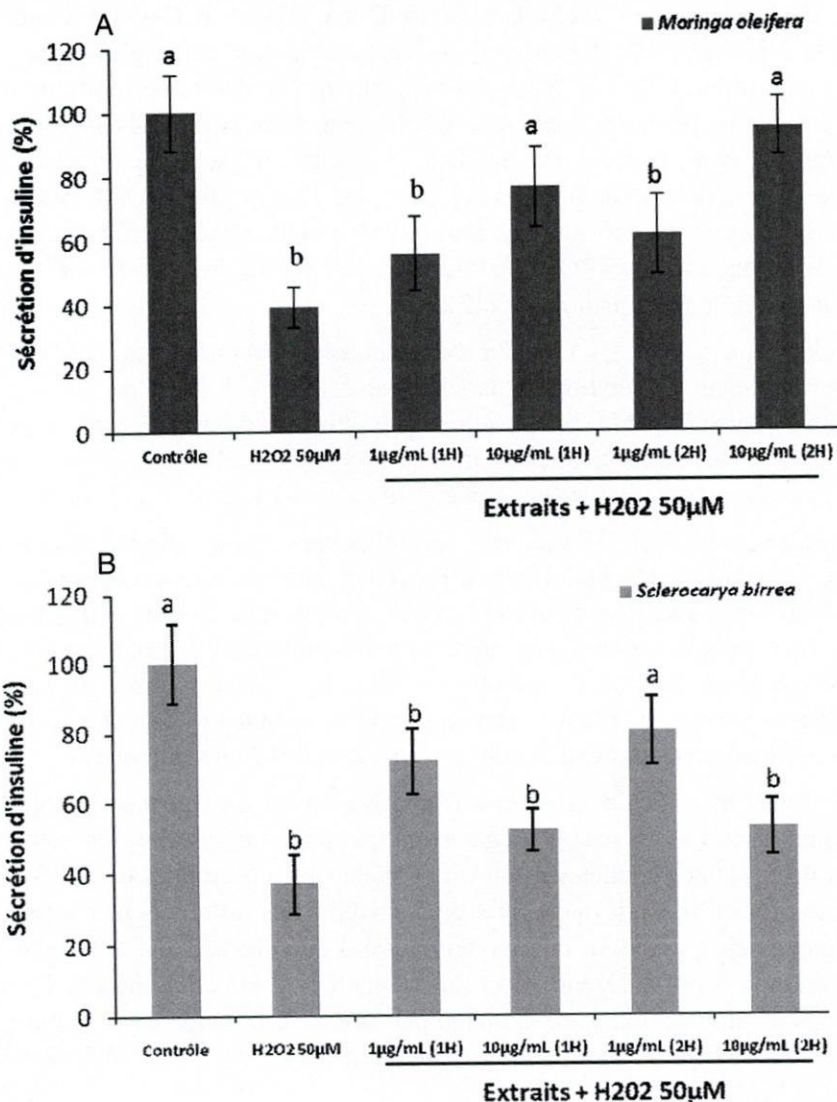


Figure 1. Effets des extraits hydroéthanoliques de *Moringa oleifera* et de *Sclerocarya birrea* sur la viabilité des cellules INS-1 en présence d'un stress oxydant. Les INS-1 ont été prétraitées avec l'extrait de *Moringa oleifera* (A) ou de *Sclerocarya birrea* (B) aux concentrations et temps indiqués. Elles ont été soumises ou non (Contrôle) pendant 60 minutes à l'action du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Les résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (n = 5 expériences réalisées en sextuple). La comparaison a ou c versus b est significative P < 0,05.

## Effets des extraits hydroéthanoliques de *Moringa oleifera* et de *Sclerocarya birrea* sur la fonction sécrétrice des cellules INS-1 en présence d'un stress oxydant

Les cellules INS-1 en culture sécrètent de l'insuline lorsqu'elles sont stimulées par du glucose 8,3 mM. En présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 µM) la sécrétion d'insuline a été réduite de 60 % (figure 2 A et 2 B). Le prétraitement des cellules avec MO (10µg/mL) pendant une heure (figure 2 A) et SB (1µg/mL) pendant deux heures (figure 2B) préviennent l'altération de l'insulino-sécrétion par le stress oxydatif (a versus b et b versus c, p< 0,05). Le début d'action et la concentration active des deux plantes sont significativement différentes sur la fonction sécrétoire de la cellule bêta.



**Figure 2.** Effets des extraits hydroéthanoliques de *Moringa oleifera* et de *Sclerocarya birrea* sur la fonction sécrétrice des cellules INS-1 en présence d'un stress oxydant. Les cellules INS-1 ont été prétraitées avec les extraits de *Moringa oleifera* (A) ou de *Sclerocarya birrea* (B) aux concentrations et temps indiqués. Elles ont été stimulées avec glucose (8,3 mmol.L<sup>-1</sup>) ou en absence (Contrôle, Co) de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Les résultats sont exprimés en moyenne ± sem (n =3 expériences réalisées en double) la comparaison a versus b est significative, P < 0,05.

## Discussion

*Moringa oleifera* et *Sclerocarya birrea* sont deux plantes avec des métabolites secondaires connues pour leurs propriétés antioxydantes (1,12) et insulino-sécrétrices (4,10). La relation entre les propriétés anti-oxydantes et insulino-sécrétoires de ces plantes n'a pas encore fait l'objet d'investigation à notre connaissance. Nous avons alors étudié les effets d'extraits hydro-éthanoliques de fruits de MO et d'écorce de tronc de SB sur les dommages cellulaires induits par le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) sur des cellules bêta pancréatiques INS-1. En effet le stress oxydatif induit par le  $H_2O_2$  sur des cellules en cultures est communément utilisé pour étudier les altérations induites par les ERO (6,15). Dans notre étude, 50  $\mu M$  de  $H_2O_2$  diminuait d'environ 50 % la viabilité cellulaire et 60 % la sécrétion d'insuline induite par le glucose 8,3 mM sur les cellules bêta pancréatiques INS-1. Nos résultats, obtenus à des concentrations relativement faibles et physiologiques de  $H_2O_2$  sont en concordance avec ceux reportés antérieurement (18). Dans le diabète de type 2, le stress oxydant constitue un facteur pathogène majeur des phénomènes de glucotoxicité et de lipotoxicité. En effet, il est impliqué à la fois dans la perte de sensibilité des tissus cibles de l'insuline et dans l'évolution du déficit insulino-sécrétoire. Ainsi, l'inhibition de la production des ERO et/ou l'accélération de leur destruction pourraient être utilisés dans le traitement de cette pathologie (13).

Nous avons montré que MO et SB à la même concentration (10  $\mu g/mL$ ) au bout de deux heures prévenaient partiellement l'altération de la viabilité cellulaire induite par 50  $\mu M$  de  $H_2O_2$ . La mortalité cellulaire induite par le  $H_2O_2$  est liée à une activation de caspases pro-apoptotiques (11). Les métabolites secondaires des plantes pourraient protéger la cellule par blocage immédiat de l'action de ces caspases ou à long terme inhiber leur expression dans la cellule (8).

Nous avons ensuite étudié l'effet des extraits sur l'altération de l'insulino-sécrétion au cours du stress oxydatif. L'extrait de *Moringa oleifera* prévenait cette altération lorsque les cellules ont été prétraitées une heure avec 10  $\mu g/mL$  de l'extrait. Un prétraitement de deux heures avec une concentration de 1  $\mu g/mL$  a permis de mettre en évidence l'effet protecteur de l'extrait de *Sclerocarya birrea* sur la fonction sécrétoire de la cellule INS-1 soumise au stress oxydatif. L'effet protecteur des extraits sur la fonction sécrétoire ne semble pas provenir de l'amélioration de la viabilité cellulaire mais par une action directe sur la fonction sécrétoire.

Ainsi, *Moringa oleifera* et *Sclerocarya birrea* non seulement protègent la viabilité des INS-1 contre le stress oxydant, mais conservent également leur potentiel insulino-sécréteur en présence de  $H_2O_2$ . Ces deux plantes contiennent donc des molécules ou groupes de molécules responsables de ces activités qu'il serait intéressant de connaître. Les différents mécanismes qui sous-tendent les effets de chaque extrait mériteraient aussi d'être élucidés car leur début d'action et leurs concentrations actives diffèrent sur la fonctionnalité de la cellule bêta. L'effet protecteur tardif de la fonctionnalité de *Sclerocarya birrea* par rapport à *Moringa oleifera* pourrait justifier son utilisation en deuxième position dans le traitement du diabète de type 2 au Sénégal et au Burkina Faso (3, 14).

Les extraits des deux plantes ont présenté des effets protecteurs de la cellule bêta pancréatique soumise au stress oxydatif. Ces effets pourront être bénéfiques dans le traitement du diabète tant par effet direct sur les ERO ou en modulant leurs effets délétères comme cela a été montré pour d'autres extraits de plantes (7, 16).

## Conclusion

Cette étude nous a permis de montrer que les extraits hydro-éthanoliques de fruits de *Moringa oleifera* Lam. et d'écorce de tronc de *Sclerocarya birrea* protégeaient la fonction sécrétoire et la viabilité des cellules bêta contre des dommages oxydatifs. Ces résultats apportent un fondement de l'utilisation en médecine traditionnelle au Burkina Faso de ces deux plantes dans le traitement du diabète de type 2. D'autres études devraient être menées en vue de cibler les composés chimiques mais aussi le mécanisme d'action sous-tendant ces effets.

De plus, le potentiel de ces deux plantes dans la prévention du dysfonctionnement des cellules  $\beta$  pancréatiques associé au diabète mérite d'être étudié en vue d'offrir aux populations une thérapeutique efficace et accessible.

## Références bibliographiques

1. ANWAR F., LATIF S., ASHRAF M., GILANI A.H. *Moringa oleifera*: A Food Plant with Multiple Medicinal Uses. *Phytotherapy Research* 2007 ; 21:17-25.
2. ASFARI M., JANJIC D., MEDA P., LI G., HALBAN P.A., WOLLHEIM C.B. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 1992 ; 130:167-178.
3. DIÈYE A.M., SARR A., DIOP S.N., NDIAYE M., SY G.Y., DIARRA M., RAJRAJU/GAFFARYA I., NDIAYE/SYA A., FAYE B. Medicinal plants and the treatment of diabetes in Senegal: survey with patients. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 2008 ; 22:211-216.
4. FRANCIS J.A., JAYAPRAKASAMA B., OLSON L.K., NAIR M.G. Insulin Secretagogues from *Moringa oleifera* with Cyclooxygenase Enzyme and Lipid Peroxidation Inhibitory Activities. *Helvetica Chimica Acta* 2004 ; 87:317-326.
5. International Diabetes Federation (IDF). IDF Diabetes Atlas 2013, sixth edition:160 p.
6. KIM M.K., JUNQ H.S., YOON C.S., KO J.H., CHUN H.J., KIM T.K., KWON M.J., LEE S.H., KOH K.S., RHEE B.D., PARK J.H. EGCG and quercetin protected INS-1 cells in oxidative stress via different mechanisms. *Frontiers in Bioscience* 2010 ; 2:810-817.
7. KIM Y.R., LEE J.S., LEE K.R., KIM Y.E., BAEK N.I., HONG E.K. Effects of mulberry ethanol extracts on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in pancreatic b-cell. *International Journal of Molecular Medicine* 2014 ; 33(1):128-134.
8. LEE J.H., LEE J.S., KIM Y.R., JUNG W.C., LEE K.E., LEE S.Y., HONG E.K. Hispidin isolated from *Phellinus linteus* protects against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in pancreatin MIN6N b-cells. *Journal of Medicinal Food* 2011 ; 14(11):1431-1438.
9. LUQMAN S., SRIVASTAVA S., KUMAR R., KUMARMAURYA A., CHANDA D. Experimental Assessment of *Moringa oleifera* Leaf and Fruit for Its Antistress, Antioxidant, and Scavenging Potential Using In Vitro and In Vivo Assays. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012 ; 519084:12 p.
10. MAKOMNDIFOSSAP I.G., FRIGERIO F., CASIMIR M., NQUEQUIMTSOFACK F., DONGO E., KAMTCHOUIQ P., DIMO T., MAECHLER P. *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) stem-bark extract corrects glycaemia in diabetic rats and acts on beta-cells by enhancing glucose-stimulated insulin secretion. *Journal of Endocrinology* 2010 ; 205:79-86.
11. MISHRA N.C. and KUMAR S. apoptosis: a mitochondrial perspective on cell death. *Indian Journal of Experimental Biology* 2005 ; 43:25-34.
12. OJEWOLE J.A.O., MAWOZA T., CHIWORORO W.D.H., OWIRA P.M.O. *Sclerocarya birrea* (A. Rich) Hochst. [« Marula »] (Anacardiaceae) : A review of its Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology and its Ethnomedicinal uses. *Phytotherapy Research* 2010 ; 24:633-639.
13. ROLO A.P., PALMEIRA C.M. Diabetes and mitochondrial function : role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology Applied Pharmacology* 2006 ; 212:167-178.

- 14. SAWADOGO M.** Traitements traditionnels utilisés par les patients diabétiques de type 2 au Centre Hospitalier Universitaire – Yalgado Ouédraogo. Thèse de Pharmacie, UFR/ Sciences de la Santé, Université de Ouagadougou 2011 ; N°039: 89 p.
- 16. SOHN S.-H., KIM S.-K., KIM Y.-O., SHIN Y.-S., YANG S.-O., KIM S.-Y., LEE S.-W.** A comparison of antioxidant activity of Korean White and red Ginsengs on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in HepG2 hepatoma cells. *Journal of Ginseng Research* 2013 ; 37(4):442-450.
- 17. SREELATHA S. and PADMA P.R.** Modulatory effects of *Moringa oleifera* extracts against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and oxidative damage. *Human and experimental Toxicology* 2011 ; 30(9):1359-1368.
- 18. TANIH N.F., NDIP R.N.** Evaluation of the Acetone and Aqueous Extracts of Mature Stem Bark of *Sclerocarya birrea* for Antioxidant and Antimicrobial Properties. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012 ; 834156:7p.
- 19. YOUL E., BARDY G., MAGOUS R., CROS G., SEJALON F., VIRSOLVY A., RICHARD S., QUIGNARD J.F., GROSS R., PETIT P., BATAILLE D., OIRY C.** Quercetin potentiates insulin secretion and protects INS-1 pancreatic  $\beta$ -cells against oxidative damage via the ERK 1/2 pathway. *British Journal of Pharmacology* 2010 ; 161:799-814.