

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET
DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : Biologie moléculaire et cellulaire/Immunologie approfondie

**Thème : Evaluation des paramètres du stress oxydant chez les
diabétiques insulino-dépendants**

Présenté par : BOUKERTOUTA Sami

HADEF Souad

Devant le jury composé de :

Président (e) : Mme BRAIK Asma (M.A.A)

Université de Guelma

Examineur : Mme DRIF Fahima (M.A.A)

Université de Guelma

Encadreur : Melle MERABET Rym (M.A.A)

Université de Guelma

Juin 2014

Remerciement

Avant tout nous rendrons grâce à Dieu le tout puissant qui nous a donné la volonté et la force pour réaliser ce travail de recherche.

Tout d'abord, Nous remercions notre encadreur Madame Merabet R pour sa disponibilité et pour tous les efforts qu'elle a fourni afin de nous aider à réaliser notre travail de recherche avec plaisir.

Nos remerciements vont également aux membres du jury qui nous ont fait l'honneur d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous profitons de ces quelques lignes pour remercier toutes les personnes qui nous avons aidées, de près ou de loin, réalisation de ce travail de fin d'études, en particulier Monsieur Bousbia Aissam.

Sans oublier également tous les enseignants et les travailleurs de leur bienveillance et les efforts déployés durant les années de notre formation universitaire.

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction	1
I. Revue bibliographique	
1. Le diabète sucré.....	2
2. Classification du diabète sucré.....	2
3. Diabète de type 1.....	3
3.1. Définition du diabète de type 1.....	3
3.2. Les formes du diabète de type 1.....	3
3.2.1. Diabète de type1 auto-immun.....	3
3.2.2. Diabète de type 1 idiopathique.....	4
3.3. Etiologie du diabète de type 1.....	4
3.3.1. Les facteurs génétiques.....	4
3.3.2. Les facteurs de l'environnement.....	5
3.3.3. Facteurs immunitaire.....	6
3.4. Traitement du diabète de type 1.....	8
3.4.1. Traitement palliatif: Insulinothérapie du diabète de type 1.....	8
3.4.2. Traitement curatif: greffe du pancréas.....	8
4. Complications du diabète	9
5. Toxicité du glucose et stress oxydant chez le diabétique.....	9
5.1. Les voies biochimiques impliquées.....	9
5.2. La glycosylation non enzymatique ou glycation.....	10
5.3. L'augmentation du stress oxydant.....	10
5.3.1. La production de radicaux libres au cours du diabète.....	10
5.3.2. Altération des défenses antioxydantes au cours du diabète.....	10
5.3.3. Augmentation des marqueurs de stress oxydant au cours du diabète.....	11
1. Stress oxydant.....	12
1.1. Définition.....	12
2. Les dérivés réactives de l'oxygène.....	12
2.1. L'oxygène singulet (1 O_2).....	13
2.2. Ion Superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$).....	13

2.3. Le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	13
2.4. Radical libre hydroxyle (OH°).....	14
2.5. Oxyde nitrique (NO).....	15
2.6. Peroxynitrite.....	15
3. l'origine des radicaux libres.....	16
3.1. Chaîne respiratoire mitochondriale.....	16
3.2. Les phagocytes.....	16
3.3. L'environnement.....	17
4. Importance physiologique des espèces réactives de l'oxygène.....	17
4.1. Défense immunitaire et « Burst Oxydatif ».....	17
4.2. Messagers intra et extracellulaire.....	18
4.3. Régulation du tonus vasculaire.....	18
5. Conséquences du stress oxydant.....	18
5.1. Au niveau moléculaire.....	18
5.1.1. L'oxydation des lipides.....	18
5.1.2 Les Protéines.....	20
5.1.3. Les Acides Nucléiques.....	21
5.2. Les conséquences à long termes.....	22
6. Systèmes de défense antioxydante.....	23
6.1. Système antioxydants enzymatique.....	24
6.1.1. Superoxyde dismutase (SOD).....	24
6.1.2. Glutathion peroxydase (GSH-Px).....	24
6.1.3. Catalase.....	25
6.1.4. Glutathionne-S-transférase (GST).....	25
6.1.5. Les thiorédoxines (TRx) et la thiorédoxines réductase (TRxR).....	25
6.2. Système antioxydants endogènes non enzymatique.....	26
6.2.1. Glutathion réduit (GSH).....	26
6.2.2. L'acide urique.....	26
6.2.3. Les protéines de stockage des métaux de transition.....	26
6.3. Les molécules antioxydantes.....	27
6.3.1. La vitamine C.....	27
6.3.2. La vitamine E.....	27
6.3.3. Le sélénium.....	27
6.3.4. Le zinc.....	27

6.4. Les antioxydants d'origine végétale.....	28
6.4.1. Polyphénols.....	28
6.4.2. Les flavonoïdes.....	28
II. Matériel et méthode	
1. Matériel biologique.....	29
1.1 Les prélèvements sanguins.....	29
1.2 Matériel non biologique.....	29
2. Méthodes.....	29
2.1. Evaluation du profil glycémique.....	29
2.1.1 Dosage du glucose plasmatique	29
2.1.2 Détermination de l'hémoglobine glyquée (HbA1C).....	30
2.2. Evaluation du profil lipidique.....	30
2.2.1 Dosage du cholestérol plasmatique.....	30
2.2.2. Dosage des triglycérides plasmatiques.....	31
2.2.3. Dosage du cholestérol-HDL (C-HDL).....	32
2.2.4. Détermination du cholestérol-LDL (C-LDL).....	32
2.3. Evaluation marqueurs biologiques de statut oxydant.....	32
2.3.1. Détermination de la peroxydation lipidique(MDA).....	32
2.4. Evaluation marqueurs biologiques de statut antioxydant.....	33
2.4.1. Dosage du glutathion réduit (GSH).....	33
2.4.2. Ferritine.....	33
2.4.3. Albumine.....	34
2.4.4. Dosage de l'acide urique plasmatique.....	34
3. Analyse statistique.....	34
III. Résultats	
1. Résultat de l'exploration glycémique.....	35
2. Résultat d'exploration lipidique.....	36
3. Résultat d'exploration du statut oxydant.....	36
4. Résultat d'exploration du statut anti-oxydant.....	37
VI. Discussions	40
Conclusion	45
Références bibliographiques	46
Annexe	
Résumé	

Liste des figures

Figure.1: Mécanisme de destruction auto-immune de la cellule β dans le DID	7
Figure.2: Déplétion du glutathion par la voie des polyols.....	10
Figure.3: La formation de l'oxyde nitrique.....	15
Figure.4: Respiration mitochondriale.....	16
Figure.5: Métabolisme oxydatif du neutrophile.....	17
Figure.6: Initiation de la peroxydation lipidique.....	19
Figure.7: La propagation de la peroxydation lipidique à d'autres AGPI	19
Figure.8: Produits terminaux de la peroxydation lipidique.....	20
Figure.9: Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire.....	21
Figure.10: Types de lésions de l'ADN provoqués par les radicaux.....	22
Figure.11: Principales pathologies s'accompagnant d'un stress oxydant.....	23
Figure.12 : Neutralisation des espèces réactives de l'oxygène.....	24
Figure.13: Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques.....	26
Figure.14: Taux de glycémie et HbA1C chez les diabétiques et les témoins.....	35
Figure.15. Taux des paramètres lipidiques chez les diabétiques et les témoins.....	36
Figure.16. Taux de MDA chez les DID et les témoins.....	37
Figure.17. Taux de GSH chez les diabétiques et les témoins.....	38
Figure.18. Taux de la ferritine , l'albumine et l'acide urique chez les diabétiques et les témoins.....	38

Liste des tableaux

Tableau.1: Classification étiologique du diabète sucré selon ADA.....	2
Tableau.2: Evaluation des paramètres glycémique chez les diabétiques (DID) et les témoins.....	35
Tableau.3: Evaluation des paramètres lipidiques chez la population étudiée.....	36
Tableau.4: Evaluation des paramètres du statut oxydant (MDA) chez les DID et les témoins.....	36
Tableau.5: Evaluation des paramètres du statut antioxydant chez les diabétiques et les témoins.....	37

Liste d'abréviations

ADA	Association A méricaine du D iabète.
ADN	Acide D ésoxyribonucléique.
AGE	A dvanced G lycation E nd P roducts.
β	B eta.
CHE	C holestérol E stérase.
CHOD	C holestérol O xydase.
CMH	Complexe M ajeur d' H istocompatibilité.
CPA	Cellules P ésentatrice de l' A ntigène.
Cu	C uivre.
DTNB	D ithiobis 2-nitro benzoic acid
DT1	D iabète de T ype 1 .
DT2	D iabète de T ype 2 .
DID	D iabète I nsulino- D épendant.
DNID	D iabète N on I nsulino- D épendant.
DTNB	D i T hio bis (Acide 2-Nitro B enzoïque).
EDTA	Acide Ethylène D iamine T étraacétique
EOA	Espèce O xygène A ctive.
ERO	Espece R eactive O xygene.
FID	F édération I nternational du D iabète.
GABA	Acide G lutamique en acide γ -aminobuturique.
GAD	Acide G lutamique D écarboxylase
GMPc	G uanosine M onophosphate C yclique

GOD	Glucose Oxydase
GPO	Glycérol Phosphate Déshydrogénase
DAP	Di-hydroxyacétone Phosphate.
GSH	Glutathion réduit.
GSSG	Glutathion oxydé.
GST	Glutathion-S-Transférases.
HbA1c	Hémoglobine glyquée.
HDL	Lipoprotéines de Haute Densité.
HLA	Human Leukocyte Antigen
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène.
HOCl	Acide Hypochlorique.
HO.	Radical Hydroxyle
HOO.	Radical Hydroperoxyde.
IA-2	Islet Antigen 2.
IAA	Insulin Auto-Anti body.
ICA	Islet Cell Autoantibodies.
IFN	Interferon.
IL	InterLeukine.
LADA	Latent Auto-immune Diabetes of the Adult.
LDL	Low Density Lipoproteine.
LT	Lymphocyte T.
MDA	Malondialdéhyde.

Mn	Manganèse.
MPO	Myéloperoxydase.
NAD+	Nicotinamide Adénine Dinucléotide (forme oxydée).
NADP+	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (forme oxydée).
NADPH, H+	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (forme réduite).
NADPH oxydase	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate oxydase.
NS	Non Significatif.
NO	Monoxyde d'azote.
O₂^{-o}	Radical superoxyde.
OMS	Organisation Mondiale de la Santé.
ONOO⁻	L'anion peroxynitrite.
PKC	Protéine Kinase C.
POD	Peroxydase.
RAGE	Receptor of Advanced Glucated End product.
rpm	Rotations par minute.
ROS	Reactive Oxygen Species.
SOD	SuperOxydes Dismutases.
TBA	Thio Barbituric Acid.
TCA	Trichloroacétique Acid.
TCR	Récepteur de la Cellule T.
TFN	Tumor Nucrosis Factor.
VLDL	Very Low Density Lipoprotéine.
γ	Sigma.

Introduction

Le diabète sucré est un trouble du métabolisme du glucose, caractérisé par des niveaux de glycémie anormaux résultant de l'incapacité du corps de fabriquer l'insuline ou à l'utiliser.

Responsable chaque année de près de 4 millions de décès, cette pathologie est considérée par l'OMS comme une épidémie dont la prévalence a augmenté de façon très importante au cours de ces dernières années (**Nabtieh, 2012**).

Au cours du diabète, les anomalies lipidiques sont fréquentes et prononcées et représentent un facteur important mis en cause dans l'augmentation du risque cardiovasculaire par altération des vaisseaux sanguins. De plus, un mauvais équilibre du diabète peut conduire à d'autres complications potentiellement mortelles (**Silbernagl et Sparaul, 2009**).

Ces complications sont fortement liées à un certain nombre des facteurs. A coté de l'hyperglycémie chronique et la glycation non enzymatique des protéines un facteur très important impliqué dans la genèse de ces complications est le stress oxydatif (**Vexiau, 2006**).

Ce dernier est la conséquence de concentrations anormalement élevées de glucose dans les milieux extra et intracellulaires conduisant à un déséquilibre de la balance entre pro-oxydants et anti-oxydants. Plusieurs mécanismes ont été évoqués mettant en jeu l'auto-oxydation du glucose, la voie des polyols, la glycation des protéines et la formation de produits de glycation avancée (AGE) (**Delattre et al, 2001**).

Afin de vérifier l'éventuelle implication des paramètres : âge de la maladie et persistance de l'hyperglycémie dans la surproduction des espèces réactives de l'oxygène nous nous sommes proposé de faire la présente étude : en comparant la variation des paramètres glycémiques, le profil lipidique, statut oxydant et antioxydant d'une population atteinte de diabète insulino-dépendant, caractérisé par une durée d'évolution moyennement courte, avec des témoins potentiellement sains.

1. Le diabète sucré

Le mot **diabète** vient du grec «dia-baîno». **Le diabète** est une maladie due à une concentration anormalement élevée du sucre dans le sang. L'OMS le définit par une glycémie supérieure à 1,26 g/L (7 mmol/L) à jeun, confirmée par deux prises de sang consécutives (**Auberval., 2010**).

Cette pathologie est définie comme étant un désordre métabolique chronique, dû soit à une carence insulinaire (diabète de type 1), soit à une résistance insulinaire (diabète de type 2), caractérisé non seulement par un métabolisme perturbé des hydrates de carbone, mais aussi par un métabolisme déséquilibré des protéines et des lipides (**Sebbagh et al., 2007**). Le diabète survient lorsque le corps ne parvient plus à produire suffisamment d'insuline ou n'utilise pas cette dernière de manière efficace

2. Classification du diabète sucré

En 1997, l'association américaine du diabète (ADA) a proposé une classification des diabètes. Le tableau suivant résume cette classification.

Tableau.1. Classification étiologique du diabète sucré selon ADA (**Rodier, 2001**).

Types	Facteurs associés
1. Diabète sucré de type 1	<p>a. Auto-immun (trouble des cellules B).</p> <p>b. Idiopathique (rare, sans élément pour facteur auto-immun).</p>
2. Diabète sucré de type 2	<p>a. Résistance à l'insuline.</p> <p>b. Défaut de sécrétion d'insuline.</p>
4. Diabète gestationnel	Le diabète gestationnel est un trouble de la tolérance glucidique conduisant à une hyperglycémie de sévérité variable débutant ou diagnostiqué pour la première fois pendant la grossesse.

3. Diabète de type 1

C'est seulement dans les années cinquante qu'une distinction nette a été faite entre le diabète sucré insulino-dépendant (diabète de type 1), et le diabète non insulino-dépendant (diabète de type 2). De même, ce n'est que de manière récente, au cours des années quatre-vingts, que le diabète de type 1 a été reconnu comme une maladie **auto-immune** (Chatenoud *et al.*, 2012).

3.1. Définition du diabète de type 1

Le diabète de type 1 est une affection auto-immune spécifique d'un organe. La production d'insuline faiblit dans le diabète de type 1 à cause d'une réponse immunitaire spécifique dirigée contre les cellules β productrices d'insuline dans les îlots de Langerhans du pancréas (Chapel *et al.*, 2004). Cette réaction auto-immune survient sur un terrain de susceptibilité génétique à la suite de facteurs déclenchants (Levy-Marchal *et al.*, 2007). Le diagnostic du diabète de type 1 est en général aisé. Il est porté devant l'association d'une symptomatologie fonctionnelle aiguë (syndrome polyuro-polydipsique avec polyphagie et amaigrissement ou fatigue, somnolence, soif intense, vision embrouillée, cicatrisation lente) avec des glycémies élevées.

- ✓ Glycémie à jeun (prélèvement de sang veineux) $\geq 1,26$ g/L (6.9 mmol/L).
- ✓ Glycémie $\geq 2,00$ g/L (11 mmol/L) quelque soit l'heure du prélèvement en présence de symptômes cliniques. (ADAS, 2009)

3.2. Les Formes du diabète de type 1

Le diabète de type 1 est subdivisé en type 1 **auto-immun** (environ 90% des cas) et type 1 **idiopathique** (Delattre *et al.*, 2003).

3.2.1. Diabète de type 1 auto-immun

Il existe une forme du diabète de type 1 qui se développe de manière plus lente et insidieuse, le diabète auto-immun latent ou LADA (pour latent Auto-immune Diabètes of the Adult) (Chatenoud *et al.*, 2012). Dans ce cas le système immunitaire attaque les cellules β insulino-gènes du pancréas et les détruit. Le pancréas produit alors peu ou pas du tout d'insuline. Le diabète de type 1 n'est pas causé par l'obésité ni par une consommation excessive de sucre : on croit plutôt qu'il est causé par une combinaison des facteurs génétiques et des facteurs agressifs du milieu (comme les virus) (Benghida *et al.*, 2007).

Cette forme est souvent diagnostiquée en un premier temps comme un diabète de type 2 car elle survient fréquemment chez des individus adultes avec des cas de diabète de type 2 dans leurs antécédents familiaux. Dans ces formes particulières, le diagnostic du

diabète de type 1 repose sur la découverte dans le sérum des patients d'auto-anticorps spécifiques des cellules β . La progression du LADA peut souvent, mais pas toujours, nécessiter la mise en place d'une insulinothérapie (**Chatenoud et al., 2012**).

3.2.2. Diabète de type 1 idiopathique

IL s'agit là aussi de diabète insulino-pénique mais sans cause évidente, immunitaire ou autre (par exemple : diabète mitochondrial). C'est dans ce cadre que s'inscrivent les diabètes particuliers pouvant être rencontrés dans les ethnies noires d'origine africaine subsaharienne (Flatbush Diabète), ce diabète partage avec le diabète de type 1 le début brutal cétosique, la présence de groupes particuliers HLA, mais ne s'accompagne pas de réaction auto-immune et évolue souvent, après un début brutal, vers un diabète de type non insulino-dépendant, quoique plus faiblement insulino-sécréteur que le diabète de type 2 classique. On y retrouve une forte hérédité familiale et une tendance au surpoids, comme dans le diabète de type 2. Cette forme doit être différenciée des diabètes dits tropicaux regroupant les diabètes par malnutrition protéique et ceux par pancréatite fibrocalculeuse liée à une intoxication cyanhydrique au manioc (**Perlemuter et al., 2003**).

3.3. Etiologie du diabète de type 1

Le diabète de type 1 est une maladie multifactorielle et polygénique, résultant de l'interaction entre des gènes spécifiques et des facteurs de l'environnement.

3.3.1. Les facteurs génétiques

a. Le poids de l'hérédité

Le taux de concordance pour la maladie entre jumeaux monozygotes est environ de 35 à 50%, et jusqu'à 60% lorsque les jumeaux partagent les haplo types de susceptibilité DR3/DR4 hétérozygotes. Les germains HLA identiques ont un taux de concordance approximative 16%. Environ 5% des enfants dont l'un des parents est diabétique sont à risque de développer la maladie et de manière intéressante mais pour l'instant inexplicée, avec un risque supérieur si le parent atteint est le père (**Chatenoud et al., 2012**)

b. Le rôle des gènes HLA

L'association entre certains des haplotypes HLA et le diabète de type 1 a été rapportée initialement en 1974, bien qu'il s'avéra difficile au début de caractériser finement les gènes impliqués du fait du fort déséquilibre de liaison qui caractérise la région HLA (**Chatenoud et al., 2012**). Le mécanisme à la base de l'association moléculaire à HLA-DR3 et-DR4 très spécifique n'est pas connu, mais l'acide aminé 57 dans HLA-DQB

est localisé dans le sillon liant l'antigène; il pourrait ainsi influencer la liaison d'un peptide auto antigénique critique (**Chapel et al., 2004**).

Bien que cette association entre un gène et le risque de diabète soit la plus étroite et la plus clairement définie des études détaillées, de très grands nombres de familles suggèrent que des interactions entre 10-15 gènes contrôlent le développement du DID (**Chapel et al., 2004**). Parmi les mécanismes proposés pour expliquer l'action des gènes HLA de prédisposition, on peut citer une capacité de présentation des auto-antigènes plus performante par ces molécules HLA. Ainsi, on remarque l'absence d'un résidu d'acide aspartique en position 57 de la chaîne DQ β , une position critique puisqu'elle fait partie du site de liaison entre le peptide et la molécule DQ (**Chatenoud et al., 2012**).

c. Rôle des gènes non CMH

Il existe également des polymorphismes des gènes situés en dehors du CMH qui interviennent dans la susceptibilité de développement de la maladie. Les données les plus récentes montrent ainsi le rôle dans la prédisposition au diabète d'un polymorphisme au niveau du gène codant l'insuline (VNTR) et du gène de l'IL-2, du gène CTLA4 et du gène PTPN22 (**Chatenoud et al., 2012**).

3.3.2. Les facteurs de l'environnement

Ils Jouent un rôle dans le déclenchement de la maladie. Ce constat est confirmé par l'augmentation globale de l'incidence de DID au cours de la dernière décennie et les variations saisonnières dans la fréquence du diagnostic, qui est plus grande durant l'automne et l'hiver (**Chapel et al., 2004**). Ces facteurs environnementaux peuvent être des toxines (dérivés de nitrate) et des pathogènes comme des entérovirus, parvovirus ou ceux responsables de la rubéole et des oreillons (**Auberval, 2010**).

a. Les virus

Des études épidémiologiques ont montré l'implication d'une infection virale congénitale, la rubéole, dans le développement du DT1. En effet, 20 % des enfants nés de mères atteintes par la rubéole ont développé un DT1 (**Auberval, 2010**).

L'hypothèse virale a été initialement basée sur la relation temporelle existante entre la survenue de certaines infections virales et le début de la maladie. Ce fut en particulier le cas pour les infections à virus Coxsackie B4 mais les données ne sont pas très probantes si l'on considère que, l'atteinte auto-immune peut débiter très longtemps avant l'apparition de l'hyperglycémie. De plus les paramètres sérologiques, c'est-à-dire la présence

d'anticorps anti-virus dans le diabète de type 1, sont souvent erratiques (**Chatenoud et al., 2012**).

Des similitudes ont été trouvées entre la séquence de certaines protéines de Coxsakies et d'ICA comme GAD, ce qui suggère que l'auto-immunité est déclenchée par un mimétisme moléculaire. La plupart des nouveaux cas de diabète, cependant ne montrent pas de relation ferme avec une infection particulière. Il faut remarquer que le concept actuel de l'auto-immunité ne requiert pas l'intervention d'un agent spécifique ; diverses lésions inflammatoires de l'organe cible peuvent entraîner une maladie auto-immune (**Chapel et al., 2004**).

b. Les alimentations

La toxicité des nitrosamines a été avancée car il a été observé, en Islande, que les enfants dont les mères ont consommé de la viande fumée au cours de leur grossesse font plus souvent un diabète de type 1. Dans les pays scandinaves, il a été noté une prévalence plus élevée de diabète de type 1 chez les nourrissons nourris au lait de vache que chez ceux qui étaient allaités par leur mères. La démonstration de la présence au diagnostic d'anticorps anti albumine bovine a fait suspecter un rôle toxique de certaines protéines du lait de vache. En fait, une partie de la molécule d'albumine bovine présenterait des analogies de structure avec certaines protéines des cellules β et pourrait ainsi s'avérer immunogène (**Rodier., 2001**).

3.3.3. Facteurs immunitaire

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immunitaire dans laquelle les îlots pancréatiques montrent une infiltration abondante des cellules mononuclées qui comprennent des cellules dendritiques, des macrophages et des cellules T.

Bien que la destruction des cellules β par médiation des cellules T, l'implication des anticorps ont été d'une grande importance en permettant un diagnostic précis et la prédiction des individus à risque de développer ce type de diabète (**Hamadi., 2010**).

a. L'auto anticorps

Dans les sérums des patients atteints de diabète de type 1, une présence d'auto anticorps spécifiques des cellules B insulinosécrétrices des îlots de langerhans dénommés ICA (pour Islet Cell Autoantibodies) est très remarquée. Les principaux autoantigènes reconnus par les ICA sont la pro-insuline/l'insuline, la décarboxylase de l'acide glutamique (ou GAD, une enzyme dont l'expression est partagée entre les cellules B de l'îlot de langerhans et les cellules du système nerveux central), une tyrosine phosphatase nommée

IA-2 et un transporteur ZnT8, tous deux spécifiques des cellules B (Chatenoud *et al.*, 2012).

b. La destruction de la cellule β

La destruction de la cellule β est essentiellement due à une infiltration des îlots par des lymphocytes T helper CD4 et des lymphocytes T cytotoxiques CD8. Au cours de cette réaction des auto-anticorps sont produits et dirigés contre certains antigènes pancréatiques. Ces auto-anticorps n'ont pas en eux-mêmes de rôle pathogène mais sont des marqueurs fiables du déroulement du processus auto-immun pathologique (Grimaldi., 2000).

Le processus de recrutement des lymphocytes dans l'îlot pancréatique ne sont pas clairement compris, mais il implique la production de cytokines à la fois par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA), les cellules de l'endothélium vasculaire et les cellules β (voir figure.1) (Auberval., 2010).

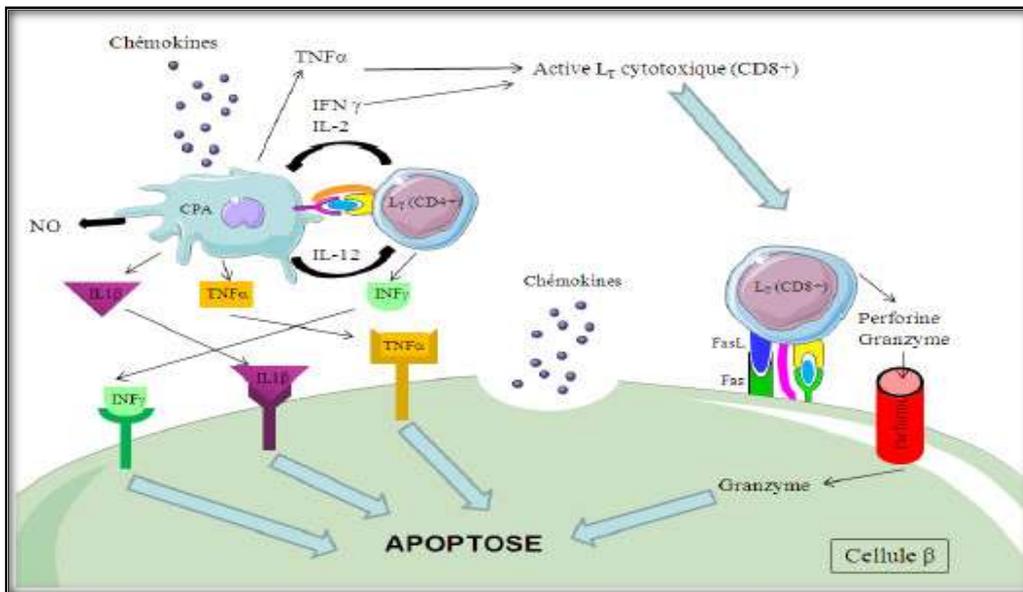


Figure.1. Mécanisme de destruction auto-immune de la cellule β dans le DID (modifié d'après Pirot *et al.*, 2008) (Auberval, 2010).

Les CPA présentent l'antigène de la cellule β au lymphocyte T(LT) helper (CD4+) naïf via la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et au récepteur TCR du lymphocyte T. Ceci induit la production par la CPA d'interleukine 12 (IL-12) permettant la différenciation du LT naïf en un LT mature. Celui-ci en retour sécrète de l'interleukine 2 (IL-2) et de l'interféron γ (IFNγ), qui va stimuler la production d'interleukine 1β (IL-1β), de Tumor Necrosis Factor α (TNFα) et d'oxyde nitrique (NO).

La sécrétion de ces cytokines active les LT cytotoxiques (CD8+) qui arrivent dans l'îlot et qui entraînent la sécrétion par les cellules β de chémokines. Le LT cytotoxique se

lie à la cellule β par son TCR et via la molécule du CMH de classe I à la surface de la cellule pancréatique. De plus, il exprime à sa surface la protéine FasL qui va se lier au récepteur Fas (de la famille des récepteurs au TNF) de la cellule β . L'activation de la voie Fas induit l'activation des caspases, notamment celle de la caspase 8, et la mort cellulaire par apoptose. En parallèle, ces LT déversent le contenu de leurs granules, qui contiennent le système granzyme/perforine. La perforine génère des pores sur la cellule β , permettant la pénétration d'une protéase à sérine, appelée granzyme qui va activer les caspases et induire la mort cellulaire par apoptose.

Le dernier mécanisme illustré dans la figure (1) est la fixation de cytokines pro-inflammatoires comme le $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\gamma$ et l' $\text{IL-1}\beta$, sécrétées par les cellules immunitaires (CPA et LT) sur leurs récepteurs à la surface de la cellule β , induisant ainsi l'apoptose par différentes voies de signalisation dont la voie $\text{NF}\kappa\beta$ (Auberval, 2010).

3.4. Traitement du diabète de type 1

3.4.1. Traitement palliatif : Insulinothérapie du diabète de type 1

Les moyens actuels de traitement du diabète de type 1 consistent en des injections régulières d'insuline, à la pratique d'une activité physique fréquente et à une alimentation restreinte en glucose. Il a été démontré qu'une meilleure forme physique permet un contrôle plus adéquat de la glycémie et du cholestérol chez les adolescents diabétiques. Un équilibre glycémique, un régime strict et une thérapie appropriée avec de l'insuline diminue l'occurrence et la progression des complications liées à la maladie (Nabtieh, 2012).

3.4.2. Traitement curatif : greffe du pancréas

Bien que les techniques d'insulinothérapie se soient considérablement améliorées durant les vingt-cinq dernières années, les résultats obtenus sont loin encore d'être idéaux et la normoglycémie à vie n'est atteinte que chez un très faible nombre d'individus. Une alternative thérapeutique se développe depuis les années 70, consistant à remplacer le pancréas défaillant par un pancréas d'un donneur décédé.

Malgré l'évolution de cette technique, plusieurs limites persistent dont le nombre limité de donneur, la nécessité d'un traitement immunosuppresseur à vie et la chirurgie lourde que demande cette greffe (Nabtieh, 2012).

4. Complications du diabète

Les complications du diabète de type 1 se subdivisent en deux groupes: les complications aiguës qui sont d'une urgence vitale, et les complications chroniques qui s'installent progressivement. Les deux complications aiguës majeures du diabète de type 1 sont le coma hypoglycémique et l'acidocétose.

L'infection est une complication majeure du diabète, la raison de susceptibilité accrue à l'infection n'est pas connue. L'explication se trouve peut-être dans les troubles fonctionnels des neutrophiles que les on observe chez les patients dont le diabète est mal contrôlé et qui peuvent être corrigés par ajustement de leur traitement à l'insuline.

Les complications à long terme du diabète consistent en des maladies des grandes artères (conduisant à l'athérome) ou des capillaires (micro-angiopathie). La micro-angiopathie est responsable des lésions rétinienne et glomérulaire du diabète. Dans les pays développés, la rétinopathie diabétique est responsable de la plupart des cécités acquises chez les adultes jeunes ou d'âge moyen. La rétinopathie est détectée rarement dans les 5 ans du diagnostic, mais plus d'un tiers des patients est touché 15-20 ans après le diagnostic. Le maintien à long terme de la glycémie dans les limites physiologiques est le facteur principal qui prévient ces complications (**Chapel *et al*, 2004**).

5. Toxicité du glucose et stress oxydant chez le diabétique

5.1. Les voies biochimiques impliquées

L'effet délétère de l'excès de glucose sanguin s'exerce au niveau des tissus-cibles, par différentes voies biochimiques citant comme exemple: la voie de la protéine kinase C, la voie des polyols et/ou la glycation des protéines.

Plusieurs travaux ont montré dans de nombreux tissus, une hyperactivité des PKC au cours du diabète. Cet effet est lié à une augmentation du taux des DAG synthétisés *de novo* à partir de précurseurs dérivés de la glycolyse.

Dans le diabète, le glucose excédentaire ne peut plus être métabolisé par la glycolyse et la voie des pentoses phosphates. Il est pris en charge par la voie des polyols qui le transforme en sorbitol par l'aldose réductase puis en fructose par le sorbitol déshydrogénase (voir figure.2) (**Carreras., 2004**).

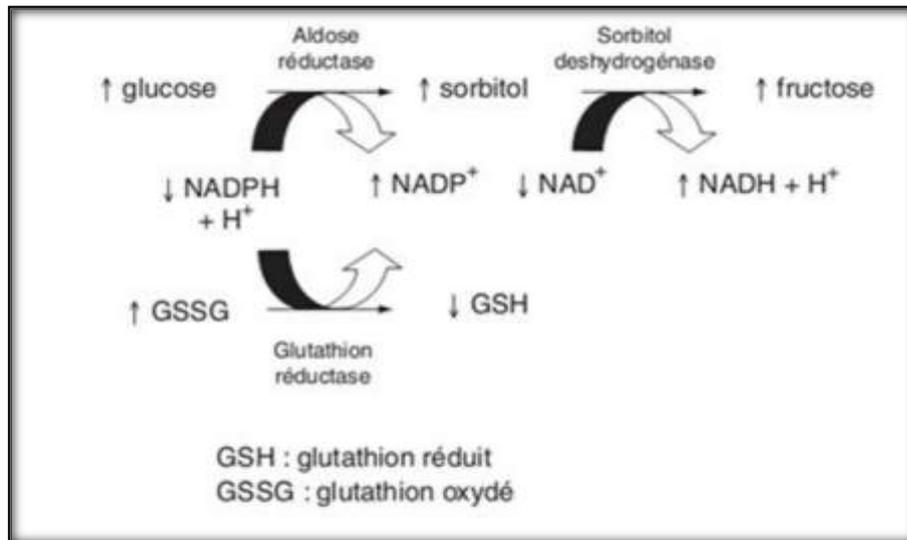


Figure.2. Déplétion du glutathion par la voie des polyols (Bonnefont-Rousselot., 2004).

5.2. La glycosylation non enzymatique ou glycation

Les sucres réducteurs sont capables de se lier de façon non enzymatique avec les groupes amines libres des protéines, des lipides et acides nucléiques pour former des produits avancés de glycation ou AGE ("Advanced Glycation End Products"). Ces AGE s'accumulent dans tous les tissus et jouent un rôle dans l'initiation et la progression des complications vasculaires dans le diabète (Carreras., 2004).

5.3. L'augmentation du stress oxydant

Dans le cas du diabète, une augmentation de la production des radicaux libres et des marqueurs du stress oxydant a été observée avec à la fois une diminution des défenses antioxydantes (Carreras., 2004).

5.3.1. La production de radicaux libres au cours du diabète

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la production accrue des radicaux libres induite par l'hyperglycémie. L'activation de la voie des polyols entraîne une augmentation de NADH cofacteur d'enzymes catalysant des réactions génératrices des radicaux libres telle que la PGH synthèse. La fragmentation oxydative des produits d'Amadori et la liaison des AGE sur leurs récepteurs RAGE produisent des radicaux oxygénés.

Le glucose peut subir une auto-oxydation en présence de métaux de transition. Cette réaction conduit à la formation d'un radical oxydé en dicarbonyl et d'un anion superoxyde O₂⁻ (Carreras., 2004).

5.3.2. Altération des défenses antioxydantes au cours du diabète

L'effet de la production accrue de ROS est potentialisé par la réduction des défenses antioxydantes. Une diminution des défenses antioxydantes enzymatiques (GPx, catalase,

SOD) ou non enzymatiques comme le GSH ou la vitamine E peut conduire à l'apparition d'un stress oxydant dans les tissus. Une telle altération a été rapportée au cours du diabète et dans plusieurs études, *in vitro*, en présence de glucose (**Januel., 2003**).

5.3.3. Augmentation des marqueurs de stress oxydant au cours du diabète

La production des radicaux libres dans les systèmes biologiques est difficilement mesurable. L'augmentation du stress oxydant au cours du diabète a donc été principalement démontrée par une augmentation des dommages causés par les radicaux libres sur les protéines et les lipides. Le principal marqueur de l'augmentation des radicaux libres est l'augmentation de la peroxydation lipidique. Plusieurs études ont mis en évidence l'augmentation du taux des produits de peroxydation lipidique (diènes conjugués, hydroperoxydes d'acides gras et MDA) dans le plasma des diabétiques (**Januel., 2003**).

1. Stress oxydant

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des radicaux oxygénés toxiques, situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines (**Favier, 2003**).

1.1. Définition

Le stress oxydant est généralement décrit comme un déséquilibre entre la capacité antioxydante et le niveau des espèces réactives à l'oxygène (**ERO**) en faveur de ces derniers entraînant ainsi l'accumulation du produit de l'oxydation. Ce déséquilibre induit une altération des systèmes de signalisation cellulaire et des autres fonctions (**Azzi, 2007**). L'appellation « espèces réactives à l'oxygène » n'est pas restrictive, elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit radical superoxyde (O_2^-), radical hydroxyle (OH), monoxyde d'azote (NO), mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les peroxydinitrites ($OONO^-$) (**Roberts et al., 2010**). ces espèces sont impliquées dans la régulation des activités cellulaires, signalisation et différenciation cellulaire, activation des voies métaboliques et système immunitaire (**Manea et al., 2010**).

Toutefois, le bon fonctionnement de notre organisme requiert une production soigneusement régulée des ERO. Si les systèmes antioxydants ne parviennent pas à inactiver l'excès d'ERO, ces espèces réagiront avec les substrats biologiques tels que les lipides, les protéines et les acides nucléiques produisant ainsi des modifications irréversibles. (**Andresen et al., 2006**).

2. Les dérivés réactives de l'oxygène

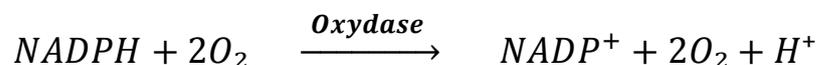
Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire qui lui confère une réactivité vis-à-vis d'autres molécules. Celle-ci est variable selon la nature du radical. En biologie, les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électron à partir de l' O_2 . Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène (O° , OH° , NO° , ROO°), mais également les composés non radicalaires ($ROOH$, H_2O_2 , $1O_2$) (**Milane, 2004**).

2.1. L'oxygène singulet ($1 O_2$)

Lorsque de l'énergie est apportée à l'oxygène, celui-ci passe à l'état singulet qui représente la forme activée. C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules. Il est formé à partir de l'ion superoxyde selon la réaction suivante (**Odile et al., 2005**).



La principale source étant la réduction d'une molécule d' O_2 en radical anion superoxyde (O_2°). Cette réaction semble surtout être catalysée par des NADPH oxydases membranaires, qui sont généralement des chaînes de transport d'électrons constituées de flavoprotéines, cytochromes et quinones. La réaction globale est la suivante (**Januel, 2003**).



2.2. Ion Superoxyde ($O_2^{\circ-}$)

L'ion Superoxyde ($O_2^{\circ-}$) est un dérivé très réactif de l'oxygène. Il est produit au cours du métabolisme mitochondrial à la suite de la réaction suivante :

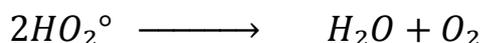
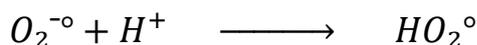


Relativement stable, il n'est pas très toxique pour l'organisme (**Odile et al., 2005**). L' $O_2^{\circ-}$ peut également être formé dans certains organites cellulaires tels que les peroxysomes, par la conversion de l'hypoxanthine en xanthine, puis en acide urique, catalysé par la xanthine oxydase. Une fois formé, l' $O_2^{\circ-}$ peut être neutralisé par un H^+ et transformé en radical hydroperoxyde (HOO°) ou réagir avec le NO pour former l'anion peroxynitrite ($ONOO^{\circ-}$) (**Januel, 2003**).

2.3. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

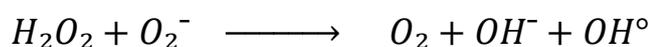
Le peroxyde d'hydrogène est considéré comme une espèce réactive dérivée de l'oxygène (ERO) même s'il n'a pas une structure radicalaire, car il est capable d'initier ou de propager des dommages oxydatifs et avec une durée de vie compatible avec une action

à distance de son lieu de production. Il est formé secondairement par la dismutation de l'anion superoxyde (**Odile et al., 2005**).

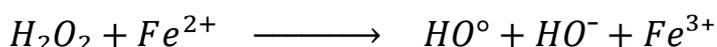


La dismutation d' $O_2^{\cdot -}$ spontanée ou catalysée par les superoxydes dismutases est la source majeur de H_2O_2 produit *in vivo* par différentes oxydases, incluant les aminoacides oxydases et la xanthine oxydase (**Januel, 2003**).

Le H_2O_2 peut être réduit suivant la réaction d'Haber-Weiss engendrant alors un ion OH^- inoffensif et un radical hydroxyle HO^{\cdot} , plus agressif.



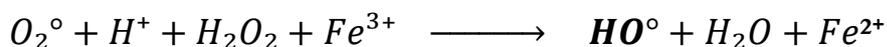
Cette réaction est lente et probablement inopérante dans les tissus vivants. En revanche, la réaction de Fenton, qui nécessite l'intervention d'ions Fe^{2+} , se produit *in vivo*. Elle met en jeu la capacité du peroxyde d'hydrogène à oxyder des composés aromatiques en présence de fer (**Januel, 2003**).



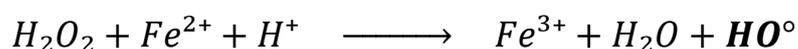
2.4. Radical libre hydroxyle (OH^{\cdot})

Le radical libre hydroxyle (OH^{\cdot}) est très réactif. Son temps de demi-vie en milieu aqueux est de 6-10 secondes. Il peut réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les glucides, les nucléotides, les protéines et être à l'origine de lésion de nécrose. C'est un dérivé de l'ion superoxyde. Il peut être à la suite de diverses réactions. Nous en citerons deux à titre d'exemple, comme (**Odile et al., 2005**).

- La réaction d'Haber-Weiss :



- La réaction de Fenton :



2.5. Oxyde nitrique (NO)

Est un radical avec un électron non apparié, il est formé par l'action du NO synthétase sur L-arginine (voir figure 3), L'oxyde nitrique lui-même moins réactif que les autres radicaux libres, mais sa surproduction dans des conditions spécifiques et capable de provoquer la déplétion des principaux antioxydants au niveau du plasma, tels que l'acide ascorbique et l'acide urique et aussi d'entamer la peroxydation lipidique (**Halliwell, 1997**).

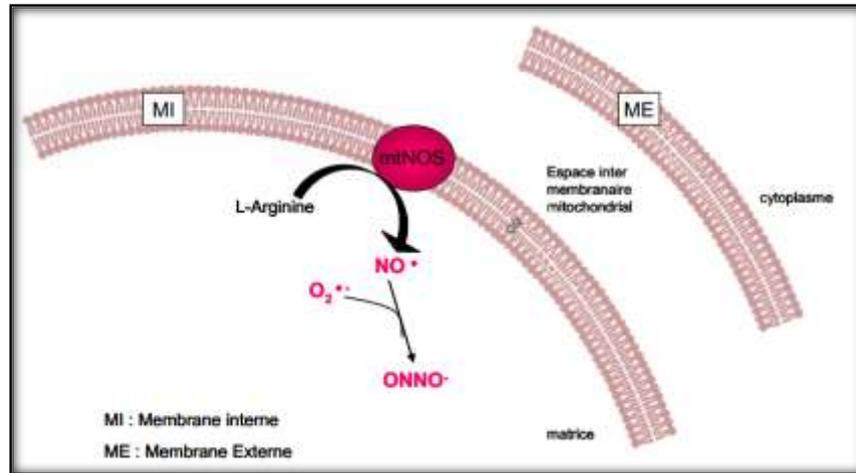


Figure.3. La formation de l'oxyde nitrique (**Carine, 2006**).

2.6. Peroxynitrite (OONO⁻)

La réaction du NO avec anion superoxyde donne naissance au peroxynitrite



Le peroxynitrite est un dérivés d'oxygène très toxique provoque des lésions tissulaires très graves en plus de l'oxydation des LDL . Il apparait comme l'espèce la plus toxique pour les tissus au niveau des sites d'inflammation et participe dans plusieurs désordres neurodégénératif et des lésions rénales. Le peroxynitrite (OONO⁻) est capable d'oxyder les protéines et les bases azotiques des brins d'ADN par une grande similarité de l'oxydation par le radical hydroxyle (**Knight, 2001**).

3. L'origine des radicaux libres

La production des ERO dans les cellules humaines est essentiellement d'origine enzymatique (**Beaudeau, 2006**) et résulte de plusieurs mécanismes :

3.1. Chaîne respiratoire mitochondriale

La mitochondrie représente le site majeur de production cellulaire d'ERO, dans les cellules non phagocytaires 80 % de l'anion superoxyde proviennent du fonctionnement de la chaîne respiratoire (**Carrière et al., 2006**). En effet une proportion significative de l'oxygène (2 à 3 %) échappe à la réduction complète en H₂O et subit une réduction mono-électronique au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire (voir figure 4) pour donner naissance à l'anion superoxyde (O₂^{-•}), qui est le précurseur des ERO (**Gardès - Albert et al, 2003**).

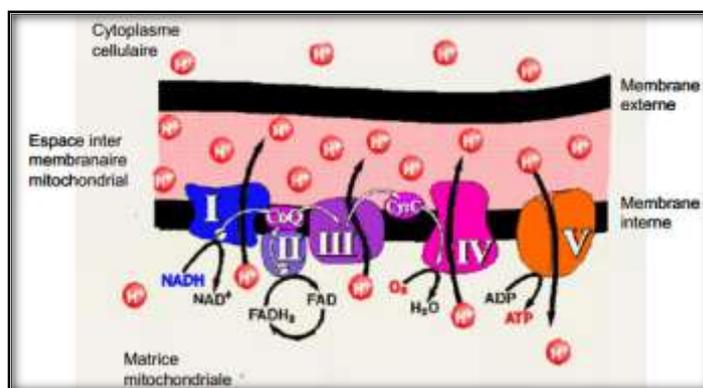


Figure.4. Respiration mitochondriale (**Andreyev et al., 2005**).

3.2. Les phagocytes

La phagocytose des bactéries et des parasites par les macrophages ou les polynucléaires s'accompagne d'une production d'ERO connue sous le nom d'explosion respiratoire (**Favier, 2003**). Au sein du phagosome, l'activation de la *NADPH* oxydase va donner lieu à la production de l'anion superoxyde (O₂^{-•}) qui sera dismuté en (H₂O₂) (voir figure 5) grâce l'action des superoxydes dismutases (SOD), le peroxyde d'hydrogène en présence de l'ion ferreux va former le radical hydroxyle (OH^{-•}) puissant agent oxydant (**Pasquier, 1995**).

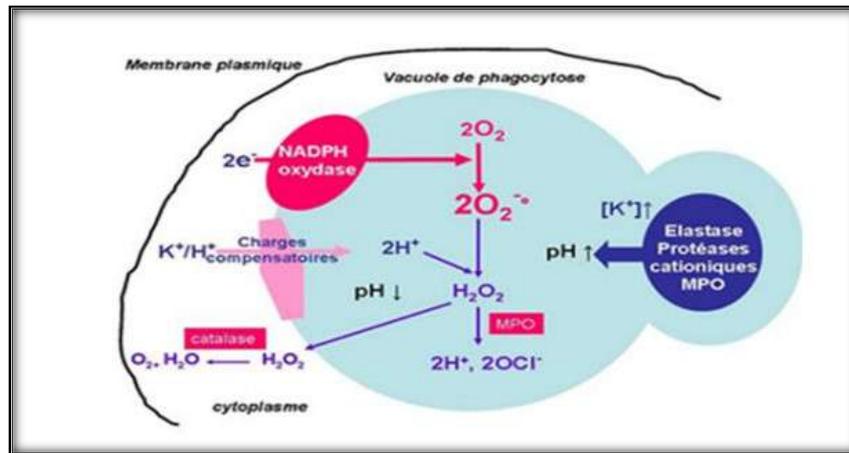


Figure.5. Métabolisme oxydatif du neutrophile (Reeves, 2002).

3.3. L'environnement

Des facteurs environnementaux peuvent contribuer à la formation d'entités radicalaires. Une production importante d'ERO est observée lors d'une intoxication par des métaux lourds (cadmium, mercure, arsenic) ou dans les phénomènes d'irradiations provoquant des dommages au niveau de l'ADN. Par ailleurs la fumée de tabac, l'alcool ou même certains médicaments (Xénobiotiques) peuvent être source de radicaux libres par oxydations de ces composés au niveau du cytochrome P450 (Favier, 2003).

4. Importance physiologique des espèces réactives de l'oxygène

Le paradoxe des radicaux libres c'est qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses, susceptibles d'engendrer un nombre considérable des maladies, tout en étant des espèces indispensables à la vie (Favier, 2003). Ils remplissent en effet de très nombreuses fonctions.

4.1. Défense immunitaire et « Burst Oxydatif »

Dans les leucocytes et notamment les polynucléaires neutrophiles (PN), les entités oxydantes participent très activement à la défense de l'organisme par leur action toxique notamment sur les bactéries par le phénomène de « burst oxydatif ». Dans un environnement inflammatoire, les (PN) sont attirés par des facteurs chimiotactiques et atteignent le lieu de l'infection. Ils phagocytent les microorganismes dans le phagosome qui fusionne avec les granules lysosomiales pour former le phagolysosome à l'intérieur duquel les particules infectieuses sont digérées. Cette activation des neutrophiles permet la libération des protéines cationiques, la lactoferrine et des enzymes hydrolytiques et protéolytiques, et implique l'isoforme phagocytaire de la *NADPH* oxydase, la

myéloperoxydase (MPO) et la (NOS). La *NADPH* oxydase relargue une grande quantité d'anions superoxydes qui sont ensuite dismutés en peroxyde d'hydrogène dans la fente du phagosome qui contient du chlorure à forte concentration. Ainsi, le peroxyde d'hydrogène et le chlorure vont être utilisés par la MPO pour former de l'acide hypochlorique (HOCl), qui peut réagir avec l'anion superoxyde pour former le radical hydroxyle, qui va exercer son attaque oxydante (**Serteyn, 2003**).

4.2. Messagers intra et extracellulaire

Les radicaux libres constituent par eux-mêmes un système de transmission des signaux, qui serait apparu très tôt dans la vie (**Favier, 2003**). Ils peuvent être considérés comme des messagers intra et extracellulaire car ils permettent d'induire des réponses cellulaires face à des nombreux stress. Ce qui conduit à l'expression des gènes de défenses (SOD à manganèse, catalase...). Ils participent aux cascades de signalisation intracellulaire dans des nombreuses cellules comme les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et le tissu thyroïdien (**Dröge, 2002**).

Les ERO participent à l'expression de certains gènes et à leur régulation. Cela leur confère un rôle important dans les phénomènes de croissance et de mort cellulaire. Les mécanismes de communication cellulaire faisant intervenir les radicaux libres ne sont pas encore compris (**Delattre et al., 2005**).

4.3. Régulation du tonus vasculaire

Le monoxyde d'azote NO, par stimulation de la guanylate cyclase soluble, permet la formation et l'augmentation de la concentration du GMPc dans le muscle lisse. Le GMPc active une série de protéines kinases, déclenchant ainsi une cascade de réaction qui aboutissent à une vasodilatation artérielle et veineuse (**Sabry et al., 1996**).

5. Conséquences du stress oxydant

5.1. Au niveau moléculaire

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes des molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides) (**Favier, 2003**).

5.1.1. L'oxydation des lipides

La peroxydation des lipides résulte de l'attaque par des radicaux libres des acides gras polyinsaturés (acide linoléique, linoléique, arachidonique). Cette réaction est à l'origine de dommage tissulaires responsables des cancers, des maladies inflammatoires du

vieillesse et des lésions vasculaires comme l'athérosclérose (**Raccach, 2004**). Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons (voir figure 6), pour former un radical diène conjugué, qui en présence d'oxygène va être oxydé en radical peroxyde (**Hennebelle et al, 2004**).

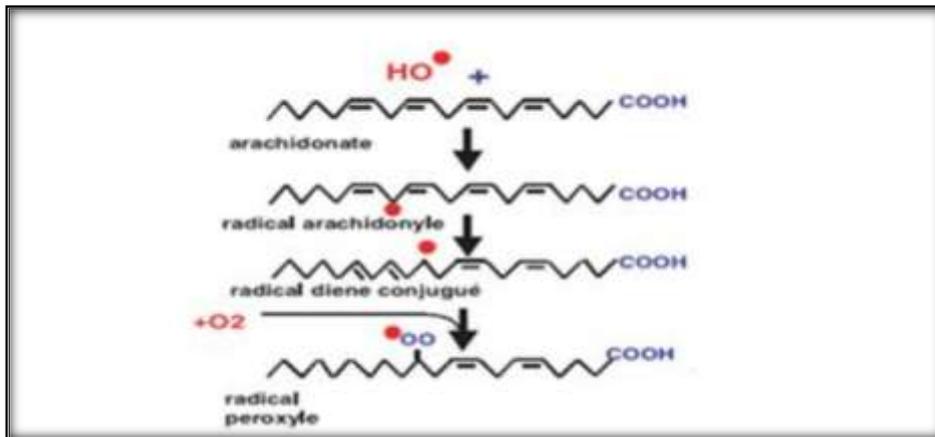


Figure.6. Initiation de la peroxydation lipidique (**Favier, 2003**).

Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne, car le radical peroxyde formé va s'attaquer à un acide gras voisin et se transformer en hydroperoxyde des tandis que le deuxième acide gras rentre dans le même circuit de peroxydation pour former un nouveau radical diène conjugué (voir Figure 7) qui sera oxydé par l'oxygène pour former le deuxième radical peroxyde qui s'attaquera au troisième acide gras conduisant à une réaction en chaine dite : propagation (**Favier, 2003**).

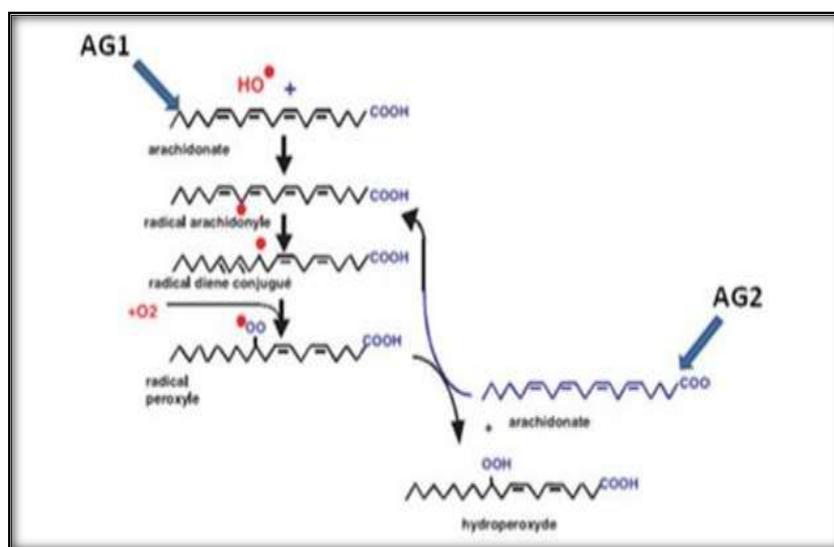


Figure.7. La propagation de la peroxydation lipidique à d'autres AGPI (**Favier, 2003**).

Une partie des hydroperoxydes formés va être réduite et neutralisée par le glutathion peroxydase. Les hydroperoxydes non réduits vont se décomposer facilement en différents produits, les plus étudiés sont les aldéhydes : malondialdéhyde (MDA), l'hydroxynonanal et les isoprostanes (voir Figure 8) (Therond, 2006). Le MDA fait partie des aldéhydes réactifs issus de la décomposition des hydroperoxydes. En raison de son caractère mutagène et athérogène, il est le produit le plus étudié de la dégradation des hydroperoxydes. Il est aussi impliqué dans l'initiation des cancers (Flourie, 2006).

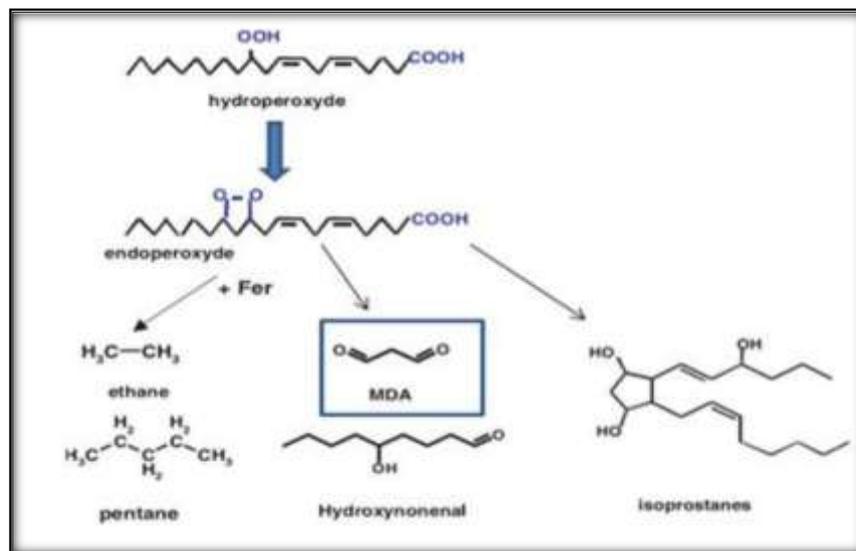


Figure.8. Produits terminaux de la peroxydation lipidique (Favier, 2003).

Cette attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes (oxydation des LDL) ou les phospholipides membranaires et elle est très dommageable pour les cellules tant au niveau de leur fonction que sur les propriétés de leurs membranes (Racciah, 2004).

5.1.2 Les Protéines

Les ERO sont, en effet, capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, altérant également leur fonction. L'oxydation de ces acides aminés conduit à une modification de la conformation spatiale (voir figure 9) et à une altération de la fonction protéique (perte de fonction catalytique, augmentation de la sensibilité aux protéases...). Les réactions d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques (Cu²⁺, Fe²⁺...) peuvent être classées en deux catégories: a) celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéiques, b) les modifications des peptides par l'addition des produits issus de la peroxydation lipidique. Les protéines oxydées perdent

leur capacité à se fixer correctement sur un récepteur ou à fixer spécifiquement un ligand, altérant la signalisation cellulaire (**Koechlin, 2006**).

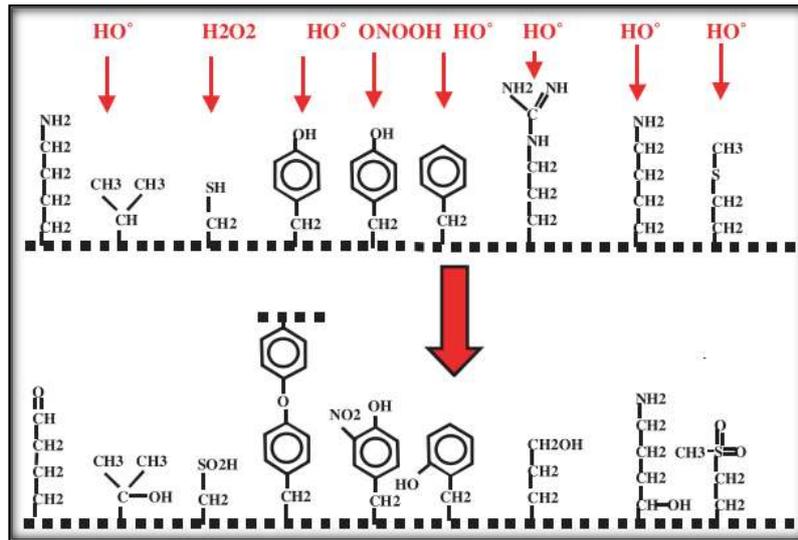


Figure.9. Nature de quelques modifications des chaînes latérales des protéines après attaque radicalaire (**Favier, 2003**).

5.1.3. Les Acides Nucléiques

Les radicaux $\text{O}_2^{\bullet-}$ et OH^\bullet provoquent des lésions de l'ADN. Ceux-ci peuvent interagir avec les désoxyriboses de l'ADN (voir figure 10), mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques (8 oxo guanine, 8 nitroguanine, formamidopyrimidine, 8 oxo adénine, formimidouracile,...). Les produits secondaires de la peroxydation des acides gras polyinsaturés tel que le MDA (aldéhydes mutagènes) peuvent interagir avec l'ADN et formé des adduits (MDA-guanine, éthénodérivés) (**Favier, 2003**). Ces altérations structurales, lorsqu'elles ne sont pas réparées entraînent à long terme des altérations géniques (**Koechlin, 2006**).

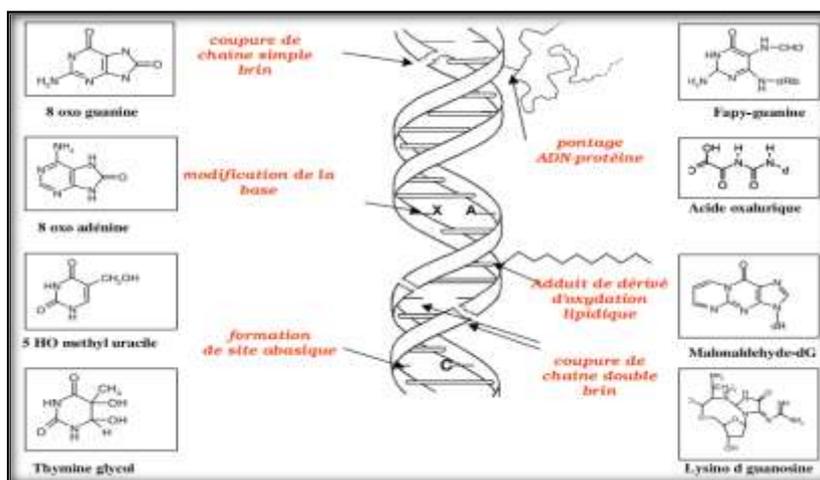


Figure.10. Types de lésions de l'ADN provoqués par les radicaux (Favier, 2003).

5.2. Les conséquences à long termes

Une production excessive chronique de radicaux libres accélère le vieillissement de l'organisme et favorise la survenue ou l'aggravation de nombreuses pathologies, surtout de type inflammatoire ou dégénératif. Voici une liste non exhaustive de maladies où le stress oxydatif joue un rôle indéniable : cancers, diabète, maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer), maladies de peau (vitiligo, psoriasis), maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (maladie de Crohn), maladies rhumatismales (arthrite rhumatoïde), maladies de l'œil (cataracte), maladies respiratoires (asthme), maladie cardio-vasculaires (athérosclérose) (voir figure 11). À ce jour, on relie plus d'une centaine de maladies à l'action néfaste des radicaux libres. Plus on avance en âge, plus les dommages causés par les radicaux libres deviennent apparents, évidents. Rides, taches brunes sur la peau, perte de mémoire, perte de vitalité, essoufflement rapide, raideurs articulaires, fibroses, scléroses, autant de manifestations de l'activité de plus en plus destructrice des radicaux libres (Le bail, 2009).

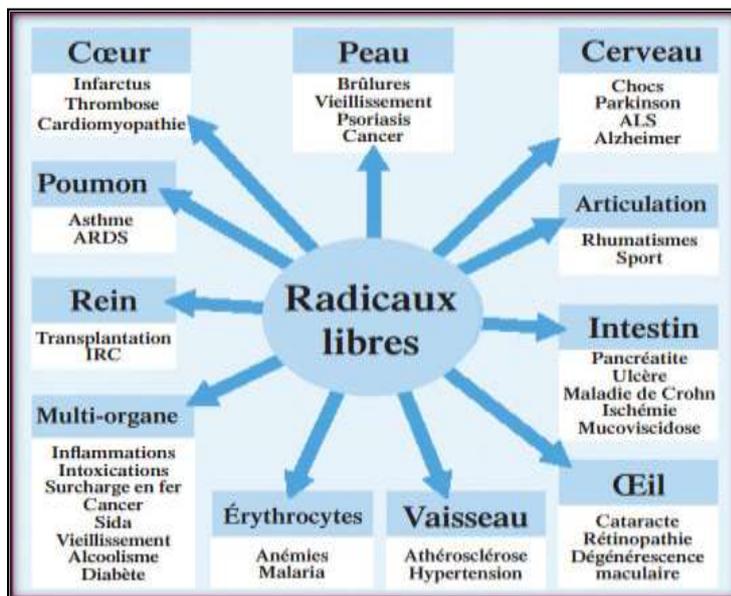


Figure.11. Principales pathologies s'accompagnant d'un stress oxydant (Favier, 1997).

6. Systèmes de défense antioxydant

Les cellules possèdent des mécanismes de défense enzymatiques et non enzymatiques, suffisent à renverser le stress oxydant, résultant du métabolisme aérobie, appelés antioxydants (Wassmann *et al.*, 2004). Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation des ces substrats (Droge, 2002).

La production des radicaux peut être régulée par l'organisme (voir Figure 12). Les systèmes de régulation se composent d'enzymes antioxydantes telles que les superoxydes dismutases, la catalase et plusieurs formes de peroxydases à glutathion, et les antioxydants non enzymatiques tels que la transferrine, l'albumine, la vitamine C, la vitamine E, le glutathion et l'acide urique (Krzystek *et al.*, 2011).

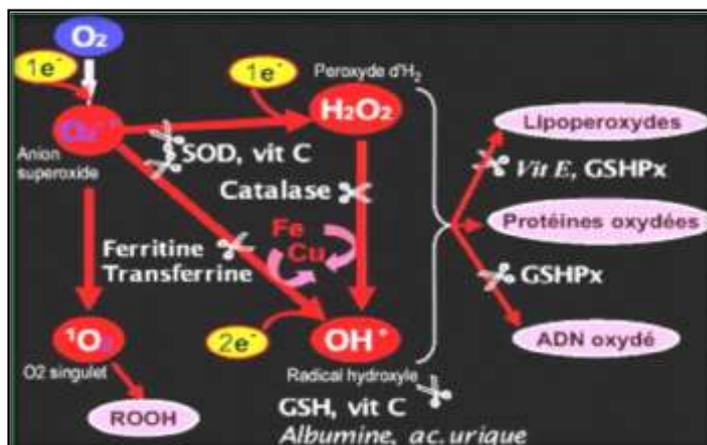


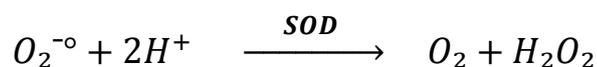
Figure.12. Neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (Berger, 2003).

6.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

Les enzymes existent à l'état endogène (cytoplasme, cytosol ou mitochondrie) et permettent de protéger les cellules contre les radicaux libres produits de manière physiologique au cours du métabolisme cellulaire.

6.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Le SOD est une métalloprotéine capable d'éliminer l'anion superoxyde par une action de dismutation. Cette réaction aboutit, à partir de deux superoxydes, à la formation d'une molécule d'oxygène et d'une molécule de peroxyde d'hydrogène (Garrel *et al.*, 2007).



6.1.2. Glutathion peroxydase (GSH-Px)

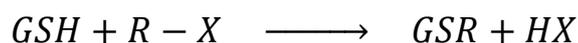
La glutathion peroxydase est une enzyme formée de quatre sous-unités contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine (Delattre *et al.*, 2007). La GSH-Px a un rôle important dans la réduction du H₂O₂ en présence de glutathion réduit (GSH) et protège ainsi les membranes et les protéines cellulaires contre le stress oxydatif (Schradler *et al.*, 2006). Cette enzyme a un rôle clé dans les systèmes de défense enzymatiques et réduit les peroxydes organiques en leurs alcools correspondants (Valko *et al.*, 2007).

6.1.3. Catalase

La catalase est une enzyme responsable de la détoxification du peroxyde d'hydrogène produit dans les conditions physiologiques. La catalase est une enzyme extrêmement active ; une seule molécule de cette enzyme est capable de décomposer plusieurs millions de molécules de peroxyde par minute (Nancy *et al.*, 2006). La catalase est surtout active lorsque le niveau du stress oxydant est élevé ou que la quantité de glutathion peroxydase est limitée (Niki *et al.*, 2007).

6.1.4. Glutathionne-S-transférase (GST)

Glutathion S-transférase est une famille des enzymes multifactorielles présentes chez tous les organismes (Renuka *et al.*, 2003). La glutathion-S-transférases (GST) est un système très important dans la protection de la cellule contre les espèces réactives de l'oxygène, par sa capacité de conjuguer le glutathion avec les composés électrophiles et la réduction des peroxydes (Gattás *et al.*, 2004). En plus de l'activité de conjugaison du GSH et la réduction des peroxydes, GST est associée avec d'autres processus biologiques. Quelques GST sont impliquées dans la modulation des canaux ioniques (Dulhunty *et al.*, 2001). L'activité de conjugaison du GSH avec les composés électrophiles est présentée comme suit:



6.1.5. Les thiorédoxines (TRx) et la thiorédoxines réductase (TRxR)

Les thiorédoxines sont des enzymes à activité antioxydante intrinsèque comme toutes les protéines à groupement thiol (-SH). Elles jouent aussi un rôle important dans la régulation du système immunitaire. Une fois oxydée, la thiorédoxine est réduite par la thiorédoxine réductase (TRxR) qui est une enzyme possédant un groupement sélénocystéine dans son site actif. La TRxR intervient aussi dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène et dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique (Hattori I *et al.*, 2003).

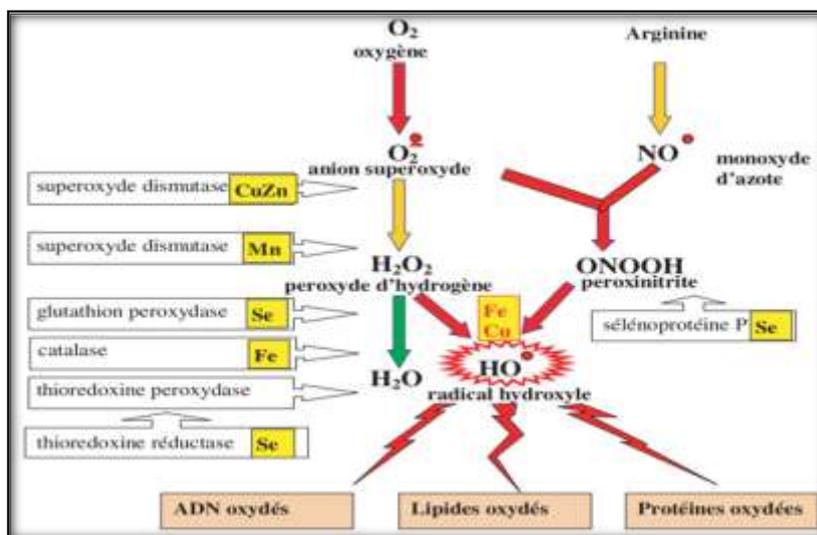


Figure.13. Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003).

6.2. Systèmes antioxydants endogènes non enzymatiques

6.2.1. Glutathion réduit (GSH)

Le glutathion (GSH) est un tri-peptide (acide glutamique-cystéine-glycine) connu par son puissant pouvoir antioxydant (Menon et al, 2007). C'est l'antioxydant le plus important dans le contrôle du statut redox (Biswas et al, 2006), qui protège non seulement contre les radicaux libres, mais aussi contre les peroxydes (Tang et al, 2006).

6.2.2. L'acide urique

L'acide urique comme produit final du métabolisme des purines, augmente dans le plasma lors d'efforts physiques intenses (Baillie et al, 2007). Il a été proposé comme un des meilleurs antioxydants du plasma *in vivo*, où il pourrait contribuer à 35-60% de la capacité antioxydante totale (Johnson et al., 2009). L'acide urique peut être oxydé en différents produits, puis régénéré par la vitamine C (Vasconcelos et al, 2007). Il subsiste certains doutes quant à une réelle fonctionnalité antioxydante de l'acide urique, dont l'augmentation peut aussi bien avoir des conséquences pro-oxydantes que antioxydantes (Gersch et al, 2009).

6.2.3. Les protéines de stockage des métaux de transition

Des protéines liant les métaux (transferrine, céruloplasmine, ferritin, etc.), l'albumine ou l'haptoglobine diminuent le taux des ions métalliques libres en conséquence, une diminution de leur pouvoir oxydant. A titre d'exemple, la réaction de Fenton entre le fer et

l'eau oxygénée ne se fait pas en absence du métal (**Lopez et al, 2005**).

6.3. Les molécules antioxydantes

6.3.1. La vitamine C

La vitamine C (ou acide ascorbique) n'est pas synthétisée par l'organisme. Elle empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase). Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle passe par une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée (**Chen et al, 2000**).

6.3.2. La vitamine E

La vitamine E est le nom commun utilisé pour toutes les molécules possédant des activités biologiques identiques à celles de la famille des tocophérols. La forme naturelle de la vitamine E inclut quatre tocophérols isomères α , β , γ , δ , avec une activité antioxydante variable. L'alphatocophérol (α -TocH) est la forme la plus active de la classe des tocophérols. Sa structure moléculaire comporte une extrémité hydrophile et une extrémité hydrophobe. Il est admis que les radicaux tocophéryles sont régénérés par l'acide ascorbique et que, sans cette synergie, les tocophérols sont inactifs. Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' α -TocH, connu comme inhibiteur de la propagation lipidique, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO_2 , et constitue par ce biais le seul antioxydant liposoluble assurant cette protection (**Khalil, 2002**).

6.3.3. Le sélénium

Le sélénium est un constituant de la glutathion peroxydase, enzyme qui joue un rôle intracellulaire antioxydant, voisin de celui de la vitamine E. Cet effet antioxydant est capital dans la détoxification des radicaux libres produits par le métabolisme cellulaire. Cet effet de détoxification serait responsable des effets anti-cancéreux et anti-vieillessement, attribués au sélénium (**Wolters et al., 2005**).

6.3.4. Le zinc

Cet oligo-élément est l'un des cofacteurs essentiels de la SOD. La prise du zinc conduit à long terme à l'induction des protéines antioxydantes comme les métallothionéines. Le zinc protège également les groupements thiols des protéines. il peut

aussi inhiber partiellement les réactions de formation d'espèces oxygénées induites par le fer ou le cuivre (**Mezzetti *et al.*, 1998**).

6.4. Les antioxydants d'origine végétale

6.4.1. Polyphénols

Les polyphénols végétaux regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. Ce sont des composés ubiquistes que l'on retrouve dans les plantes. Ils attirent l'attention depuis quelques années à cause de leurs propriétés antioxydantes. En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (**Delattre *et al.*, 2005**).

6.4.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des produits largement distribués dans le règne végétal et sont couramment consommés sous forme de fruits, légumes et boissons tel le thé. Ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, suggérant qu'ils pourraient exercer une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydantes. En effet les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif et ils sont également capables de chélater les ions métalliques oxydants (**Ghedira, 2005**).

1. Matériel biologique

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire d'établissement public hospitalier Ibn Zoher et du laboratoire de biochimie de l'université 08 mai 1945 (**Guelma**).

L'étude a été portée sur une population de 6 sujets diabétiques de type 1 ayant d'un âge compris entre [58 et 76 ans] et 7 sujets témoins [48 et 76 ans] sains de toutes pathologies pouvant entraîner des perturbations des paramètres étudiés. Le groupe des patients à un moyen d'âge d'évolution du diabète égale à 3ans.

Les renseignements ont été établis pour chacun des patients et des témoins. Ils comportent les données du sujet ; à savoir l'âge, l'âge d'évolution du diabète, ainsi que les données relatives au traitement antidiabétique.

1.1. Les prélèvements sanguins

Les échantillons sanguins ont été prélevés après 12 heures de jeûne dans des tubes secs et des tubes EDTA. Le sang prélevé (au niveau de la veine du coude) a été centrifugé à 3500 r.p.m pendant 10 min et le surnageant (sérum) a été conservé à 4C°.

1.2. Matériel non biologique (voire annexe 1)

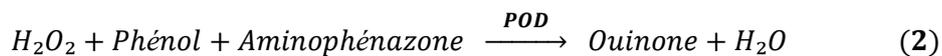
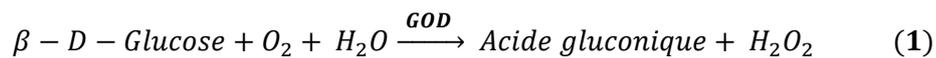
2. Méthodes

2.1. Evaluation de profil glycémique

2.1.1. Dosage du glucose plasmatique

Principe

Le dosage du glucose a été effectué selon la méthode de **Trinder (1969)**. Le glucose oxydase (**GOD**) catalyse l'oxydation du glucose en acide gluconique (réaction 1). Le peroxyde d'hydrogène (**H₂O₂**) généré au cours de cette réaction réagit avec le phénol et l'aminophénazone en présence de la peroxydase (**POD**) pour générer la quinone qui est un chromogène (réaction 2).



Méthode

1ml de la solution de travail est ajouté à 10 µl du plasma. Le mélange vortexé est incubé pendant 10 min à une température ambiante. La lecture de l'absorbance (A) est effectuée à $\lambda = 505$ nm contre le blanc réactif. La concentration (C) de l'échantillon en

glucose est calculée à partir de la formule suivante:

$$C = \frac{(A)_{\text{échantillon}}}{(A)_{\text{standard}}} \times (C \text{ standard})$$

C : le standard est une solution de glucose à 1g/l.

2.1.2. Détermination de l'hémoglobine glyquée (HbA1C)

Le dosage de l'HbA1C est réalisé par chromatographie échangeuse d'ions (**Bissé et al., 1985**). 50 µL de sang total est mélangé avec 200 µL d'un agent lysant contenant un détergent, du phosphate de potassium et de l'azide de sodium. 50 µL d'hémolysat sont déposés sur une résine échangeuse de cations. Toutes les hémoglobines se fixent sur la résine et un agent éluant est utilisé pour séparer l'HbA1C de la résine. La proportion d'HbA1C est donnée en pourcentage de l'hémoglobine totale contenue dans l'échantillon et ceci par le dosage de la fraction HbA1C et de l'hémoglobine totale, selon la formule suivante :

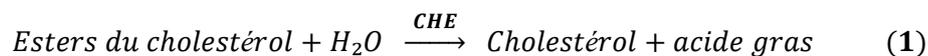
$$HbA1c \% = \frac{(A)_{HbA1c}}{3 \times (A)_{HbA1c \text{ total}}} \times 100$$

2.2. Evaluation du profil lipidique

2.2.1. Dosage du cholestérol plasmatique

Principe

Le dosage du cholestérol a été effectué selon la méthode **Kaplan et al., 1984**. Les esters du cholestérol sont dégradés en cholestérol et en acide gras sous l'action du cholestérol estérase (**CHE**; réaction 1). Le cholestérol est converti par le cholestérol oxydase (**CHOD**) en cholesténone et en peroxyde d'hydrogène (**H₂O₂** ; réaction 2). Ce dernier interagit avec le 4-aminophénazone et le phénol en présence de la peroxydase (**POD**) donnant naissance à la quinonémine de couleur rouge (réaction 3).



Méthode

1ml du réactif est ajouté à 10 µl du plasma puis vortexé. Le mélange est incubé pendant 10min à une température ambiante. La lecture de l'absorbance (A) est effectuée à $\lambda = 505$ nm contre le blanc réactif. La concentration (C) de l'échantillon en cholestérol est calculée à partir de la formule suivante:

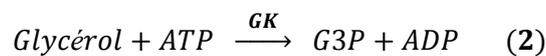
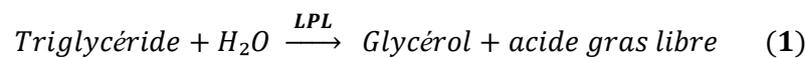
$$C = \frac{(A)_{\text{échantillon}}}{(A)_{\text{standard}}} \times (C \text{ standard})$$

C : le standard est une solution du cholestérol à 2 g/l.

2.2.2. Dosage des triglycérides plasmatiques

Principe

Le dosage des triglycérides a été réalisé selon la méthode **de Buccolo et al. (1973) et de Kaplan (1984)**. L'hydrolyse des triglycérides par la lipoprotéine lipase (**LPL**, réaction 1) libère le glycérol. Le glycérol est converti en glycérol-3-phosphate (**G3P**) par la glycérol kinase (**GK**; réaction 2), puis oxydé par le glycérol phosphate déshydrogénase (**GPO**) en dihydroxyacétone phosphate (**DAP**) et en peroxyde d'hydrogène (**H₂O₂**) (réaction 3). Ce dernier interagit avec le 4-aminophénazone (**4-AP**) et le p-chlorophénol en présence de la peroxydase (**POD**) pour générer un chromogène, la quinone (réaction 4).



Méthode

1ml du réactif est ajouté à 10 µl du sérum puis vortexé et incubé pendant 10 min à une température ambiante. La lecture de l'absorbance (A) est effectuée contre le blanc réactif à $\lambda = 505$ nm. La concentration (C) de l'échantillon en triglycérides est calculée à partir de la formule suivante:

$$C = \frac{(A)_{\text{échantillon}}}{(A)_{\text{standard}}} \times (C_{\text{standard}})$$

C : le standard est une solution des triglycérides à 2 g/l.

2.2.3. Dosage du cholestérol-HDL (C-HDL)

Le C-HDL a été déterminé par la même méthode que celle utilisée pour le cholestérol total après précipitation des lipoprotéines de faible densité (**LDL**) et de très faible densité (**VLDL**) par l'acide phosphotungstique en présence des ions magnésiums avec le surnageant contenant la fraction (**C-HDL**).

2.2.4. Détermination du cholestérol-LDL (C-LDL)

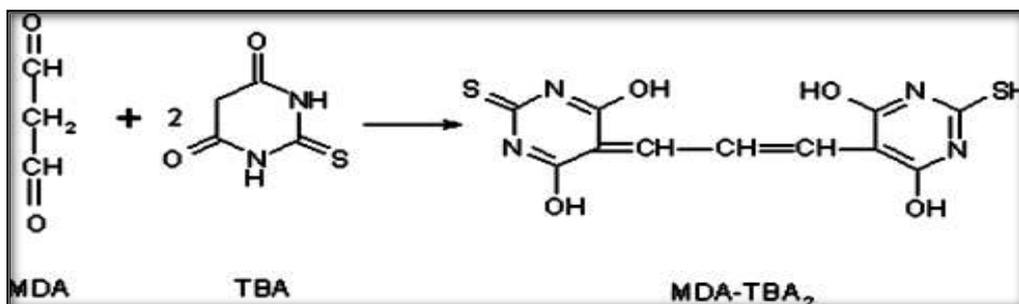
Le cholestérol LDL est déterminé à partir des taux du cholestérol total, du cholestérol HDL et des triglycérides par la formule modifiée de Friedwald :
 $C\text{-LDL} = \text{Chol total} - C\text{-HDL} - (\text{TG} / 5)$.

2.3. Evaluation des marqueurs biologiques du statut oxydant

2.3.1. Détermination de la peroxydation lipidique (MDA)

Principe

Le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés médiés par les radicaux libres, les taux du (**MDA**) évalués selon la méthode d'(**Ohkawa et al., 1979**). La concentration repose sur la formation en milieu acide et chaud (100 C°) entre le (**MDA**) et thiobarbituriques (**TBA**) d'un pigment coloré absorbant à une longueur d'onde $\lambda = 530 \text{ nm}$.



Réaction MDA-TBAR

Méthode

250 µl d'échantillon ont été ajoutés à un mélange constitué de : 250 µl TCA 20 % (1g de TCA dans 5 ml d'H₂O), 500 µl de l'acide TBA. Le mélange a été incubé au bain marie à 100 C° pendant 15 minutes, puis refroidir, ensuite 4 ml de n-butanol ont été ajoutés et le tout centrifugés à 3000 r.p.m pendant 15 minutes, l'absorbance du surnageant a été mesurée à une longueur d'onde de 532 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C \implies C = \frac{A}{\epsilon \cdot l}$$

A: l'absorbance, $\epsilon_{\text{TBARs/532nm}}$: coefficient d'extinction molaire = $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, l: le trajet spectral = 1cm.

2.4. Evaluation marqueurs biologiques de statut antioxydant

2.4.1. Dosage du glutathion réduit (GSH)

Principe

La méthode (**Sedlak et al 1968**) du dosage de glutathion est basée sur l'évaluation de la réduction du réactif d'Ellman par les groupes (SH) en formant l'acide 2-nitro-5-mercaptopbenzoïque ; ce dernier est caractérisé par une coloration intense, ce qui permet sa quantification spectrophotométrique à 412 nm.

Méthode

250 µl d'échantillon, ont été ajoutés à un mélange constitué de : 750 µl Tampon tris, 50 µl de réactif de (**DTNB**) et 3 ml de méthanol puis vortexé à quelques minutes et le tout incubé à 37 C° pendant 15 minutes, en suite centrifugé à 3000 tours/minutes pendant 15 minutes. La lecture de l'absorbance du surnageant effectuée à $\lambda = 412 \text{ nm}$ Contre le blanc réactif qui contient 250 µl EDTA, 750 µl de tampon tris, 50 µl de DNTP et méthanol. Les concentrations du (**GSH**) est obtenue grâce à une courbe de standard réalisée avec du GSH dans les mêmes conditions (Voire annexe 2).

2.4.2. Ferritine

Le principe du dosage de ferritine associe la méthode immuno-enzymatique par sandwich en premier étape à une détection finale en fluorescence (**ELFA**)

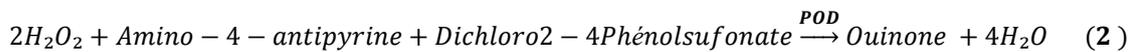
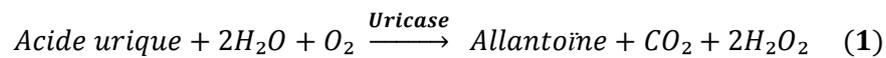
Toutes les étapes du test sont réalisées automatiquement par l'instrument minvidas.

2.4.3. Albumine

L'albumine présente dans l'échantillon donne après sa liaison avec le vert de bromocrésol, un complexe coloré quantifiable par spectrophotométrie. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'albumine présente dans l'échantillon. La lecture se fait à une longueur d'onde $\lambda = 630 \text{ nm}$.

2.4.4. Dosage de l'acide urique plasmatique

L'acide urique est un produit terminal majeur du métabolisme des purines. A pH physiologique, l'acide urique est essentiellement sous une forme ionisée d'urate, qui est un piègeur puissant de radicaux libres notamment OH° , ROO° et NOO° . Ainsi, l'acide urique constitue un antioxydant.



Méthode

1ml du réactif est ajouté à 25 μl du plasma. Le mélange est vortexé puis incubé pendant 5 min à 37 C°. La lecture de l'absorbance (A) est effectuée à $\lambda = 510 \text{ nm}$ contre un blanc réactif. La concentration (C) de l'échantillon en acide urique est calculée à partir de la formule suivante :

$$C = \frac{(A)\text{échantllion}}{(A)\text{standard}} \times (C \text{ standard})$$

C : le standard est une solution d'acide urique à 60 mg/l.

3. Analyse statistique

L'analyse des données a été effectuée à l'aide du logiciel SPSS version 19 dans le but de comparer les moyennes des paramètres étudiés pour chaque individu (contrôle et diabétique). En effet, nous avons recouru à l'utilisation du test **t de student** pour les échantillons non appariés ou indépendants.

1. Résultat de l'exploration glycémique

Les résultats de l'exploration glycémique sont regroupés dans le tableau (2) et la figure (14). On constate chez les diabétiques (DID) par rapport aux témoins une augmentation significative dans les concentrations de la glycémie ainsi que dans les pourcentages d'hémoglobine glyquée.

Tableau.2. L'évaluation des paramètres glycémiques chez les diabétiques (DID) et les témoins.

	Diabétiques (n=6)	Témoins (n=7)	Signification
Glycémie (g/l)	1,60 ± 0,61 ^a	0,92 ± 0,11 ^b	S (p <0,05)
HbA1C (%)	6,66 ± 1,78 ^a	5,11 ± 0,63 ^b	S (p <0,05)

Pour chaque paramètre, les valeurs portant les mêmes lettres sont statistiquement égales (**absence d'effet significatif**) ou (N.S.).

Pour chaque paramètre, les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes (**présence d'effet significatif**) ou (S).

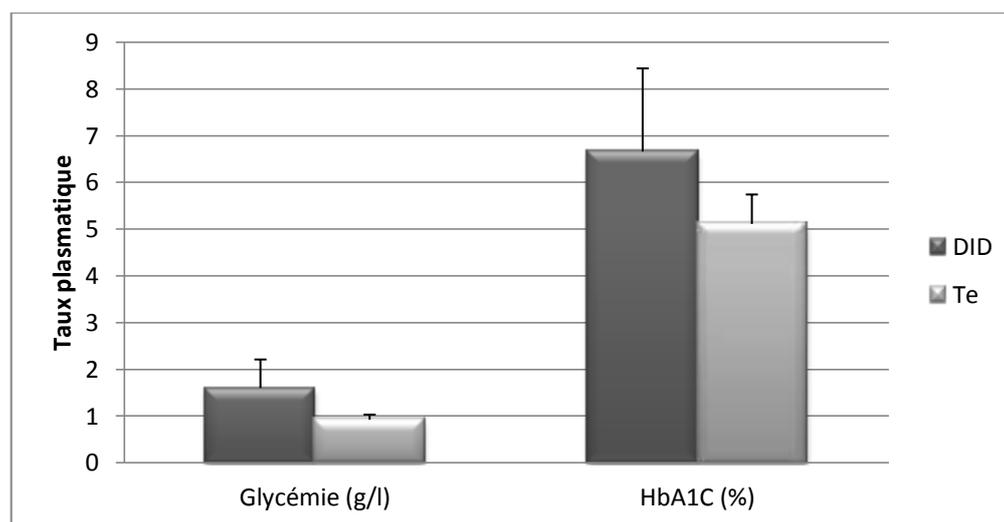


Figure.14. Taux de glycémie et HbA1C chez les diabétiques de type 1 et les témoins.

2. Résultat d'exploration lipidique

Les résultats de l'analyse statistique de la variation du bilan lipidique des deux groupes sont regroupés dans le tableau (3) et la figure (15). L'étude s'est révélée statistiquement non différente.

Tableau. 3. l'évaluation des paramètres lipidiques chez la population étudiée.

	Diabétique (n=6)	Témoins (n=7)	Signification
Cholestérol (g/l)	1,35 ^a ± 0,13	1,72 ^a ± 0,25	NS (p = 0.262 >0,05)
Triglyceride (g/l)	1,63 ± 0,86 ^a	1,70 ± 1,10 ^a	NS (p = 0.555 >0,05)
C-HDL (g/l)	0,35 ± 0,000 ^a	0,38 ± 0,13 ^a	NS (p = 0.127 >0,05)
C-LDL (g/l)	0,631 ± 0,47 ^a	1,00 ± 0,31 ^a	NS (p = 0.269 >0,05)

Pour chaque paramètre, les valeurs portant les mêmes lettres sont statistiquement égales (*absence d'effet significatif*) ou (N.S.).

Pour chaque paramètre, les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes (*présence d'effet significatif*) ou (S).

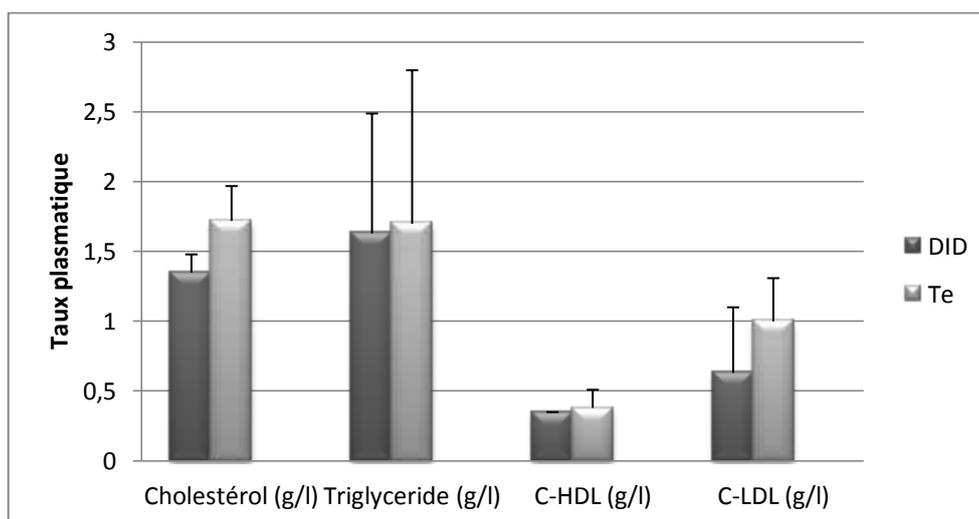


Figure.15. Taux des paramètres lipidiques chez les diabétiques et les témoins.

3. Résultat d'exploration du statut oxydant

Les résultats de l'exploration du paramètre du statut oxydant sont regroupés dans le tableau (4) et la figure (16). On observe une légère augmentation statistiquement insignifiante des produits terminaux de la peroxydation lipidique (TBAR) chez les diabétiques DID comparés aux témoins.

Tableau.4. l'évaluation du paramètre du statut oxydant (MDA) chez les DID et les témoins.

	Diabétique (n=6)	Témoins (n=7)	Signification
MDA (µmol/l)	3.3 × 10 ⁻³ ± 0,000 ^b	3.2 × 10 ⁻³ ± 0,000 ^b	NS (p = 0.585 >0,05)

Pour chaque paramètre, les valeurs portant les mêmes lettres sont statistiquement égales (**absence d'effet significatif**) ou (N.S.).

Pour chaque paramètre, les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes (**présence d'effet significatif**) ou (S).

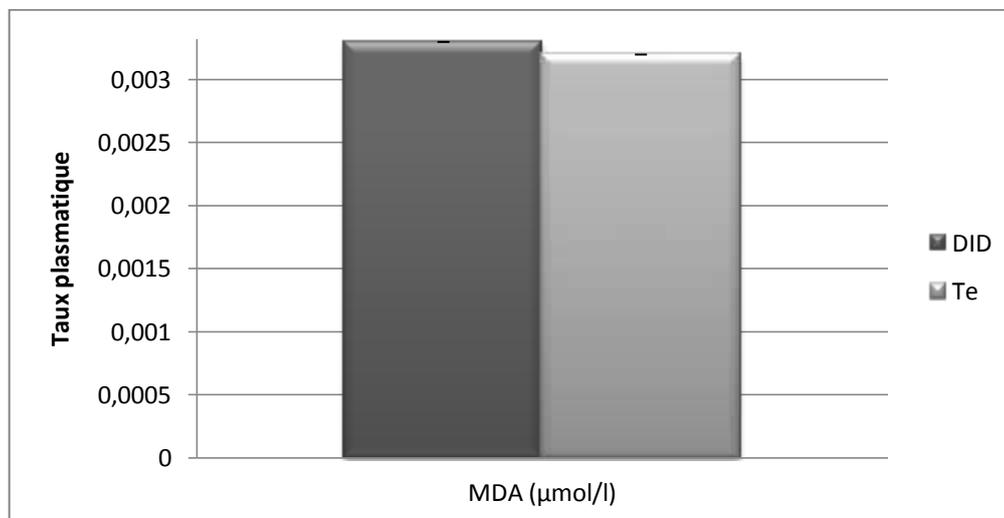


Figure.16. Taux de MDA chez les diabétiques de type 1 et les témoins.

4. Résultat d'exploration du statut anti-oxydant

Les résultats de l'exploration du statut anti-oxydant sont regroupés dans le tableau (5) et la figure (17,18). Les résultats des sujets diabétiques DID qui ont montré un taux d'albumine et d'acide urique plasmatique similaire à celui des témoins, avec une infime variation du taux GSH, cependant une augmentation du taux de la protéine de stockage du fer (Ferritine) chez les diabétiques DID, mais tout ces résultats restent non significatifs.

Tableau.5. l'évaluation des paramètres du statut anti-oxydant chez les patients diabétiques DID et les témoins.

	Diabétique (n=6)	Témoins (n=7)	Signification
GSH (µmol/l)	1.19×10 ⁻³ ± 0,000 ^a	0.93×10 ⁻³ ±0,000 ^a	NS (p = 0.723 >0,05)
Ferritine (ng/ml)	101,88 ± 84,96 ^a	58,78± 35,24 ^a	NS (p = 0.130 > 0,05)
Albumine (g/l)	45,33 ± 2,33 ^a	46,00 ± 2,64 ^a	NS (p = 0.432 >0,05)
Acide urique (mg/l)	55,06 ± 9,85 ^a	51,54 ± 14,24 ^a	NS (p = 0.438 >0,05)

Pour chaque paramètre, les valeurs portant les mêmes lettres sont statistiquement égales (**absence d'effet significatif**) ou (N.S.).

Pour chaque paramètre, les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes (présence d'effet significatif) ou (S).

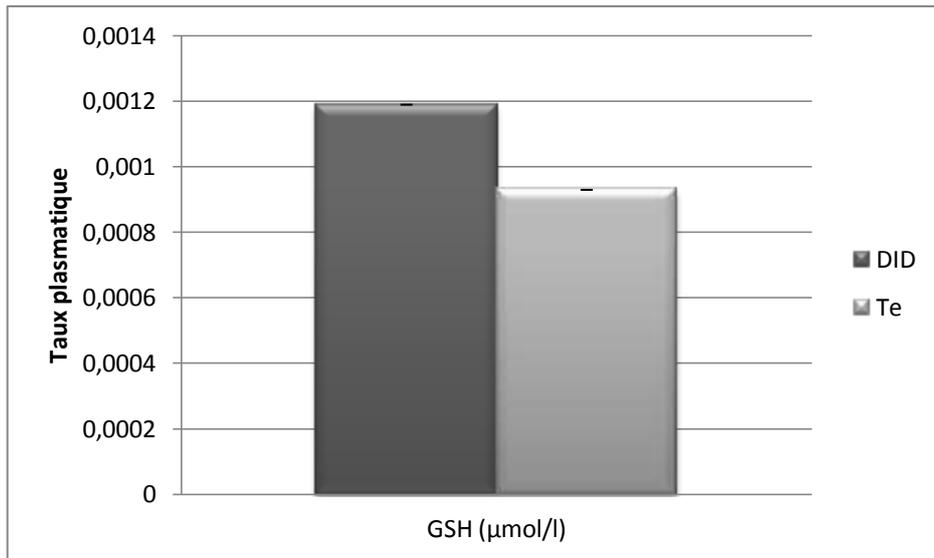


Figure.17. Taux de GSH chez les diabétiques et les témoins.

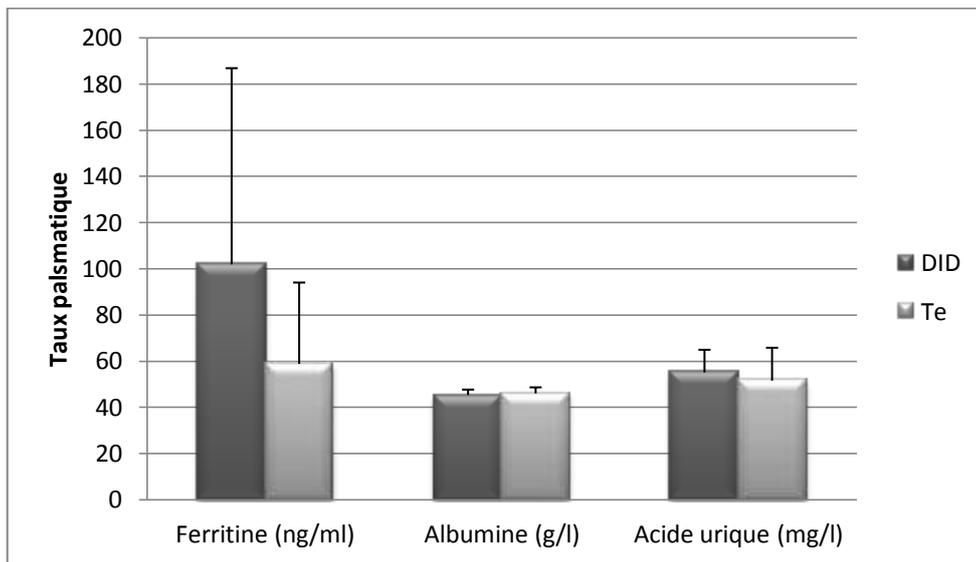


Figure.18. Taux de la ferritine, l'albumine et l'acide urique chez diabétiques et les témoins.

Discussion

Le diabète sucré est une maladie métabolique dont la caractéristique principale est une hyperglycémie résultant d'un défaut de sécrétion, d'action de l'insuline ou de ces deux anomalies associées (**Sharma et al., 2008**).

Un mauvais équilibre du diabète est responsable de l'apparition de complications liée à cette pathologie. Cette instabilité glycémique et l'hyperglycémie chronique qui est associée, favorisent le développement du stress oxydatif.

En effet, diverse études ont mis en évidence une élévation des marqueurs du stress oxydant en mesurant notamment les marqueurs de la peroxydation lipidiques et une diminution du système de défense antioxydant chez les diabétiques de type 1, de type 2 et dans le diabète expérimental (**Bonnefont et al., 2000**).

C'est dans cette optique, que le présent travail a été réalisé ; où nous avons tenté d'évaluer l'éventuel statut oxydant chez des participants devenus insulino-dépendants depuis 3 ans par l'exploration du bilan glycémique, lipidique et la variation du statut oxydant et antioxydant.

Les résultats de la glycémie à jeun était significativement élevée ($p < 0,05$) chez les DID comparant au groupe contrôle. Ceci peut s'expliquer par une augmentation de la néoglucogénèse hépatique pendant la nuit (**Orban et al., 2008**) ou alors par une alimentation trop riche au cours du dîner. Plusieurs auteurs suggèrent que l'hyperglycémie est la manifestation clinique clé du diabète sucré. L'augmentation du niveau de glucose peut induire un stress oxydatif par l'intermédiaire de la formation des ERO. Il existe de nombreuses voies par lesquelles l'hyperglycémie peut augmenter la production des ERO, tels que l'autoxydation de glucose, la voie des polyols, la glycation des protéines et la formation des produits de glycation avancés (**Prakasam et al., 2005**).

Par ailleurs, la glycation des protéines joue un rôle important dans la survenue des complications diabétiques. Elle résulte de la formation d'une liaison covalente entre la fonction aldéhydique du glucose et les groupements amines libres des protéines (fonction amine N terminale et/ou fonction amine de la chaîne latérale des lysines). Cette liaison donne naissance à des produits dits d'Amadori qui présentent la particularité de posséder un groupement cétole (fonction cétole et fonction alcool secondaire portées par deux

carbones contigus). Cette fonction peut, en présence de métaux de transition, céder un électron à l'oxygène moléculaire, conduisant à la formation d'anions superoxyde (**Delattre et al., 2001**).

Concernant la présente étude, les concentrations d'hémoglobine glyquée (HbA1c) ont noté une augmentation significativement ($p < 0.05$) chez les diabétiques par rapport aux témoins et ceci est en concordance avec les résultats trouvés par Vadde et coll. (2007) dans leur étude portant sur l'évaluation du stress oxydatif chez les insulinodépendants. Ce résultat témoigne d'une glycémie mal équilibrée durant les deux derniers mois. Il est nécessaire de noter que l'hémoglobine glyquée HbA1c, est le produit de la fixation du glucose sérique en excès sur l'extrémité N-terminale des chaînes β de l'hémoglobine A1 selon une réaction non enzymatique. Le taux d'HbA1C est donc proportionnel à l'importance de la glycémie et reflète ainsi l'équilibre glycémique (**Edeas et al., 2010**).

Ainsi, les valeurs de la glycémie à jeun et de l'HbA1c reflètent un mauvais équilibre glycémique chez les DID. Ce déséquilibre peut être dû à la diminution des mesures hygiéno-diététiques et l'éducation thérapeutique.

Lors d'un diabète, l'hypoinsulinémie augmente l'activité de l'enzyme Fatty acyl coenzyme A oxydase, qui initie la β oxydation lipidique des acides gras ce qui provoque une augmentation de la peroxydation lipidique (**Sivajothi et al., 2008**). Cette dernière représente l'une des caractéristiques du diabète chronique et les dommages tissulaires médiés par les peroxydes ont été observés dans le développement du diabète de type 1 et 2 (**Venkateswaran et al., 2003**).

Il est donc admis que, la mesure des produits de la peroxydation lipidique peut refléter le degré du stress oxydant d'un individu (**Limaye et al., 2003**). D'autre par la mesure des radicaux libres est difficile à cause de leur haute réactivité, de leur demi-vie extrêmement courte et de leur très faible concentration. C'est la raison pour laquelle on fait appel à des marqueurs indirects qui permettent d'évaluer les produits secondaires de la peroxydation lipidique comme les substances aldéhydiques (MDA) réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBAR).

Cependant, les concentrations sériques des TBARS n'ont présenté aucune différence significative ($p > 0.05$) chez les participants de cette étude. Wan-Ting *et al.*, (2006) ont montré que les diabétiques de type 2 avaient des taux sériques en TBARS

significativement plus élevés que les diabétiques de type 1 ayant un bon contrôle de l'équilibre glycémique.

L'élévation de la concentration de glucose peut aussi, déprimer le mécanisme de défense antioxydante endogène tel que le glutathion réduit (**Yoshida et Kondo, 1998**). Ce dernier joue un rôle multifactoriel dans le mécanisme de défense antioxydant (**Sathishsekar et al., 2005**). C'est un piègeur direct des radicaux libres, un cosubstrat nécessaire pour l'activité GPx et la GST (**Ravi et al., 2005**) et participe dans la régénération de la vitamine E oxydée. Par conséquent, les changements dans l'état redox du GSH peuvent être considérés comme un indicateur particulièrement sensible du stress oxydant (**Taleb et al., 2009**).

L'analyse statistique du paramètre glutathion réduit de nos sujets diabétiques ne présente pas de variation significative par rapport aux sujets témoins. Ceci s'explique par un apport alimentaire riche en sélénium du fait de la particularité et la richesse des terrains algériens d'agriculture. Ces résultats sont similaires à ceux reportés par Wan Ting et coauteurs qui, en 2006, ont étudié l'effet de la durée d'évolution du diabète et le contrôle de la glycémie sur la production des radicaux libres chez les enfants atteints de diabète de type 1.

En ce qui concerne la variation des taux sanguins de la ferritine, l'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative entre les deux groupes. En effet, la ferritine représente le site majeur de stockage du fer intracellulaire non métabolisé et joue en conséquence un rôle primordial en régulant la disponibilité du fer libre qui est l'agent catalyseur des réactions conduisant à la formation d'espèces oxygénées activées. Plusieurs études ont montré qu'une augmentation des taux de ferritine (notamment au niveau de la peau) constituait une réponse adaptative au stress oxydant (**Applegate et al., 1998**).

D'autre part, aucune variation dans la concentration de l'albumine n'a été signalée chez les participants de cette étude. Renforçant ainsi les résultats cités précédemment de l'absence du statut oxydant chez les mêmes individus. En effet, l'albumine est considéré comme un antioxydant circulant. De nombreuses études suggèrent qu'en présence d'une hypoalbuminémie, l'administration d'albumine pourrait avoir des effets bénéfiques sur la dysfonction de certains organes, mais les mécanismes exacts restent encore flous (**Tamion et al., 2010**).

L'acide urique, aussi considéré comme étant l'un des plus importants antioxydants plasmatiques, capable d'éliminer jusqu'à 60% des radicaux libres particulièrement avec le radical hydroxyle (**Madero et al., 2009**), n'a démontré aucune différence significatives dans ces taux chez les insulinodépendants.

En résumé, les résultats du statut antioxydant, ont montrés qu'il n'y a pas de différences significatives entre les moyennes des paramètres étudiés des individus diabétiques et non-diabétiques. Ces divergences dans les résultats trouvés et ceux reportés par la bibliographie ne pourraient être expliqué que par l'âge d'évolution de la maladie (3 ans) et de la taille de la population relativement étroite (n=13).

Le diabète est lié à l'hyperlipidémie et provoque de profondes perturbations dans la teneur et la composition des lipides sériques. Ces anomalies représentent un important facteur de risque des maladies cardiovasculaires. Par ailleurs, il a été indiqué que l'implication du stress oxydant dans les pathologies cardiovasculaires est initialement révélée par l'oxydation des lipoprotéines de basses densités, les LDL, dont la modification biochimique qui en résultait leur conférait un pouvoir athérogène (**Sebbagh et al., 2007**).

De nombreux travaux ont eu pour but de rechercher si les lipoprotéines de basse densité (LDL) isolées du sérum de patients diabétiques présentaient, comparativement aux LDL de sujets normoglycémiques une sensibilité accrue à l'oxydation *in vitro*. Les données de la littérature sont assez contradictoires. Certains auteurs rapportent une oxydabilité accrue des LDL *in vitro* à la fois dans le diabète de type 1 et de type 2 (**Beaudeau et al., 1995**). Cependant, d'autres études n'ont pas confirmé ces observations puisqu'elles décrivent une oxydabilité des LDL soit inchangée (**Gugliucci et al., 1994**) soit diminuée (**Taus et al., 1992**). C'est le cas du présent travail, en effet le résultat du bilan lipidique n'était pas significativement différent chez la population étudiée. L'explication est décrite par Eddouks et coll., (2005) dans leur étude portant sur l'activité hypolipidémique de l'extrait aqueux de Capparis spinosa chez les rats normaux et diabétiques ou ils reportent que l'insuline est dotée d'une action inhibitrice sur 3-hydroxy-3-méthyle-glutaryl coenzyme A réductase (HMG-COA réductase), une enzyme clé pour la biosynthèse du cholestérol. D'autre part, le glucagon, la catécholamine ainsi que d'autres hormones augmentent la lipolyse. A cette explication s'ajoute les bons choix alimentaires et le régime diététique adéquat suivi par les malades qui réduit le risque de l'hyperlipidémie.

Les lipoprotéines de haute densité (HDL), traditionnellement reconnues comme protectrices vis-à-vis du risque athéromateux, peuvent également subir des modifications oxydatives, produisant aussi des effets délétères. De façon plus générale, les HDL oxydées présentent une diminution de leur capacité à promouvoir l'efflux du cholestérol cellulaire et une altération de leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Comme pour les LDL, il est très probable que l'oxydation *in vivo* des HDL a lieu dans le liquide interstitiel au niveau des sites d'inflammation et non au niveau systémique (**Van Lenten *et al.*, 2001**).

Conclusion et perspectives

Le diabète est une pathologie grave qui est étroitement liée à un éventuel développement d'un statut oxydant. Ce concept de « stress oxydant » décrit une situation dans laquelle la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques, situation très impliquée dans le développement des différentes complications liées à cette maladie.

Le but de ce travail était de chercher un statut oxydatif de sujets récemment devenus insulinodépendants par l'exploration du bilan glycémique, lipidique et la mesure des marqueurs oxydants et antioxydants.

A l'issue de cette étude, bien que les participants diabétiques montrent une glycémie mal contrôlée cette dernière n'a pas eu d'effet négatif sur les autres paramètres. Ce qui nous amène à élaborer une conclusion plus au moins réconfortante: **un diabète de durée d'évolution courte est encore contrôlable.**

De plus larges échantillons collectés à partir de populations diabétiques impliqués dans des études visant à comparer l'état oxydatif apparu à moyen et long terme sont nécessaires afin de vérifier l'hypothèse liant la surproduction des radicaux libres et l'ancienneté du diabète.

L'introduction des méthodes spécifiques et sensibles mais adaptées pour des dosages de routine permettra aux laboratoires d'analyses de proposer au monde médical une large batterie de tests permettant d'évaluer le statut antioxydant d'un individu. Ceci permettra de déceler la présence éventuelle d'un déficit en antioxydants et de le corriger avec un apport complémentaire approprié.

Références bibliographiques

- American Diabetes Association, Standards of Medical Care in Diabetes, 2009
Diabetes Care; 32(SUPP1):S13-49.
- Andresen M, Regueira T, Bruhn, 2008, Lipoperoxidation and protein oxidative damage exhibit different kinetics during septic shock, *Mediators Inflamm*, 168652.
- Andreyev AY, Kushnareva YE, and Starkov A A, 2005, Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species, *Biochemistry (Mosc)*, 70; 200-14.
- Applegate LA, Scaletta C, Panizzon R and Frenk E. Evidence that ferritin is UV inducible in human skin : part of a putative defense mechanism. *J Invest Dermatol* 111:159-163, 1998
- Atalay M, Laaksonen D E, 2002, Diabetes, oxidative stress and physical exercise. *Journal of Sport Science & Medicine* 1; 1-14.
- Auberval N, 2010, prévention du stress oxydant dans le diabète et ses complications par des antioxydants d'origine naturelle, thèse de doctorat, université de Strasbourg ; 31-33.
- Azzi A, 2007, Oxidative stress: a dead end or a laboratory hypothesis? *Biochem Biophys Res Commun*, 362; 230-2.
- Baillie JK, Bates MGD, Thompson AAR, Waring WS, Partridge RW, Schnopp MF, Simpson A, Gulliver-Sloan F, Maxwell SRJ, Webb DJ, 2007, Lowland Subjects Exposed to High Altitude Plasma Antioxidant Capacity in Healthy Endogenous, Urate Production Augments, *Chest*, 131; 1473-8.
- Beaudeau JL, Peynet J, Bonnefont-Rousselot, Therond P, Delattre J, Legrand J, 2006, Stress oxydant Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, *Ann Pharm, Fr*, 64; 373-38.
- Beaudeau JL, Guillausseau PJ, Peynet J, 1995 Enhanced susceptibility of low-density lipoprotein to *in vitro* oxidation in type 1 and type 2 diabetic patients, *Clin Chim Acta*, 239; 131-41.
- Benghida S, Bessaklia Z, Boukhedenna M, 2007, les maladies mitochondriales et diabète sucré, mémoire de master, Guelma ; 24-25.
- Berger. R, 2003, Incorporating Nature into therapy: A framework for practice, *Journal of systemic therapies*, 25(2); 80-94.

- Bissé E, 1985, Abraham EC. New less temperature-sensitive microchromatographic method for the separation and quantitation of glycosylated hemoglobins using a non-cyanide buffer system. *J Chromatog*, 344; 81-91.
- Biswas S, Chida AS, Rahman I, 2006, Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. *Biochem. Pharmacol*, 71(5); 551-64.
- Bonnefont-Rousselot D, Beaudoux JL, Thérond P, Peynet J, Legrand A, Delattre J, 2008, Diabète sucré, stress oxydant et produits de glycation avancée. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 62(3); 147-157.
- Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J (2000). Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes et Metabolism (Paris)*, 26: 163-176.
- Buccolo G, 1973, Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes, *Clin Chem*; 19 (5): 476-482.
- Carine A, 2006, Les lésions des acides nucléiques : détection par CLHP-SM/SM dans les milieux biologiques humains et intérêt comme biomarqueurs du stress, oxydant et de l'inflammation. thèse doctorat ,GRENOBLE ;18.
- Carreras M, 2004, Etat pro/antioxydant en relation avec le métabolisme lipidique dans les plaquettes sanguines lors du diabète, mémoire du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes; 36-39.
- Carrière A, Galinier A, Fernandez Y, Carmona MC, Pénicaud L, Casteilla L, 2006, Les espèces actives de l'oxygène: le yin et le yang de la mitochondrie, médecine sciences. Vol. 22, n° 1; 47-53.
- Chapel H, Haeney M, Misbah S et Snowden N, 2004, immunologie clinique, de Boeck Paris ; 374-281.
- Chatenoud L et, Bach J-F, 2012, Immunologie 6^e édition, édition Lavoisier, paris; 325-344.
- Chen K, Suh J, Carr AC, Morrow JD, Zeind J, Frei B, 2000, Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol 279(6); 1406-141.
- Cho SY, Park JY, Park EM, Choi MS, Lee MK, Jeon SM, Jang MK, Kim Mj, Park YB, 2002, Alternation of hepatic antioxidant enzyme activities and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats by supplementation of dandelion water extract. *Clinica Chimica Acta*, 317; 109 - 117.
- Delattre J. , Gardes M. , Jore D., 2001, Stress oxydant et diabète sucré, *Journal de la Société de biologie*, vol. 195, n°4 ; 375-376.

- Delattre J, Durand G, et Jardillier J-C, 2003, Biochimie pathologique : Aspects moléculaires et cellulaires, Flammarion Médecine-Sciences, Paris; 188-189.
- Delattre J, Beaudoux JL, Bonnefont-Rousselot, 2005, Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales Paris; 1 - 405.
- Dröge W, 2002, Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev*, 82(1):47-95.
- Dulhunty A, Gage P, Curtis S, Chelvanayagam G, Board P, 2001, The glutathione structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator, *J Biol Chem*, Vol 276;3319-3323.
- Edeas M, Attaf D, Mailfert A S, Nasu M, Joubet R, 2010, Maillard Reaction, mitochondria and oxidative stress: Potential role of antioxidants. *Pathologie Biologie*, 58; 220-225.
- Eddouks M, Lemhadri A, Michel JB, 2005, Hypolipidemic activity of aqueous extract of Capparis spinosa L. in normal and diabetic rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 98:345 – 350
- Favier A, Goudable J, 1997, Radicaux libres oxygénés et antioxydants, *Nutr Clin Métabol*, 11; 115-20.
- Favier A, 2003, Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, *l'actualité chimique*; 108- 115.
- Flourie F, Arab K, Rossary A , Steghens JP, 2006, Effets de différents antioxydants sur la lipoperoxydation in vitro initiée par le radical °OH, *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 21; 229–233
- Gardès-Albert M, Bonne font-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D, 2003, Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?, *L'actualité chimique* ; 91-95.
- Garrel C, Ceballos-Picot I, Germain G, Al-Gubory K H, 2007, Oxidative stress inducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F2alpha-induced luteal cell death in vivo *Free Radical Research*, 41; 251-59.
- Gattas G.J, Kato, M. Soares Vieira, J.A. Siraque, M.S. Kohler, P. Gomes, L. Rego, M.A. Bydlowski SP, 2004, Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population, *Braz J Med Biol Res*, Vol 337; 451-458.
- Gersch C, Palii SP, Imaram W, Kim KM, Karumanchi SA, Angerhofer A, Johnson RJ, 2009, Henderson GN, Reactions of peroxynitrite with uric acid of reactive

- intermediates, alkylated products and triuret, and in vivo production of triuret under conditions of oxidative stress, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 28; 118-149.
- Ghedira K., 2005. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique, *Phytothérapie Numéro 4*: 162-169.
- Gomes V-A, Casella-Filho A, Chagas AC, Tanus-Santos JE, 2008, Enhanced concentrations of relevant markers of nitric oxide formation after exercise training in patients with metabolic syndrome, *Nitric Oxide*, 19; 345–50.
- Grimaldi A, 2000, *Diabétologie Questions INTERNAT*, Université Pierre et Marie Curie; 142-12.
- Gugliucci A, Menini T, Stahl AJC, 1994, Susceptibility to copper-enhanced autoxidation of VLDL + LDL fractions from diabetic patients. *Biochem Mol Biol Int*, 32; 139-47.
- Halliwell B, 1997, Antioxidants and human disease: a general introduction, *Nutr Rev Vol 55*: 44-49.
- Hamadi N, 2010, Effet du resveratrol sur les défenses antioxydantes chez les rats rendus diabétiques par l'injection de la streptozotocine, Thèse de magistère en biologie cellulaire et moléculaire, Université Mentouri Constantine; 03.
- Hattori I, Nakamura H, Masutai H, 2003, Thioedoxin-dependent redox regulation-implication in aging and neurological diseases, Critical review of oxidative stress and aging. RG Cutler and H Rodriguez Eds. World Scientific. Vol II; 87-101.
- Heinecke JW, 1997, Mechanism of oxidative damage of low-density lipoprotein in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 8; 268-74
- Hennebelle T, Sahpaz T, Bailleul F, 2004, Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif, *Phytothérapie*, N 1; 3-6
- Januel C, 2003, Stress oxydant au niveau des plaquettes sanguines humaines dans le contexte du diabète Etude du glutathion et de la glutathion peroxydase 4, thèse de doctorat, DEA de Biochimie, Université Lyon I / INSA-Lyon; 201
- Johnson RJ, Sautin YY, Oliver WJ, Roncal C, Mu W, Gabriela Sanchez-Lozada L, Rodriguez-Iturbe B, Nakagawa T, Benner S A, 2009, Lessons from comparative physiology: could uric acid represent a physiologic alarm signal gone awry in western society. *J Comp Physiol B*. 179(1): 67-76.
- Kaplan A , 1984, Triglycerides, *Clin Chem The CV*, Mosby Co. St Louis. Toronto, Princeton; 437 and Lipids; 1194-1206.

- Khalil A, 2002, [Molecular mechanisms of the protective effect of vitamin e against atherosclerosis] *Can J Physiol Pharmacol*, vol 80(7); 662-669.
- Knight TR, Kurtz A, Bajt ML, Hinson JA, Jaeschke H, 2001, Vascular and injury:role of mitochondrial oxidant stress.*Toxicol Sci*, Vol 62; 212–220.
- Koechlin-Ramonatxo C, 2006, Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires, *Nutrition clinique et métabolisme*, 20; 165-177.
- Krzystek-Korpacka M, Patryn E, Kustrzeba-Wojcicka I, Chrzanowska J, Gamian A, Noczynska A, 2011, The effect of a one-year weight reduction program on serum uric acid in overweight/obese children and adolescents. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*.49; 915-21.
- Le bail D, 2009, le stress oxyatif ,*Nature rev*,11; 60-63.
- Lévy-Marchal C, 2007, Surveillance épidémiologique du diabète de l'enfant, *Revue, Institut de veille sanitaire, Maison-Alfort, paris*; 13-14 (1956-6954)
- Limaye PV, Raghuram N, Sivakami S, 2003, Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin induced diabetic rats.*Molecular and Cellular Biochemistry* 243; 147 - 152.
- Lopez G V, Batthyany C, Blanco F,Botti H, Trostchansky A,Migliaro E, Radi R, Gonzalez M, Cerecetto H, and Rubbo H.2005, Design, synthesis, and biological characterization of potential antiatherogenic nitric oxide releasing tocopherol analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.13; 5787-5796.
- Maahs DM, Nadeau K, Snell-Bergeon JK, Schauer I, Bergman B, West NA, Rewers M,Daniels SR, Ogden LG, Hamman RF, Dabelea D, 2011, Association of insulin sensitivity to lipids across the lif espan in people with Type 1 diabetes. *Diabetic Medicine*. 28(8); 148-155.
- Madero M, Sarnak MJ, Wang X, Greene T, Beck GJ, Kusek JW, Collins AJ, Levey AS,Menon V, 2009, Uric acid and long-term outcomes in CKD, *Am J Kidney Dis*. 53: 796-803.
- Manea A, 2010, NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: involvement in vascular physiology and pathology. *Cell Tissue Res*, 342; 325–39.
- Mazunder UK, Gupta M, Rajeshwar Y, 2005, Antihyperglycemic effect and antioxidant potential of phyllanthus niruri (euphorbiaceae) in streptozotocin induced diabetic rats. *European Bulletin of Drug Research*, 13 (1); 13-23.
- Menon SG, Goswami PC, 2007, A redox cycle within the cell cycle:ring in the old with the

- new. *Oncogene*, 26; 1101-9.
- Mezzetti A, Pierdomenico SD, Costantini F, Romano F, De Cesare D, Cuccurullo F, Imbastaro T, Rilaro-Sforza G, Di Giacomo F, Zuliani G, Fellin R, 1998, Copper/zinc ratio and systemic oxidant load: effect of aging and aging-related degenerative diseases. *Free Radic Biol Med.*, vol 25(6); 676-68.
- Milane H, 2004, La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur; 13-36.
- Nabatieh, 2012, Les traitements innovants du diabète de type 1 : Focus sur la greffe des îlots de Langerhans, thèse de doctorat, Université Joseph Fourier Faculté de Pharmacie de Grenoble; 20-30.
- Nancy J, Linford S I, Chriner E, Peter S, 2006, Rabinovitch I. Oxidative Damage and Aging: Spotlight on Mitochondria, *Cancer Res*, 66; 2497-2499.
- Niki L, Reynaert S W, Aesif T, McGovern, Amy B, Emiel FM, Wouters C, Irvin Yvonne M W, et Janssen H, 2007, Catalase Overexpression Fails to Attenuate Allergic Airways Disease in the Mouse, *The Journal of Immunology*, 178; 3814-3821.
- Odile et Pastre, 2005, Intérêt de la supplémentation en antioxydant dans l'alimentation des Carnivores domestiques, vétérinaire, L'université Paul Sabatier de Toulouse 3-4116; 15.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K, 1979, Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Annals of Biochemistry*, 95; 351-358.
- Orban J.-C, Lena D, Bonciu M., Grimaud D., Ichai C, 2008, Complications métaboliques aiguës du diabète, *Réanimation*, vol 17(8); 761-767.
- Pasquier C. 1995, Stress oxydatif et inflammation, *Revue française des laboratoires*. N° 276.
- Perlemuter L, Sélam J-L et Colline de L'hortet, 2003, Diabète et maladies métaboliques, masson, paris; 80.
- Pincemail J, Meurisse M, 1999, Limet R, Defraigne JO, L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin, 4: 5.
- Pirot P, Cardozo AK, Eizirik DL, 2008, Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes, *Arq. Bras. Endocrinol, Metabol*, vol 52(2); 156-65.

- Prakasam A, Sethupathy S, Pugalendi KV, 2005, Antiperoxidative and Antioxidant Effects of *Casearia Esculenta* Root Extract in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats .yale journal of biology and medicine, 78; 15-23.
- Raccah D, 2004, Épidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré, EMC-Endocrinologie, 1; 29-42.
- Ravi K, Rajasekaran S, Subramanian S, 2005, Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats, Food and Chemical Toxicology, 43; 1433-1439.
- Reeves A, 2002, Métabolisme oxydatif du neutrophile nature, 416; 291-97.
- Renuka B, Rajurkar ZH, Govind TG, 2003, Studies on levels of glutathione S-transferase, its isolation and purification from *Helicoverpa armigera*. Current Science, Vol 85; 1355-1360.
- Roberts RA, Smith RA, Safe S, *et al.*, 2010, Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. Toxicolog, 276; 285-94.
- Rodier M, 2001, Le diabète de type 1, *Médecine Nucléaire*, Vol 25; 95-101.
- Sabry S, AT Dinh-Xuan, 1996, Le monoxyde d'azote : un médiateur ubiquitaire, Arch Pddiatr; 3 (Suppl I); 275-277
- Sathishsekar D, Subramanian S, 2005, Antioxidant properties of *Momordica Charantia* (bitter gourd) seeds on Streptozotocin induced diabetic rats. Asia Pac J Clin Nutr, 14 (2); 153-158.
- Schrader M, Fahimi HD, 2006, Peroxisomes and oxidative stress, Biochimica & Biophysica Acta, 1763; 1755-66.
- Sedlak, R. H. Lindsay, 1968, Estimation of total. protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal. Biochem. 25; 192-205.
- Sebbagh N, Chabane Sari D, ATaleb S, Ouali F, Magnan C, Ktorza A, 2007, Évaluation du profil du stress oxydatif chez des rats Wistar rendus diabétiques et ayant reçu un régime à base de l'huile de coloquinte à pouvoir hypoglycémiant, Diabètes & Métabolisme, 33; 153.
- Serteyn D, Grulke S, Franck T, Mouithys-mickalad A, Deby-dupont G, 2003, La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. Ann. Méd. Vét. 147; 79-93

- Sharma SB, Nasir A, Prabhu KM, Murthy PS, Dev G, 2003, Hypoglycaemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of seeds of *Eugenia jambolana* in alloxan-induced diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, 85; 201-206.
- Sivajothi V, Dey A, Jayakar B, Raj Kapoor B, 2008, Antihyperglycemic, Antihyperlipidemic and Antioxidant Effect of *Phyllanthus rheedii* on Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 7 (1); 53-59.
- Taleb-Senoucia D, Ghomaria H, Kroufa D, Bouderbalaa S, Prost J, Lacaille-Dubois MA, Bouchenaka M, 2009, Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, 25; 221-235.
- Tamion F, 2010, Albumine dans les états infectieux graves, Vol 29, Issue 9; 629-634.
- Tang FT, Chen SR, Wu XQ, Wang TQ, Chen JW, Li J, Bao LP, Huang HQ, Liu PQ, 2006, Hypercholesterolemia Accelerates Vascular Calcification Induced by Excessive Vitamin D via Oxidative Stress. *Calcif. Tissue. Int.* 79; 326-39.
- Taus M, Ferretti G, Curatola G, Dousset N, Solera ML, Valdigué P, 1992, Lower susceptibility of low density lipoprotein to *in vitro* oxidation in diabetic patients. *Biochem Int*, 28; 835-42.
- Therond P, 2006, Stress oxydant Dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxydant, *Ann Pharm Fr.* 64; 383-3.
- Trinder P, 1969, *Ann Clin Biochem*, 6; 24-33.
- Vadde R, Rama J, 2007, Evaluation of oxidative stress in Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM) patients, *Diagnostic Pathology*, 2; 22
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J, 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39; 44-84.
- Van Lenten B, Navab M, Shah D, Fogelman AM, Lusis AJ, 2001, the role of high density lipoproteins in oxidation and inflammation. *Trends Cardiovasc Med*, 11; 155-61.
- Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato M, Kubota LT, 2007, Espécies reactivas de oxigénio et de nitrogénio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova*. 30(5); 1323-38.
- Venkateswaran S, Pari L, 2003, Effect of *Coccinia indica* leaves on antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 84; 163-168.
- Vexiau P, 2006, prévenir les complications de diabète, assureurs prevention santé.

- Wan Ting Hsu, Li Yu Tsai, Shu Kai Lin, Jen Kuei Hsiao, and Bai Hsiun Chen, 2006, Effects of Diabetes Duration and Glycemic Control on Free Radicals in Children with Type 1 Diabetes Mellitus *Annals of Clinical & Laboratory Science*, vol 36:2.
- Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G, 2004, Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hyperten*, Vol 44; 381-386.
- Wolters M, Hermann S, Golf S, Katz N, Hahn A, 2005, Selenium and antioxidant vitamin status of elderly German women. *Eur J Clin Nutr*, vol 24;
- Yoshida K, Kondo I, 1998, Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux. *Diabetologia*, 88; 201-211.

Annexe 1

Tableau : Matériel non biologique (réactifs et appareillage)

	Produits	Référence
Réactifs	-Kit du dosage du glucose -Kit du dosage de triglycéride -Kit du dosage du cholestérol -Kit du dosage du cholestérol-HDL - Kit du dosage de l'Albumine -Kit du dosage de la ferritine -Kit du dosage de l'acide urique -kit du dosage HbA1c	-SPINREACT - SPINREACT - SPINREACT - SPINREACT - SPINREACT - Biomureux - SPINREACT -Biosysteme
Appareillage	-Bain-Marie -Vortex -Balance de précision -Agitateur magnétique -Centrifugeuse -Spectrophotomètres -Analyseur biochimique - Analyseur minividas -Micro pipete	- Memmert - NÜVE bath NF200 - VELP scientifica Zx - VELP scientifica Zx - Sigma - secomam basic - mindry BS200 - Biomureux
Produits chimiques	- NaCl - NaOH - TBA - methanol - TCA - n-butanol - DTNB -EDTA	Biochem chemopharma

TBA : Acide thiobarbiturique.

TCA : Acide trichloracétique, DNTP : 2-nitro-5-mercaptobenzoïque.

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique.

Description des réactifs

- **GLUCOSE** méthode enzymatique - colorimétrique (**GOD-POD**)
Réactif pour le dosage quantitatif du glucose dans le plasma, le sérum et liquide céphalorachidien (LCR) humain, ou les urines.

- **HEMOGLOBINE GLYQUEE (HbA1c)** méthode chromatographie d'échangeuse ionique (**Chromatographique-spectrophotométrique**).
Réactif pour le dosage quantitatif du l'hémoglobine gluquée dans le sang.

- **CHOLESTEROL** méthode enzymatique - colorimétrique (**CHOD-POD**)
Réactif pour le dosage quantitatif du cholestérol total dans le plasma ou le sérum humain.

- **TRIGLYCERIDE** méthode enzymatique - colorimétrique (**GPO-POD**)
Réactif pour le dosage quantitatif de triglycéride dans le plasma ou le sérum humain.

- **CHOTEROL- HDL** méthode directe (**Réactif précipitant**)
Réactif pour le dosage quantitatif du cholestérol-HDL dans le plasma ou le sérum humain.

- **ALBUMINE** méthode colorimétrique (**Vert de bromocréol**)
Réactif pour le dosage quantitatif du l'albumine dans le plasma ou sérum humains.

- **ACIDE URIQUE** méthode enzymatique colorimétrique (**Uricase-POD**)
Réactif pour le dosage quantitatif du l'acide urique dans le plasma ou sérum humain.

- **FERRITINE** méthode immuno-enzymatique- fluorescence (**elfa**)
Réactif pour le dosage quantitatif du la ferritine dans le plasma ou sérum humains.

Annexe 2

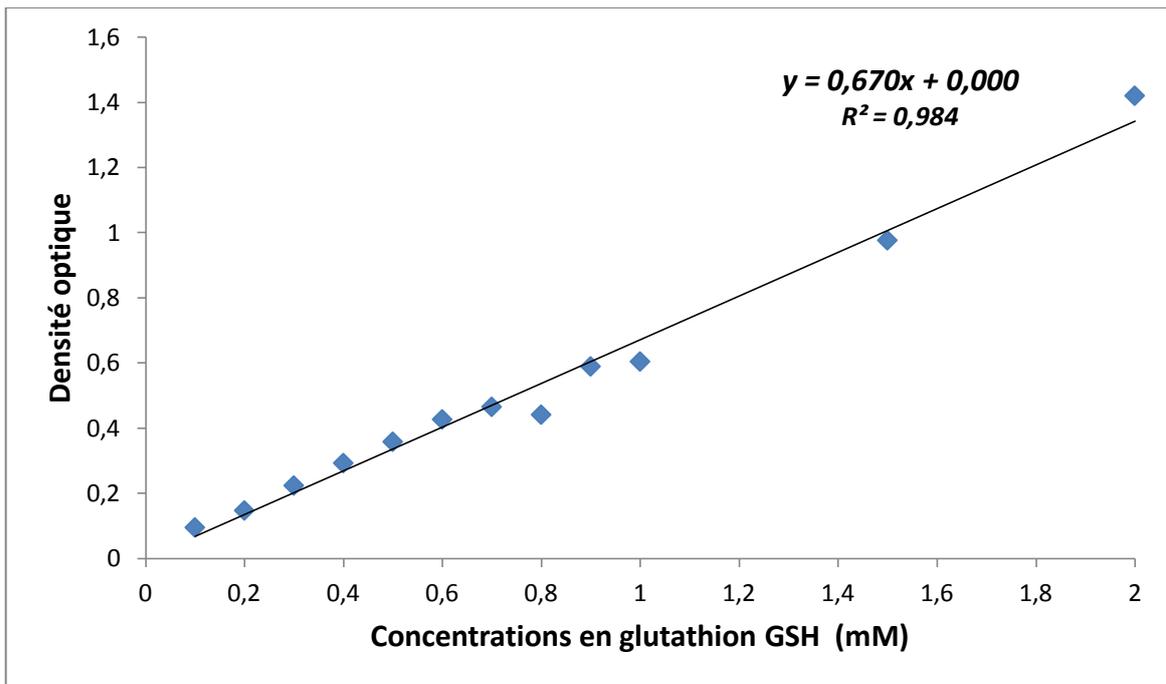


Figure. Courbe d'étalonnage du glutathion réduit (GSH)

Résumé

Le diabète est une maladie systémique fréquente affectant une tranche importante de la population mondiale. Il a été suggéré que la production accrue de radicaux libres et le stress oxydatif est un événement majeur pour le développement des complications du diabète. La forte réactivité des ERO détermine les changements chimiques dans pratiquement tous les composants cellulaires, conduisant à la peroxydation des lipides et la modification des protéines et a une éventuelle perturbation des défenses antioxydantes chez les sujets diabétiques. Notre travail vise à mettre en évidence la variation des paramètres métaboliques, le statut anti-oxydant et oxydant chez des diabétiques insulino-dépendants (DID). Dans la population diabétique étudiée par rapport aux témoins, le profil lipidique était inchangé, de même, les paramètres sériques exceptés les taux de la glycémie et de l'hémoglobine glyquée où une augmentation significative a été noté chez les DID. Aucune différence significative de la concentration sérique du statut oxydant et antioxydant n'a été observée chez les patients DID. Les résultats suggèrent qu'une courte durée d'évolution du diabète n'est pas directement impliquée dans la surproduction des radicaux libres.

Mots clé : diabète type I, stress oxydant, antioxydant, radicaux libres, espèce réactive oxygène, l'âge du diabète

Abstract

Diabetes is a prevalent systemic disease affecting a significant proportion of the population worldwide. It has been suggested that enhanced production of free radicals and oxidative stress is central event to the development of diabetic complications. High reactivity of reactive oxygen species (ROS) determines chemical changes in virtually all cellular components, leading to lipid peroxidation. Production of ROS and disturbed capacity of antioxidant defense in diabetic subjects have been reported. Based on this framework, we evaluated metabolic parameters (Plasmatic glycemia, glyated haemoglobin (HbA1c)), anti-oxidant and oxidant status in insulin dependent diabetes mellitus. The study has been conducted on 7 IDDM compared to 6 healthy subjects. The results revealed an unchanged lipid profile and biochemical parameters except the plasmatic glycemia and HbA1c levels where they were significantly increased in diabetic group. A non significant difference in the mean plasma concentration of total oxidant and antioxidant status was observed in IDDM patients. The findings suggest that short diabetes duration is not implicated in oxidative stress appearing.

Key words: type I diabetes, oxidative stress, antioxidant, free radicals, reactive oxygen species. age of diabetes

ملخص

السكري هو مرض شائع يصيب نسبة كبيرة من سكان العالم. وقد تبين أن زيادة إنتاج الجذور الحرة و إجهاد المؤكسد كلاهما يساهم في تطور مضاعفات مرض السكري. ان التفاعلات العالية لأنواع الأوكسجين النشط يحدث تغيرات كيميائية في جميع المكونات الخلوية تقريبا. التي تؤدي الى تأكسد الدهون وتغير الوظيفي للبروتينات واضطراب في الدفاعات المضادة للأكسدة لدى مرضى السكري. ان دراستنا تهدف الى تسليط الضوء على التغيرات في التفاعلات الأيضية (نسبة الغلوكوز، الهيموغلوبين المسكر...). وحالة المؤكسدات ومضادات التأكسد لدى مرض السكري المعتمدين على الأنسولين. وقد أجريت الدراسة على 6 أشخاص مرضى السكري مقابل 7 أصحاء. من خلال نتائج التحاليل البيوكيميائية تبين عدم وجود اختلاف في نسبة الدهون وكذلك الجلوتاثيون، الفيريتين، الزلال، وحمض اليوريك، باستثناء نسبة السكر في الدم والهيموجلوبين المسكر لوحظ ارتفاع هام لدى مرضى السكري. تراكيز المالون دي الدهيد لا تظهر فرقا هي ايضا. تشير النتائج ان المدة قصيرة من تطور مرض السكري لم تشارك مباشرة في الإنتاج الجذور الحرة.

الكلمات الرئيسية: السكري نوع 1، إجهاد المؤكسد، المضادة الأكسدة الجذور الحرة، الأنواع الأوكسجين النشط، سن السكري