



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tébessi –Tébessa-
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Biologie appliquée



MEMOIRE DE MASTER
Domaine : Science de la nature et vie (SNV)
Filière : Biologie appliquée
Option : Biochimie et biologie moléculaire

Thème :

Étude de l'effet du stress oxydant sur les complications diabétiques chez l'Homme

Présenté par :

• ABID Seyfeddine

• KHELIF Brahim

Devant le jury :

Dr. TOUMI Nassima	MCB	Université de Tébessa	Présidente
Dr. BOUSSEKINE Samira	MCA	Université de Tébessa	Promotrice
Dr. MESSADIA Amira	MCB	Université de Tébessa	Examinatrice

Date de soutenance : 28/05/2017

Note :/ Mention :



Déclaration sur l'honneur de non-plagiat

(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : *ABID, Soufiane*

Régulièrement inscrit(e) en **Master** au département : *Biologie appliquée*

N° de carte d'étudiant : *2012/4033892*

Année universitaire : *2017-2018*

Domaine: *Science de la nature et vie*

Filière: *Biologie appliquée*

Spécialité: *Biochimie et biologie moléculaire*

Intitulé du mémoire : *Etude de l'effet de stress oxydant sur les complications diabétiques chez l'Homme.*

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;
- L'exclusion définitive.

Fait à Tébessa, le : *23/06/2017*

Signature de l'étudiant(e) :

Déclaration sur l'honneur de non-plagiat

(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : KHELIF, Brahim

Régulièrement inscrit(e) en **Master** au département : Biologie Appliquée

N° de carte d'étudiant :

Année universitaire : 2017/2018

Domaine : Science de la nature et vie

Filière : Biologie appliquée

Spécialité : Bi chimie et biologie moléculaire

Intitulé du mémoire : Etude de l'effet de stress oxydant sur les complications diabétiques chez l'homme

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;
- L'exclusion définitive.

Fait à Tébessa, le : 29/06/2017

Signature de l'étudiant(e) :

KHELIF

Remerciement

« Le plus grand merci s'adresse au bon Dieu »

Nous tenons à exprimer notre plus grand remerciement à nos Très chers parents pour leur soutien moral et leurs encouragements.

Nous tenons à témoigner de notre profonde gratitude et remerciements notre encadreuse Dr. BOUSSEKINE Samira qui malgré ces occupations et ces responsabilités, elle a toujours eu le temps de nous écouter, nous conseiller et nous orienter.

Aux équipes des laboratoires de l'EPH Bouguerra Boulaaress – Tebessa / EPH Khaldi Abdelaziz – Tebessa, pour leurs sympathiques et consistances durant notre stage.

Nous exprimons notre gratitude à nos patients qui sont le sujet de notre étude malgré leur souffrance et douleur ils sont assez modestes pour ajouter plus de connaissance et améliorer la science, que dieu les guérisse tous.

Egalement un remerciement à tous nos collègues et à tous les étudiants de la 2^{ème} Année Master Biochimie Et Biologie Moléculaire, promotion 2017, ainsi qu'à tous nos collègues (es) à l'Université de Laarbi Tbessi - Tebessa.

Enfin, nos remerciements vont aussi à l'égard des membres de Jury qui nous ont fait l'honneur de juger notre travail.

A toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de notre mémoire.

Seyfeddine & Brahim

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Ma mère **Guedri T.** qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mon père **Abid B.** qui peut être fier et trouver ici le résultat des longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte ; merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi

Mon frère et mes sœurs.

L'université de Tebessa (Département de Biologie).

Les personnes qui m'aident au cours de ce travail surtout **BOUREZG Chaouki** qui rend son maison un endroit pour mon travail et **GOUCEM Chouaib** (Las Vegas), **KHELIF Brahim** et sa famille, à mes amis : **GATTAL Hamza** (l'antioxydant) et **RAIS Tahar** (le radical libre), **MELKIA Elouardi** (pinky) . Je souhaite un avenir plein de joie, de réussite et de bonheur pour eux.

Enfin je dédie ce travail à mes ami(e)s, mes collègues et à tous ceux que j'aime.

Seyfeddine

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mes parents qui voient aujourd'hui leurs efforts et leurs sacrifices couronnés par ce diplôme. Ils ont veillé à mon éducation avec infiniment d'amour et d'affectation.

Que Dieu me permette de leur rendre au moins une partie, aussi infime soit-elle, de tout ce que je leur dois.

A mon frère Mohamed Elhadi en témoignage des liens solides qui nous unissent.
Et à qui je souhaite beaucoup de bonheur et de réussite...

A toute ma famille grands et petits, mes oncles, tantes, cousins et cousines...
A toute la famille « Khelif » et « Chaguetmi » ...

A Mon binôme ABID Seyfeddine et sa famille...

A tous mes ami (es) un par un avec qui j'ai passé de merveilleux moments et avec qui j'ai partagé malheur et bonheur en particulier

« Hamza, Taher, Salah, Boubaker, Amara, Atef, Chouaib, Elouardi, Chaouki, Skander, Bilel, Ahmed, Ayoub, Houcine, Djamel, Mariem, Asma, Lamia, Nouha, Noussaiba, Amira ... »

et la liste reste longue...

A mes camarades l'INFSP de Constantine.

A l'ensemble des personnes qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce projet.

Que ce travail soit le modeste fruit de mes longues années d'haleine.

Brahim

Les complications diabétiques sont causées principalement par l'intervention des radicaux libres, en raison de l'activation des certaines voies comme ; le voie des polyols, voie des hexosamines, et la glycation non enzymatique des protéines...etc., ce qui provoque la diminution de l'activité du system antioxydant enzymatique (Gpx, GST, SOD...etc.). Dans ce contexte notre travail à portée sur l'évaluation de l'état du défense antioxydante chez les patients ayant un diabète équilibré dans la région de Tébéssa. Il s'agit d'une étude expérimentale menée au laboratoire sur le sang et le sérum de 60 individus, repartis en 03 lots de 20 personnes chacun, dont le premier lot sert de témoins sains, le second sert de diabète type 1 (DID) et le dernier sert de diabète type 2 (DNID). Un bilan biochimique complet a été réalisé, ainsi que les paramètres de la défense antioxydante (GSH, GPx et GST) et un paramètre de la peroxydation lipidiques (MDA) dans l'hémolysât et le sérum. A partir de l'analyse des résultats, on à observer par rapport aux témoins une augmentation significative dans la concentration sérique de : Glucose, HbA1c, Cholestérol T, Triglycérides, HDL-c (DID), LDL-c, Urée, Créatinine (DNID ♀), Acide urique (DNID), TGO, TGP (DID), Protéines T, Albumine, GPx (DNID), GST. Par contre on a enregistré une diminution significative dans le taux de : l'acide urique (DID), Bilirubine D (DNID), GPx (DID) et le GSH. Mais dans l'hémolysât on a enregistré une augmentation significative de : GPx et MDA et une diminution significative de GSH et GST. Enfin malgré que le diabète soit équilibré et les paramètres biochimiques restent aux normes la diminution de la concentration de GSH sérique et érythrocytaire et l'augmentation de malonylaldéhyde (MDA) semble constituer un signe d'alarme des complications graves qui apparaîtront à moyen et long terme chez les DID ainsi que chez les DNID.

Mots clés : Diabète équilibré, Radicaux libres, Complications diabétiques, Défense antioxydante, Peroxydation lipidique.

Diabetic complications are caused mainly by the intervention of free radicals, due to the activation of certain pathways as; polyols pathway, the hexosamines pathway and the non-enzymatic glycation of the proteins, etc., which decrease the activity of the antioxidant enzymatic system (GPx, GST, SOD, etc.). In this context, our work focused on assessing the state of antioxidant defense in patients with good diabetes control in the region of Tebessa. It is an experimental study carried out in the laboratory on the blood and the serum of 60 people, divided into 03 batches of 20 persons for each, the second serves as diabetes type 1 (IDD) the third serves as type 2 diabetes (NIDD). A complete biochemical assessment was carried out, as well as the evaluation of antioxidant defense (GSH, GPx and GST) and a lipid peroxidation parameter (MDA) in the hemolysis and the serum. In the one hand from the analysis of the results, a significant increase in the serum concentration of: Glucose, HbA1c, T Cholesterol, Triglycerides, HDL-c (IDD), LDL-c, urea, creatinine (NIDD ♀), uric acid (NIDD), TGO, TGP (IDD), T proteins, albumin, GPx (NIDD), GST. On the other hand, there was a significant decrease in the level of uric acid (IDD), D Bilirubin (NIDD), GPx (IDD) and GSH. However, in hemolysis, there was a significant increase in: GPx and MDA and also a significant decrease in GSH and GST. Finally, despite the fact that diabetes is balanced and the biochemical parameters remain to the norms the decrease of the concentration of the serum and the erythrocytic GSH and the increase of malonylaldehyde (MDA) seems to be a warning sign of the serious complications that will appear after a while to IDDs and NIDDs.g

Key words: Balanced diabetes (Good glycemia control), Free radicals, diabetic complications, antioxidant defense, lipids peroxidation.

إن مضاعفات داء السكري تحدث نتيجة تدخل الجذور الحرة بسبب تفعيل بعض التفاعلات مثل تفاعلات متعددة الكحول ، الأمينيات السكرية ، والتسكر الغير الأنزيمي للبروتينات ... الخ وهذا ما يسبب تناقص النشاط الإنزيمي لجهاز مضادات الأكسدة الغلوتاثيون، الغلوتاثيون بيروكسيداز GPX, GST, SOD تتمثل دراستنا في تشخيص حالة جهاز مضادات الأكسدة عند المرضى ذوي مرض السكري المراقب و المتحكم فيه جيدا في منطقة تبسة، و هذه الدراسة التجريبية على مستوى المخبر أجريت على دم و مصل 60 شخصا مقسمين إلى 3 مجموعات تتكون كل واحدة من 20 شخصا. حيث أن المجموعة الأولى مجموعة شاهدة (أشخاص سليمين) والثانية تتكون من ذوي مرض السكري الوراثي (نمط 1) والثالثة تتكون من ذوي مرض السكري (النمط 2). تم إجراء التحاليل البيوكيميائية وكذلك تحاليل جهاز الدفاع الإنزيمي لمضادات الأكسدة GPX GST GSH وكذلك أحد معايير الأكسدة الدهنية مالونيل دي الدهيد (MDA) في كل من المصل والدم المتصل. من خلال تحليل النتائج لاحظنا أن تركيز كل من الغلوكوز، الهيموغلوبين، الكوليسترول، الدهون الثلاثية LDL, HDL، اليوريا، الكرياتينين وحمض اليورك وناقلات الامين TGP ، TGO البروتينات الكلية والاليومين مرتفع بالنسبة للمجموعة الشاهدة وتم أيضا تسجيل انخفاض دلالي في تركيز كل من حمض اليورك بالنسبة للنمط و البيلوروبين (Bilirubine) وكذلك لاحظنا تناقص نشاط الغلوتاتون GPx ، GSH و تزايد نشاط GST في المصل. اما بالنسبة للدم المحلل فقد لاحظنا تزايد في gpx والمالونيل ثنائي الالدهيد mad وتناقص كل من GST و GSH و اخيرا فان انخفاض تركيز الغلوتاثيون في كريات الدم الحمراء والمصل وارتفاع المالونيل ثنائي الالدهيد MDA هو علامة تحذيرية للإصابة بمضاعفات السكري.

الكلمات المفتاحية: داء السكري المتحكم فيه، مضاعفات داء السكري، الجذور الحرة، مضادات الاكسدة، أكسدة الدهون.

[ABREVIATIONS ET CONSTANTES]

1O₂ : Oxygène singulet.

4-HNE : 4-hydroxy-2-nonéanal.

4-HNE : trans-4-hydroxy-2-nonéanal.

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

ADN mt : Acide Désoxy ribo Nucléique mitochondrial.

ADP : Adénosine Diphosphate.

AG : Acide Gras.

AGE : Produits de Glycation Avancée.

AGE : Advanced Glycation End Products: (produits de glycation avancés).

ALT : Alanine aminotransferase.

ATP : Adénosine Triphosphate.

BHT : Butyl hydroxy toluene.

BSA : Sérum albumine bovine.

Ca²⁺ : Ion Calcium.

CAT : Catalase.

CDNB : 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène.

CDNB : 1-Chloro2 ,4 di nitrobenzene.

Chol-T : Cholestérol Total.

CO : Monoxyde de Carbone.

CO₂ Dioxyde de carbone.

Cu : Cuivre.

Cu/Zn-SOD Superoxyde dismutase aux ions cuivre et zinc.

Cyt C : Cytochrome c.

DAG : Diacylglycerol.

DG : Déoxyguanosine.

DHAP : Dihydroxyacétone Phosphate.

DMSO : diméthylsulfoxyde.

[ABREVIATIONS ET CONSTANTES]

DO : Densité optique.

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tetra Acétique.

EPH : 'Etablissement Public Hospitalier.

FA CoA : Fatty-acyl-CoA.

Fd : Facteur de dilution.

Fe²⁺ : Fer ferreux.

FN3K : Fructosamine 3-kinase.

GAD : Glutamic Acid Decarboxylase.

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-Phosphate-Dehydrogénase

GFAT : Glucosamine Fructose-6 Phosphate Amidotransférase.

GLUT4 : Transporteur De Glucose 4'.

GPx : Glutathion peroxydase.

GSH : Glutathion.

GSSG : Glutathion forme oxydé.

GST : Glutathion S- Transférase.

H₂O₂ Peroxyde Dihydrogène.

HbA1c : Hémoglobine Glyquée.

HGPO : Hyperglycémie Par Voie Oral.

HMG CoA 3-Hydroxy-3 Methylglutaryl-Coa.

HO° : Radical Hydroxyle.

IKK NFKB : IκB Kinase Nuclear Factor-Kappa.

IRS : Insulin Receptor Substrate.

LDL : Lipoprotéines De Basse Densité.

LOO• : Peroxyle.

LOOH : Hydroperoxide.

LPO : Lipoperoxyde.

MAPKs : Mitogen-Activated Protein Kinases.

[ABREVIATIONS ET CONSTANTES]

MDA : Malondialdehyde.

ME : Membrane Externe.

MI : Membrane interne.

Mn : Manganèse.

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.

NO- : Anion Nitroxyl.

NO : Monoxyde D'azote.

NO : Nitrite Oxyde.

NO⁺ : Nitrosium.

NOS : Espèces Reactive Nitroginées.

O₂[°] : superoxyde.

O₂⁻ Anion superoxyde

ONOO⁻ : Peroxynitrite.

PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1.

PI3K : Phosphoinositide 3 Kinase.

PKC : Protéine Kinase C.

POD : Peroxydase.

PUFAs: Poly Unsaturated Fatty Acids.

R*: espèce radical générée par Rh.

RH : Molécule Organique.

ROH Radical Hydroxyl.

ROO* : Radical Peroxyle

ROOH : Hydroperoxydes Organiques

ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène

ROS : Réactive Oxygen Species.

Se : Sélénium.

SH : Sulfhydryles.

[ABREVIATIONS ET CONSTANTES]

SOD : Superoxyde Dismutase.

SSA : Acide Sulfosalicylique.

TBARS : Substances Réagissant Avec L'acide Thiobarbiturique.

TGF : Facteurs de Croissance.

TGF-B1 : Transforming Growth Factor Beta.

TGP : Glutamate Pyruvate Transaminases.

TK : Transkétolase.

TrxR : Thiorédoxine Réductase.

UDPGlcNac : Uridine Diphosphate N-Acetyl Glucosamine.

Vit E, D : Vitamine E, D.

VLDL : Very Low Density Lipoproteins.

Zn : Zinc.

γ -GCS : γ -Glutamylcysteinesynthetas.

γ GT : Gamma-Glutamyl-Transpeptidase.

Listes des figures :

Figure 1 : Mécanismes intracellulaires de l'insulinorésistance. (Guerin-Dubourg, 2014).....	4
Figure 2: Coupe schématique d'une artère saine et d'une artère athéroscléreuse	6
Figure 3: Déséquilibre de la balance entre prooxydant et antioxydant (Nkhili, 2009).....	8
Figure 4 : Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire. (Elouil, 2009).	9
Figure 5 : Formation de NO par la NO synthase mitochondriale.....	11
Figure 6: Résumé des réactions se produisant en situation de stress oxydant.....	12
Figure 7 : Structure du 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine.	13
Figure 8 : Réactions de la peroxydation lipidique.(Niedernhofer, et al 2003).	14
Figure 9: Répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule.	16
Figure 10 : Les réactions impliquant le glutathion. (Clémentine P. , 2013).....	19
Figure 11 : Diabète et stress oxydant (Clémentine P. , 2013).	22
Figure 12 : Mécanisme de la résistance à l'insuline induit par les stress oxydant (Auberval, 2010).	23
Figure 13 : Voie de sorbitol (Audrey, 2002).	24
Figure 14 : Compétition de diverses réactions pour le NADPH (Audrey, 2002).....	25
Figure 15 : Stimulation de la voie des hexosamines par l'hyperglycémie et conséquences (Audrey, 2002).	27
Figure 16 : Les voies et les complications biochimiques et physiopathologiques liées à l'hyperglycémie chronique et le stress oxydant (Bertry, 2011).....	28
Figure 17: Schéma récapitulatif de protocole expérimental.....	30
Figure 18 : Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique.	46
Figure 19 : Variation de la concentration sérique du glucose et de l'HbA1c chez les diabétiques DID et DNID par rapport aux témoins sains.	49
Figure 20 : Variation de la concentration sérique des paramètres du bilan lipidique chez les diabétiques DID et DNID par rapport aux témoins sains.	50
Figure 21 : Variation de la concentration des sérique des paramètres du bilan rénal chez les diabétiques (DID et DNID) par rapport aux témoins sains.	52
Figure 22 : Variation de l'activité des transaminases sériques chez les diabétiques (DID et DNID) par rapport aux témoins sains.	53
Figure 23 : Variation des concentrations sériques de Bilirubine Total, Direct, Protéines Totales, Albumine et la Phosphatase Alcaline chez les diabétiques de type 1 et 2 par rapport aux témoins sains.....	54
Figure 24 : Variation sérique des paramètres de la défense antioxydante et de la peroxydation lipidique chez les diabétiques (DID et DNID) par rapport aux témoins sains.	55
Figure 25 : Variation des paramètres de la défense antioxydante et de la peroxydation lipidique dans l'hémolysât chez les diabétiques (DID et DNID) par rapport aux témoins sains.	56

Liste des tableaux

Tableau 1 : Valeurs de la glycémie et signification clinique	2
Tableau 2 : Les apports exogènes de vitamines nécessaires à l'homme.....	21
Tableau 3 :Variation de la concentration des paramètres biochimiques chez les diabétiques DID et DNID par rapport aux témoins sains.....	48
Tableau 4: Variation des paramètres de la défense antioxydante (GPx, GSH et GST) et un paramètre de la peroxydation lipidique (MDA) dans le sérum et l'hémolysât chez les diabétiques DID et DNID par rapport aux témoins sains.....	48
Tableau 5: Variation de la concentration sérique du glucose et HbA1c chez les sujets témoins et les diabétiques DID et DNID.	49
Tableau 6 : Variation de la concentration sérique de Cholestérol Total, Triglycérides, HDL-c et d'LDL-c chez les diabétiques de type 1 et 2 par rapport aux témoins sains.....	50
Tableau 7 : Variations des concentrations sériques des paramètres du bilan rénal chez les diabétiques (DID et DNID) par rapport aux témoins sains.....	51
Tableau 8 : Variation des paramètres du bilan hépatique chez les diabétiques (DID et DNID) par rapport aux témoins sains.....	53
Tableau 9 : Variation sérique des paramètres de la défense antioxydante et de la peroxydation lipidique chez les diabétiques (DID et DNID) par rapport aux témoins sains.....	55
Tableau 10 : Variation des paramètres de la défense antioxydante et de la peroxydation lipidique dans l'hémolysât chez les diabétiques (DID et DNID) par rapport aux témoins sains.....	56

Équations

Équation 01 : Formation de l'anion superoxyde à partir des électrons de NAD(P)H par Nox.09

Équation 02 : Formation de peroxyde d'hydrogène par la superoxyde dismutase (SOD). 10

Équation 03 : Formation d'hydroxyle selon la réaction d'Haber-Weiss..... 10

Équation 04 : Formation de peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Fenten. 10

Équation 05 : Formation de peroxyde d'azote. 11

Équation 06 : La réaction catalysée par la catalase. 17

Équation 07 : Réactions de la glutathion peroxydase. 17

Équation 08 : Réduction du GSSG en GSH par la glutathion réductase..... 17

- **REMERCIEMENTS**
- **DEDICACES**
- **RESUME**
- **ABREVIATIONS ET CONSTANTES**
- **TABLE DES ILLUSTRATIONS**

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

1.	Diabète	2
1.1	Définition de diabète.....	2
1.2	Types de diabète	2
1.2.1	Diabète insulino-dépendant.....	2
1.2.2	Diabète non insulino-dépendant.....	3
1.2.2.1	Obésité et l'insulinorésistance	3
1.2.2.2	Intolérance au glucose	4
1.3	Autres types de diabète	4
1.4	Complications de diabète.....	5
1.4.1	Complications aiguës.....	5
1.4.1.1	Hypercétonémie.....	5
1.4.1.2	Dysfonction immunitaire.....	5
1.4.2	Complications chroniques	5
1.4.2.1	Complications macrovasculaires	6
1.4.2.2	Complications microvasculaires	6
1.4.2.2.1	Néphropathie	7
1.4.2.2.2	Rétinopathie.....	7
1.4.2.2.3	Neuropathie	7
2.	Stress oxydant.....	8
2.1	Rappel sur le stress oxydant.....	8
2.1.1	Définition.....	8
2.1.2	Prooxydants.....	9
2.1.2.1	Espèces Réactives de l'Oxygène (ROS)	9
2.1.2.2	Espèces réactives de l'azote	10
2.1.3	Cibles cellulaire.....	13
2.1.3.1	Acide désoxyribonucléique ou ADN	13
2.1.3.2	Lipides.....	13
2.1.3.3	Protéines	14
2.1.4	Antioxydants.....	15

2.1.4.1	Système antioxydant enzymatique	16
2.1.4.1.1	Superoxyde dismutase (SOD).....	16
2.1.4.1.2	Catalase	17
2.1.4.1.3	Glutathion peroxydases	17
2.1.4.1.4	Glutathion réductase	17
2.1.4.1.5	Thiorédoxine	18
2.1.4.1.6	Hème Oxygénase-1	18
2.1.4.2	Systèmes antioxydants non enzymatique.....	18
2.1.4.2.1	Molécules antioxydantes endogènes	18
2.1.4.2.1.1	Glutathion	18
2.1.4.2.1.2	Coenzyme Q10.....	19
2.1.4.2.2	Molécules antioxydant exogènes	20
2.1.4.2.2.1	Oligoéléments.....	20
2.1.4.2.2.2	Polyphénols.....	20
2.1.4.2.2.3	Vitamines	21
2.2	Implication de stress oxydant dans le diabète	22
2.2.1	Relation entre le diabète et le stress oxydant.....	22
2.2.1.1	Défenses antioxydantes des cellules β	22
2.2.1.2	Effet du stress oxydant sur l'insulinorésistance	22
2.2.2	Glucotoxicité et le stress oxydant	23
2.2.2.1	Voie des polyols.....	23
2.2.2.2	Glycation non enzymatique des protéines.....	25
2.2.2.3	Activation de la protéine kinase C.....	26
2.2.2.4	Voie des hexosamines	26
DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE		
1.	Protocole :	29
2.	Déroulement de l'étude	31
2.1	Lieux de l'étude	31
2.2	Pré enquête.....	31
2.3	Questionnaire.....	31
2.4	Le prélèvement sanguin	32
2.5	Lotissement :	33
3.	Réalisation du dosage des paramètres biologiques :	33
3.1	Méthodes des paramètres biochimiques.....	33
3.1.1	Glycémie.....	33

3.1.2	Hémoglobine glycosylée.....	34
3.1.3	Cholestérol total.....	34
3.1.4	Triglycérides.....	35
3.1.5	HDL-c.....	36
3.1.6	LDL-c.....	36
3.1.7	Urée sanguine.....	37
3.1.8	Créatinine.....	37
3.1.9	Acide urique.....	38
3.1.10	TGO.....	39
3.1.11	TGP.....	40
3.1.12	Bilirubine totale et direct.....	40
3.1.13	Phosphatase alcaline.....	41
3.1.14	Protéines totales.....	41
3.1.15	Albumine.....	42
3.2	Paramètres de stress oxydatif.....	43
3.2.1	Glutathion peroxydase (GPx).....	43
3.2.2	Glutathion (GSH forme réduite).....	44
3.2.3	Glutathion S-transférase (GST).....	45
3.2.4	Malonyldialdehyde (MDA).....	45
4.	Etude statistique.....	47

RESULTATS

1.	Paramètres biochimiques.....	49
1.1.	Exploration du bilan glucidique.....	49
1.2.	Exploration de bilan lipidique.....	49
1.3.	Bilan Rénal.....	51
1.4.	Bilan Hépatique.....	52
2.	Paramètres de la défense antioxydante et la peroxydation lipidique.....	55

DISCUSSION

1.	Bilan glucidique.....	57
2.	Bilan lipidique.....	57
3.	Bilan rénal.....	58
4.	Bilan hépatique.....	58
5.	Bilan antioxydant.....	59

CONCLUSION

- **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**
- **ANNEXES**

L'OMS a considéré le diabète comme une épidémie avec une prévalence très importante au cours des dernières années, D'après les estimations de la direction de la santé de la région de Tébessa le nombre de diabétiques de type 1 en 2017 est de 3707 diabétiques de type 1 et de 16174 pour le type 2. Ce syndrome métabolique est caractérisé par une hyperglycémie causée par un trouble de la glycorégulation. Cette hyperglycémie est associée, à des degrés divers et par des mécanismes encore mal connus, à des complications à long terme, touchant en particulier les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins (*Fontbonne et Simon, 2001*).

Cette pathologie est le plus souvent accompagnée d'anomalies du métabolisme des lipides, caractérisées par des concentrations élevées en triglycérides, cholestérol total, C-LDL, et réduites en C-HDL (*Sebbagh et al., 2007*). Ces anomalies représentent un important facteur de risque des maladies cardiovasculaires(*Maahs et al., 2011*).

De nombreuses études suggèrent que le diabète s'accompagne d'un stress oxydant qui favorise le développement de la maladie en perturbant l'insulinosécrétion, en favorisant l'insulinorésistance et les complications chroniques qui y sont associées. Dans les sociétés modernes, les industriels pharmaceutiques ont réussi à développer tout un arsenal thérapeutique pour lutter contre cette maladie et tenter de prévenir ces complications, parmi ces thérapeutiques on retrouve l'insuline, utilisée pour le traitement du diabète de type 1 où la fonction endocrine des cellules β du pancréas se trouve altérée ; tandis que pour la prise en charge du diabète type 2, les antidiabétiques oraux (metformine, sulfamides hypoglycémiant...) sont indispensables afin de réguler l'hyperglycémie chronique. (*Ladouari et Harkouk, 2012*)

Ce travail a pour but d'étudier et d'évaluer l'état de la défense antioxydante chez les patients ayant un diabète équilibré.

Nous allons pour cela mis au point le dosage des paramètres biochimiques sanguins « bilan glucidique, bilan rénal, bilan lipidique et bilan hépatique », ainsi les paramètres du stress oxydant « GSH, GPx, GST », et un produit de la peroxydation lipidique « MDA ».

PREMIERE PARTIE :
RECHERCHE
BIBLIOGRAPHIQUE

PREMIERE PARTIE : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Diabète

1.1 Définition de diabète

Le mot diabète vient du grec « dia-baïno » signifiant « passer au travers ». Le diabète est une maladie métabolique caractérisée par une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L (7 m.mol/L), caractérisée et confirmée par deux prises de sang consécutives (*JenniferBaraka-Vidot, 2014*).

Cette maladie est due à des anomalies de la sécrétion d'insuline, de l'action de l'insuline ou des deux. L'hyperglycémie prolongée conduit aux complications sévères, dysfonctions et insuffisances de différents organes notamment les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins. (*American Diabetes Association, 2011*).

Le **Tableau 1** exprime les significations cliniques des taux de glucose sanguin à jeun et après provocation d'une hyperglycémie par voie oral HGPO.

Tableau 1 : Valeurs de la glycémie et signification clinique
(*American Diabetes Association, 2011*).

Valeurs de la glycémie	Signification clinique
De 0,8 et 1,10 g/l (à jeun)	Sujet non diabétique
De 1,10 à 1,25 g/l (à jeun)	Intolérance au glucose - hyperglycémie
Supérieure ou égale 1,26 g/l (à jeun)	Sujet diabétique
Supérieure ou égale à 2g/l (associée à la triade polydipsie, polyurie, amaigrissement)	Sujet diabétique
Supérieure ou égale à 2 g/L (2 heures après l'ingestion de 75 g de glucose par voie orale)	Sujet diabétique

1.2 Types de diabète

1.2.1 Diabète insulindépendant

C'est une maladie auto-immune, dans laquelle les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, qui sécrètent l'insuline, sont détruites. Le déclenchement de ce processus auto-immun est contrôlé à la fois par des facteurs génétiques et environnementaux. La destruction des cellules β est caractérisée par la présence d'insuline, infiltrat constitué majoritairement de lymphocytes T et B, et de macrophages, ainsi que par la production

d'anticorps dirigés contre différents autoantigènes des cellules β (exemple : gangliosides, sulfatide, GAD ; glutamic acid decarboxylase, insuline, etc...) (*Audrey, 2002*).

Les patients atteints de diabète de type 1 ne produisent pas suffisamment d'insuline ou ne le font pas du tout et ne peuvent pas contrôler la glycémie. Le type 1 survient généralement chez une personne de moins de 30 ans. L'administration d'insuline est nécessaire ainsi que la bonne quantité de nourriture. Les symptômes de cette maladie sont la soif, la faim et la miction (*Morhan*).

1.2.2 Diabète non insulino-dépendant

Cette pathologie se caractérise à la fois par un défaut de sécrétion de l'insuline et par une insulino-résistance des tissus périphériques (*Montserrat, 2004*).

Le diagnostic du diabète de type 2 est positif après l'observation chez un patient d'une glycémie à jeun supérieur à **1,26 g/l** à deux reprises. Cette hyperglycémie est le résultat du phénomène d'insulino-résistance (**Figure 1**). En phase de pré-diabète d'une durée de 10 à 20 ans on observe un hyperinsulinisme pour compenser le phénomène d'insulino-résistance.

En phase symptomatique du diabète de type 2, on observe une diminution de la production d'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans (*Bertry, 2011*).

La prévalence de cette pathologie augmente avec l'âge et atteint principalement les sujets en surcharge pondérale (*Betty, 2003*).

1.2.2.1 Obésité et l'insulino-résistance

Chez les obèses on observe une augmentation des acides gras libres issus de la lipolyse des triglycérides du tissu adipeux (**Figure 1**). Un excès d'acides gras libres circulants contribue à la diminution de l'utilisation du glucose par les cellules. De plus, une augmentation des métabolites des acides gras (diacylglycérol, acyl-CoA) au niveau des muscles stimule la phosphorylation des récepteurs à l'insuline par la protéine kinase C et inhibe les mécanismes de la signalisation insulino-ique, ceci entraînant une réduction du transport du glucose dans la cellule (**Figure 1**) (*Bertry, 2011*).

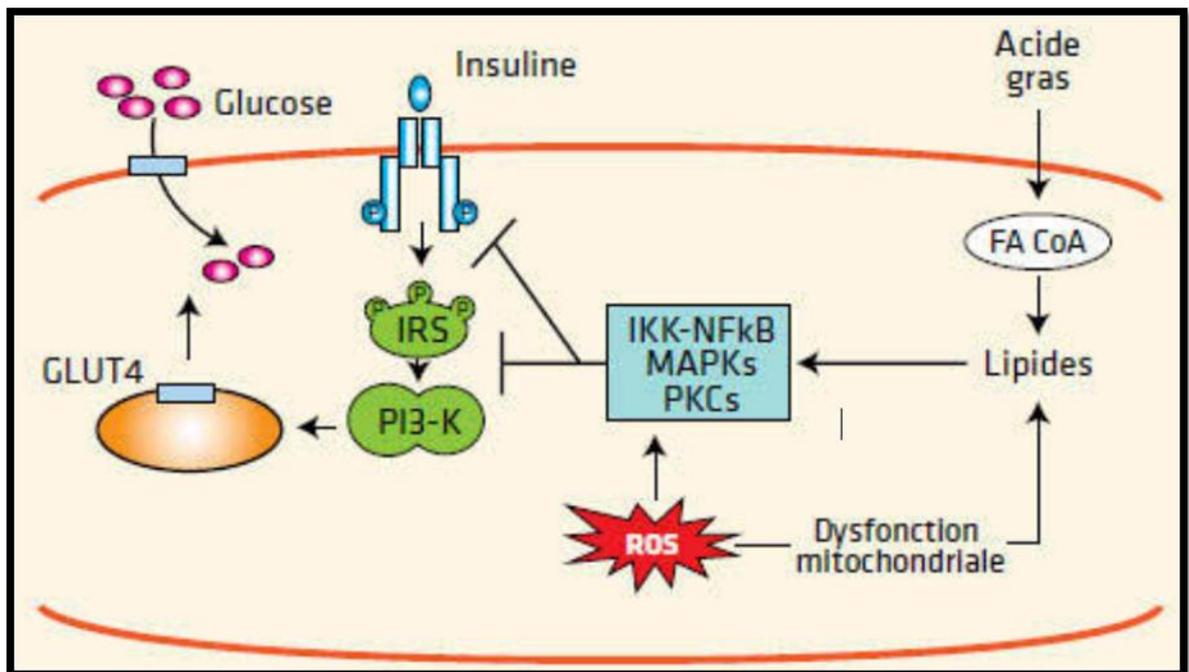


Figure 1 : Mécanismes intracellulaires de l'insulinorésistance. (Guerin-Dubourg, 2014)

1.2.2.2 Intolérance au glucose

L'intolérance au glucose autre fois appelée syndrome métabolique ou syndrome X, correspond à une hyperglycémie modérée. Il s'agit d'un stade précurseur du diabète où les patients atteints sont exposés à un risque plus élevée de développer par la suite un diabète de type 2. L'intolérance au glucose caractérisé par une insulinorésistance, c'est à dire une production d'insuline peu fonctionnelle ou une non fixation de l'insuline sur ses récepteurs périphériques. Le glucose n'est ainsi pas capté par les cellules, aggravant l'hyperglycémie et nécessitant plus d'insuline. Le pancréas va alors s'adapter en augmentant la masse des cellules β fonctionnelles (hyperplasie des îlots), ce qui conduit à un hyperinsulinisme. Cet état pathologique existe bien avant l'apparition du diabète de type 2. A terme, la production d'insuline s'épuise de par une glycémie de plus en plus difficilement équilibrée et par l'entrée en apoptose des cellules β , c'est l'insulinodéficience (Auberval, 2010).

1.3 Autres types de diabète

Le diabète peut également être provoqué par un défaut de fonctionnement des cellules β d'origine génétique, par des endocrinopathies comme l'acromégalie. Certains médicaments sont connus pour être responsables de certains diabètes comme les corticoïdes surtout lors d'une utilisation au long cours. Un diabète peut également apparaitre lors de la grossesse, il est alors appelé diabète gestationnel. Ce diabète disparaît

à l'accouchement mais il est un facteur de risque important dans le développement ultérieur d'un diabète (*Betty, 2003*).

1.4 Complications de diabète

1.4.1 Complications aiguës

La principale complication aiguë du diabète est le coma, provoqué soit par une hyperglycémie forte en présence des corps cétoniques (cétose), soit par une hypoglycémie (due par exemple à une prise trop importante d'un médicament hypoglycémiant)(*Audrey, 2002*).

1.4.1.1 Hypercétonémie

En situation de carence insulinaire et d'activation des hormones de contre-régulation glycémique, la lipase hormonosensible est activée, augmentant la lipolyse. Il y a alors production de grandes quantités de glycérol et d'acides gras libres. Ces derniers sont oxydés dans les mitochondries hépatiques aboutissant à la formation de corps cétoniques (acétoacétate et acide 3-hydroxy butyrate). De plus, l'Hypercétonémie est favorisée par la diminution du catabolisme et de l'élimination urinaire des corps cétoniques. L'accumulation de ces composés qui sont des acides forts est responsable d'une acidose métabolique organique (*Orban et Ichai, 2008*).

Le diabétique de type 2 peut être exposé à l'acidose lactique. Cette complication est due à l'utilisation de biguanides qui bloquent la production de glucose à partir des lactates entraînant ainsi leur accumulation (*Betty, 2003*).

1.4.1.2 Dysfonction immunitaire

Sur le plan biologique, le diabète provoque une dysfonction immunitaire parce que le glucose sera resté à la circulation donc les cellules immunitaires productrices des anticorps ne produiront pas les anticorps comme avant car les anticorps sont des glycoprotéines donc les cellules ont besoin de glucose pour les produire.

1.4.2 Complications chroniques

Les complications chroniques du diabète représentent aujourd'hui les causes essentielles de morbidité et de mortalité chez le patient diabétique. Ces complications sont d'origine vasculaire.

1.4.2.1 Complications macrovasculaires

La macroangiopathie diabétique correspond à l'ensemble des lésions artérielles secondaires au diabète. Elle consiste essentiellement en une athérosclérose accélérée conduisant à un risque accru d'accidents cardiovasculaires (*Audrey, 2002*).

L'athérosclérose consiste en un dysfonctionnement de l'endothélium des vaisseaux de gros et moyen calibre dû à la formation d'une plaque d'athérome (**Figure 2**) qui peut se compliquer de phénomènes de thrombose sous l'influence de différents facteurs. Cette plaque simple est composée de lipides, glucides complexes, produits sanguins, tissus adipeux, dépôts calcaires et autres minéraux. Le LDL-cholestérol, à savoir le « mauvais cholestérol » apparaît comme le facteur initiateur de la pathologie, viennent ensuite d'autres facteurs comme les agents infectieux et les syndromes inflammatoires. (*Albertus, 2015*).

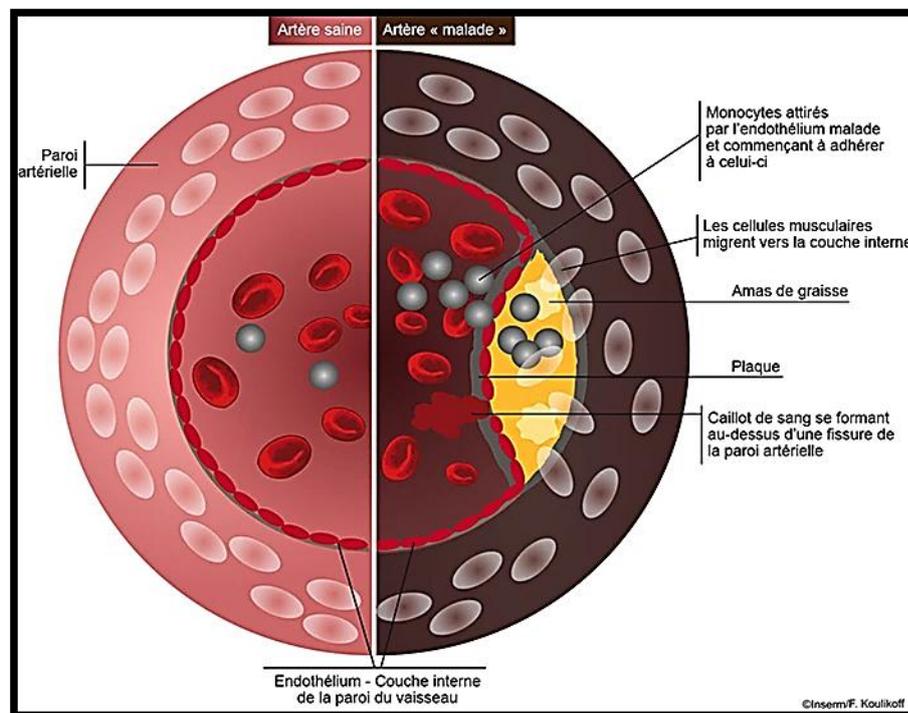


Figure 2: Coupe schématique d'une artère saine et d'une artère athéroscléreuse (INSERM, s.d.).

1.4.2.2 Complications microvasculaires

Les complications microvasculaires sont causées par des dommages aux capillaires localisés dans la rétine, les glomérules rénaux et les nerfs. Elles sont responsables de la cécité, l'insuffisance rénale et les troubles de la sensibilité somatique. (*Elouil, 2009*).

1.4.2.2.1 Néphropathie

La néphropathie est une affection inflammatoire ou dégénérative du rein. Chez les personnes diabétiques elle atteint le plus souvent la membrane basale, les cellules ou tout le glomérule du rein. On retrouve une microalbuminurie qui peut éventuellement s'aggraver en une protéinurie importante. L'insuffisance rénale et ultimement la dialyse sont des conséquences cliniques de cette pathologie. (*Lafiance, 1996*).

Dans le diabète la concentration du glucose sanguin est élevée donc au niveau des glomérules les molécules de glucose vont traverser les glomérules selon le gradient de concentration provoquant des dégâts au niveau des néphrons.

1.4.2.2.2 Rétinopathie

Le diabète provoque des occlusions des capillaires de la rétine, une ischémie de la rétine et des hémorragies par rupture de la barrière hématorétinienne. Les ions et protéines passent dans la rétine, entraînant l'eau par osmose, à l'origine de formation d'un œdème. Les lipides et les protéines peuvent également passer et former un exsudat. Cela peut entraîner une cataracte, un glaucome, des œdèmes maculaires voire une cécité totale. (*Auberval, 2010*).

L'accumulation de sorbitol et de fructose dans la rétine (hyperosmolarité par altération de la voie des polyols) due à l'hyperglycémie chronique, fait effondrer les rapports NADPH₂/NADP et NADH₂/NAD conséquent à un stress oxydant. Ces modifications du statut redox intracellulaire expliquent partiellement la rétinopathie du diabétique. (*KOCEIR*).

1.4.2.2.3 Neuropathie

La neuropathie est la complication la plus fréquente et la plus précoce du diabète sucré. Il s'agit d'une démyélinisation segmentaire des axones associés à des dépôts lipidiques sur les cellules de Schwann entourant les axones. (*Guerin-Dubourg, 2014*).

Peut conduire à l'ulcération de l'extrémité du pied diabétique, aboutissant parfois à l'amputation (*Audrey, 2002*).

La neuropathie peut aussi toucher le système nerveux autonome et provoquer des troubles de la digestion (diarrhée), du rythme cardiaque (hypotension) et des troubles d'ordre mictionnel et sexuel (impuissance) (*Auberval, 2010*).

Au cours de diabète l'hyperglycémie prolongée provoque la génération des radicaux libres via multiples mécanismes conduisant au stress oxydant.

2. Stress oxydant

2.1 Rappel sur le stress oxydant

2.1.1 Définition

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre entre la production des espèces réactives et les systèmes de défense contre les radicaux libres. (**Figure 3**).

Un radical libre se définit comme tout atome, groupe d'atomes ou molécule possédant un électron non apparié (célibataire) sur l'orbitale externe. Cette caractéristique lui confère une réactivité importante : les radicaux libres réagissent avec des molécules plus stables pour capter ou céder leurs électrons, créant ainsi de nouveaux radicaux en initiant des réactions en cascade. (*Januel, 2003*).

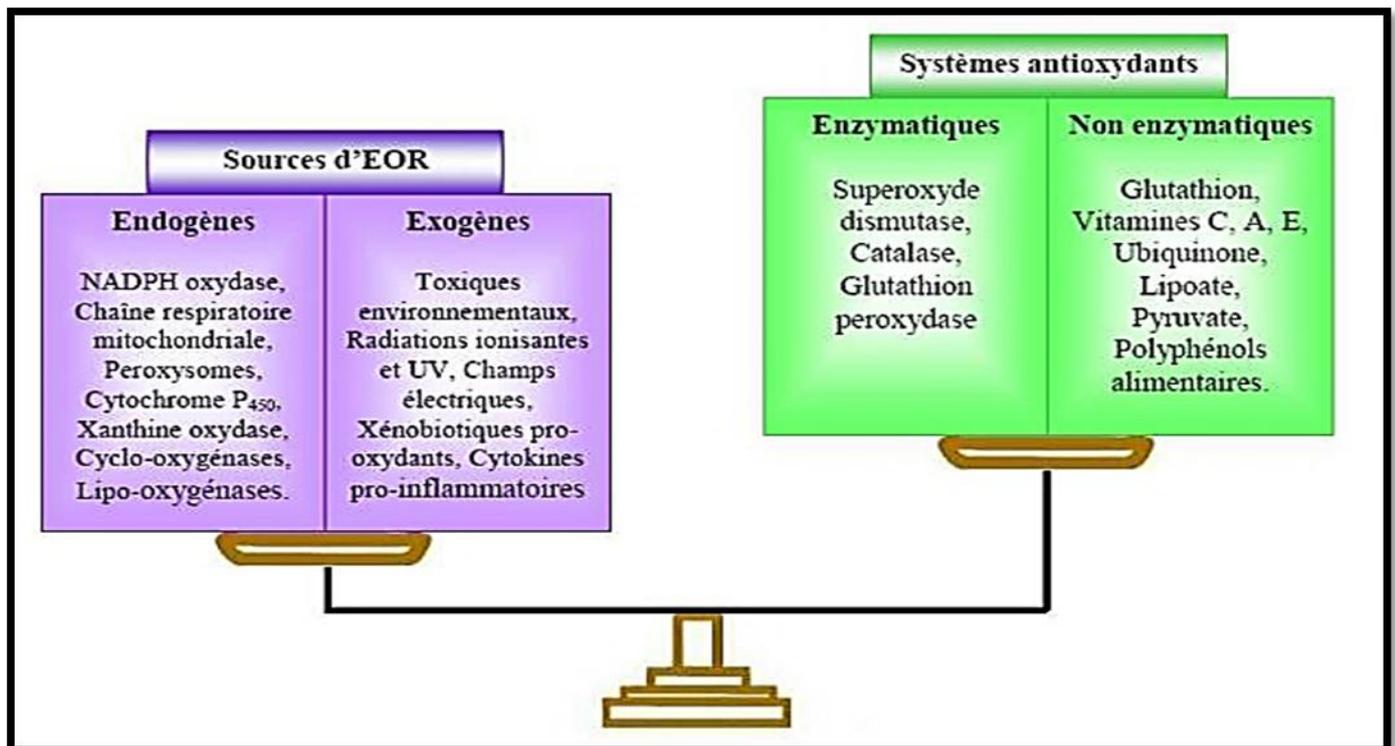


Figure 3:Déséquilibre de la balance entre prooxydant et antioxydant (*Nkhili, 2009*)

2.1.2 Prooxydants

2.1.2.1 Espèces Réactives de l'Oxygène (ROS)

La chaîne respiratoire mitochondriale, dans laquelle les êtres aérobies puisent leur énergie, joue un rôle capital dans la cellule en couplant l'oxydation de coenzymes transporteurs d'hydrogène ou d'électrons avec la phosphorylation de l'ADP en ATP. Les conséquences de cette activité mitochondriale sont doubles et paradoxales (**Figure 4**).

D'une part, la mitochondrie fournit à la cellule une source d'énergie importante puisque 36 molécules d'ATP à haut potentiel énergétique sont générées lors de la réduction de l'oxygène. Par contre, dans les conditions physiologiques, environ 0,4 à 4 % d'électrons s'échappent, réagissent directement avec l'oxygène dissous dans le cytoplasme et donnent naissance à des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (*Haleng et al., 2007*).

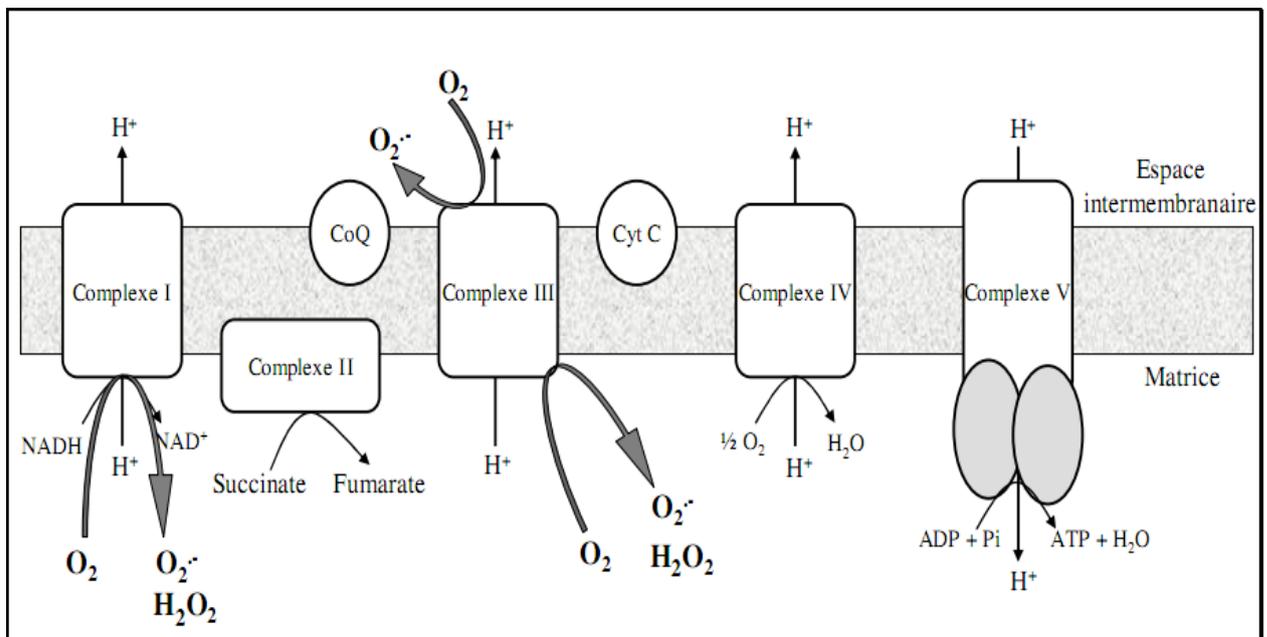


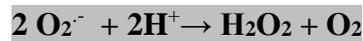
Figure 4 : Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire. (*Elouil, 2009*).

Les macrophages et les granulocytes possédant une enzyme appelée NADPH oxydase (Nox) qui peut catalyser la formation de $O_2^{\cdot-}$ (**Équation 1**) et ces dérivés H_2O_2 et OH . Ces derniers sont utilisés par certaines cellules immunitaires pour la destruction des microorganismes préalablement phagocytés.



Équation 1: Formation de l'anion superoxyde à partir des électrons de NAD(P)H par Nox.

Le peroxyde d'hydrogène est formé secondairement par la dismutation de l'anion superoxyde. La dismutation de l'anion superoxyde peut former une espèce stable et diffusible sous l'action des superoxyde dismutase appeler le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (**Equation 2**).



Équation 2 : Formation de peroxyde d'hydrogène par la superoxydedismutase (SOD).

Le H₂O₂ peut être réduit suivant engendrant alors un ion OH⁻ inoffensif et un radical hydroxyle HO[•] plus agressif(**Equation 3**) (Januel, 2003).



Équation 3 : Formation d'hydroxyle selon la réaction d'Haber-Weiss.

La réaction de Fenton est une décomposition de fer-sel-dépendante du peroxyde d'hydrogène, générant des radicaux hydroxyles très réactifs. Il se produit en présence d'ions ferreux (Fe²⁺) et O₂^{•-}(**Equation 4**) (Julien & Filaire, 2006).



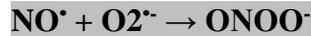
Équation 4 : Formation de peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Fenten.

2.1.2.2 Espèces réactives de l'azote

Le monoxyde d'azote, NO, est produit au niveau cellulaire à partir d'arginine et d'oxygène. Cette réaction est catalysée par une famille d'enzymes : les NO synthases (NOS). Il existe trois types de NOS : la NOS neuronale, la NOS endothéliale et la NOS inductible présente dans de nombreux tissus et organes. Les deux premières sont constitutives ; leur activité est régulée par la concentration intracellulaire de calcium. Le NO peut être converti en ion nitrosium (NO⁺), en anion nitroxyl (NO⁻) ou en peroxynitrite (ONOO⁻) (*Clémentine P. , 2013*).

Les espèces réactives de l'azote issues du métabolisme de l'azote via les NO synthases sont représentées principalement par l'oxyde nitrique (NO[•]) qui est un radical, les oxydes de l'azote, comme l'anhydride nitreux N₂O₃ et l'ion peroxynitrite (ONOO⁻)La présence en excès de ces NOS semble avoir des effets carcinogènes (**figure 5**) (*Cooke et al., 2006*).

La réaction de NO^\bullet avec $\text{O}_2^{\bullet-}$ entraîne la formation de l'ion peroxy-nitrite ONOO^- selon la réaction suivante :



Équation 5 : Formation de peroxy-nitrite.

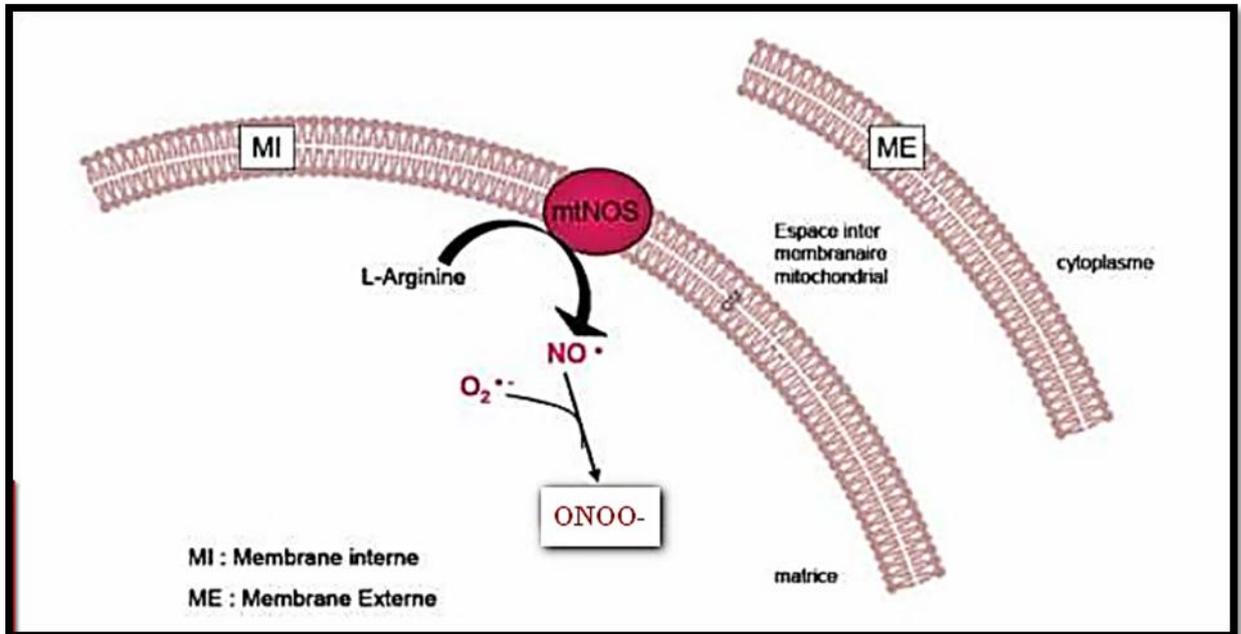


Figure 5 : Formation de NO par la NO synthase mitochondriale.

(Ghafourifar et Cadenas, 2005)

NO possède des capacités vasodilatatrices au niveau cardiovasculaire. Le NO^\bullet est capable de moduler l'activité de nombreuses enzymes impliquées dans diverses voies métaboliques. Indirectement, le NO^\bullet est capable de nitrosyler le GSH ce qui entraîne un déficit des défenses antioxydantes, la réserve de GSH s'épuisant. De plus, il peut engendrer un stress oxydant intracellulaire, interagir avec l'ADN et réguler certains phénomènes comme la transcription, la traduction ou encore l'apoptose. (Badouard, 2006).

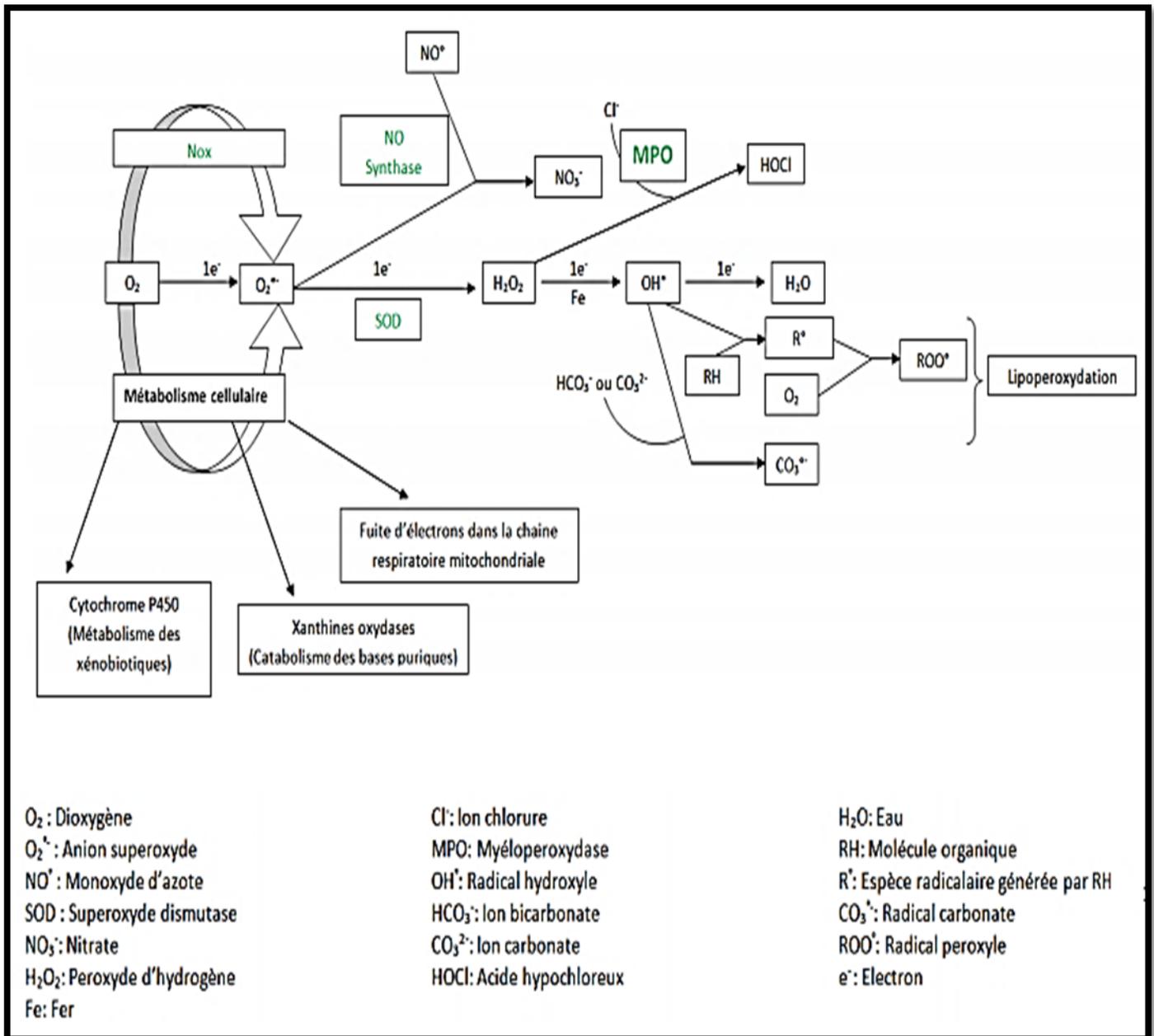


Figure 6: Résumé des réactions se produisant en situation de stress oxydant

(Mongens, 2013).

2.1.3 Cibles cellulaire

2.1.3.1 Acide désoxyribonucléique ou ADN

L'ADN est une cible privilégiée pour les ROS. La guanine, par exemple, peut réagir avec OH^\bullet pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) (**Figure 7**) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et du vieillissement. (*Haleng et al., 2007*).

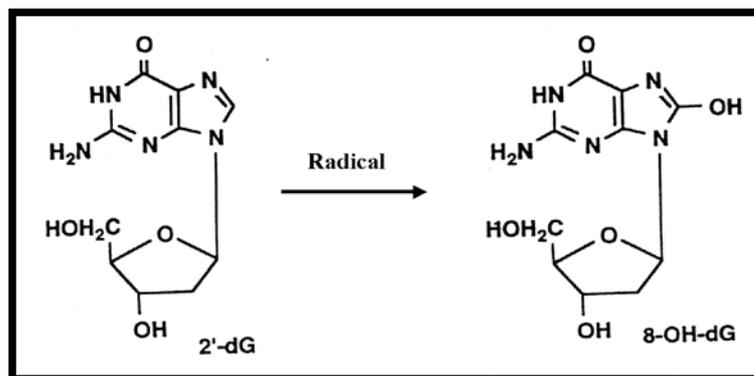


Figure 7 : Structure du 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine.

2.1.3.2 Lipides

Le stress oxydant concerne tous les constituants cellulaires mais ce sont les lipides qui sont les plus touchés par ce phénomène. La peroxydation lipidique concerne les acides gras polyinsaturés ou estérifiés des membranes cellulaires (ou PUFAs pour « Poly Unsaturated Fatty Acids », exemple des esters de cholestérols, phospholipides et triglycérides), cibles des ROS. Ce phénomène de peroxydation lipidique peut se produire dans des conditions physiologiques et il se trouve exacerbé dans des conditions pathologiques comme l'athérosclérose (*Badouard, 2006*).

La peroxydation lipidique débute par une phase d'initiation qui implique l'attaque des espèces réactives (hydroxyles, alcoxydes, peroxydes, oxygène singulet, peroxyde d'azote) entraînant l'arrachement d'un hydrogène du PUFA (LH). Ceci aboutit à la formation d'un radical pentadiényl qui après addition avec O_2 donne le radical peroxyde (LOO^\bullet). Ensuite, ce radical peut réagir avec un autre PUFA et former un hydroperoxyde (LOOH), c'est la phase dite de propagation de la peroxydation lipidique. Ces hydroperoxydes appartiennent à la famille des peroxydes lipidiques : les LPO. La réaction en chaîne de la peroxydation lipidique peut être prévenue par la vitamine E (α -tocophérol) intercalée dans la bicouche

lipidique des membranes qui joue le rôle de donneur d'hydrogène. En effet, la vitamine E transforme les radicaux peroxydes en hydroperoxydes et met fin à la réaction en chaîne de peroxydation des PUFAs. Cette dernière étape est alors désignée comme phase de terminaison. Ces réactions sont résumées dans la (Figure 8) (Badouard, 2006).

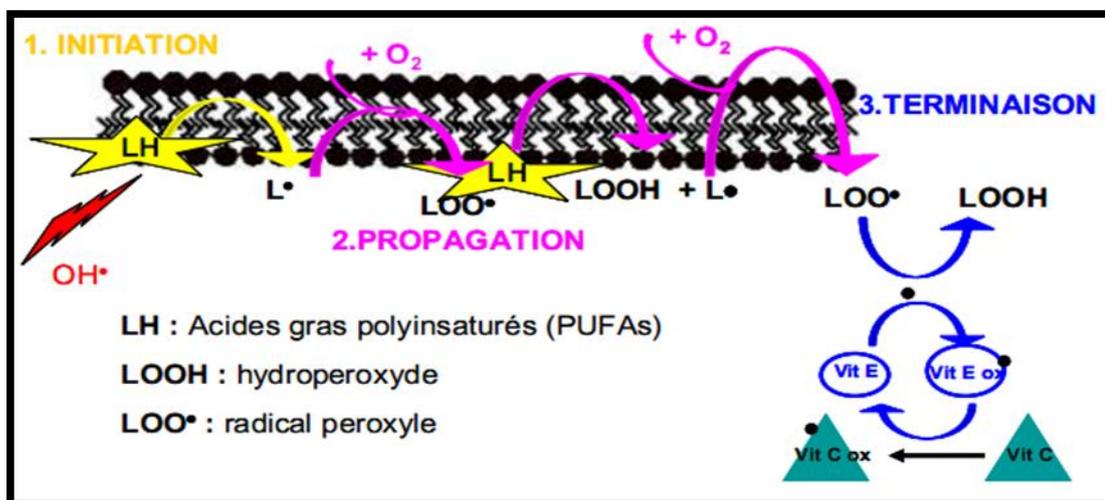


Figure 8 : Réactions de la peroxydation lipidique. (Niedernhofer, et al 2003).

Les LPO sont susceptibles de se décomposer en produits secondaires c'est à dire en aldéhydes très réactifs pouvant être considérés comme des messagers secondaires toxiques qui augmentent les dommages initiaux dus aux radicaux libres. Les plus réactifs vis à vis des bases de l'ADN sont représentés par le malondialdéhyde (MDA), le trans-4-hydroxy-2-nonéanal (4-HNE) et le crotonaldéhyde. Le MDA et le 4-HNE peuvent former des adduits avec l'ADN. D'autre part, le MDA et le 4-HNE réagissent avec des antioxydants comme le GSH entraînant une diminution de la concentration de ce dernier, se traduisant ainsi par une diminution des défenses cellulaires (Niedernhofer et al., 2003).

2.1.3.3 Protéines

L'attaque des protéines par le radical hydroxyle (HO•) ou par l'oxygène singulet ($O_{1/2}$) peut générer des produits finaux très variés. Par contre, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) ne semblent oxyder que des protéines présentant des groupements sulfhydryles (SH) facilement oxydables et accessibles. Les acides aminés les plus sensibles au stress oxydant sont le tryptophane, la tyrosine, la phénylalanine, la méthionine et la cystéine. Les dommages infligés aux protéines peuvent venir non seulement d'une attaque directe par les radicaux libres, mais aussi par des produits issus de la peroxydation lipidique comme le malondialdéhyde et le 4 ; hydroxynonéanal. Les protéines peuvent alors subir soit des réticulations par formation notamment de ponts bityrosine, soit des coupures en cas d'agression forte, soit des modifications de certains

acides aminés en cas d'agressions modérées. Lorsqu'un radical d'acide aminé est formé dans une protéine, les électrons peuvent migrer sur d'autres résidus aminés. Ainsi, le site final oxydé au sein de la protéine n'est pas forcément le site initial d'oxydation. Des enzymes, mais aussi des récepteurs cellulaires et des protéines de transport, peuvent être la cible de ces phénomènes oxydatifs et perdre leurs propriétés biologiques. Elles deviennent alors beaucoup plus sensibles à l'action des protéases. Les protéines oxydées se révèlent très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales. Elles vont alors former des amas anormaux dans et autour des cellules. Associés aux aldéhydes produits lors de la peroxydation lipidique, ces amas forment des dépôts de lipofuschines caractéristiques du vieillissement cellulaire. Aussi, des altérations peuvent concerner les protéines impliquées dans le maintien de gradients ioniques entre les cellules et les fluides extracellulaires. C'est le cas des pompes à calcium ou à potassium. Ces protéines sont essentielles dans la genèse du signal électrique des cellules musculaires et nerveuses. On comprend donc aisément les conséquences de leur dénaturation oxydative au sein de l'organisme (*Chabbaud, 2007*).

Lipooxydation : c'est la réaction d'une protéine avec un aldéhyde produit au cours de la réaction de peroxydation lipidique. L'accumulation de lipoprotéines oxydées au niveau de la paroi vasculaire et un dysfonctionnement endothélial sont notamment à l'origine de l'athérosclérose qui est une pathologie chronique d'évolution lente de l'intima des artères (*Clémentine P. , 2013*).

Glycooxydation : les protéines vont se lier avec le glucose qui est sous forme aldéhydique. Les produits de réaction sont appelés produits de glycation avancée. Dans le cas du diabète, qui se traduit par une augmentation de la glycémie ; les tissus sont, à terme, imprégnés de glucose entraînant ainsi une hyperproduction des ROS via notamment la formation de produits de glycation avancée. Les ROS en excès vont alors altérer la paroi des vaisseaux et induire des complications vasculaires : micro et macro angiopathies (*Clémentine P. , 2013*).

2.1.4 Antioxydants

Pour se protéger des effets délétères des ROS, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes (**Figure 9**).

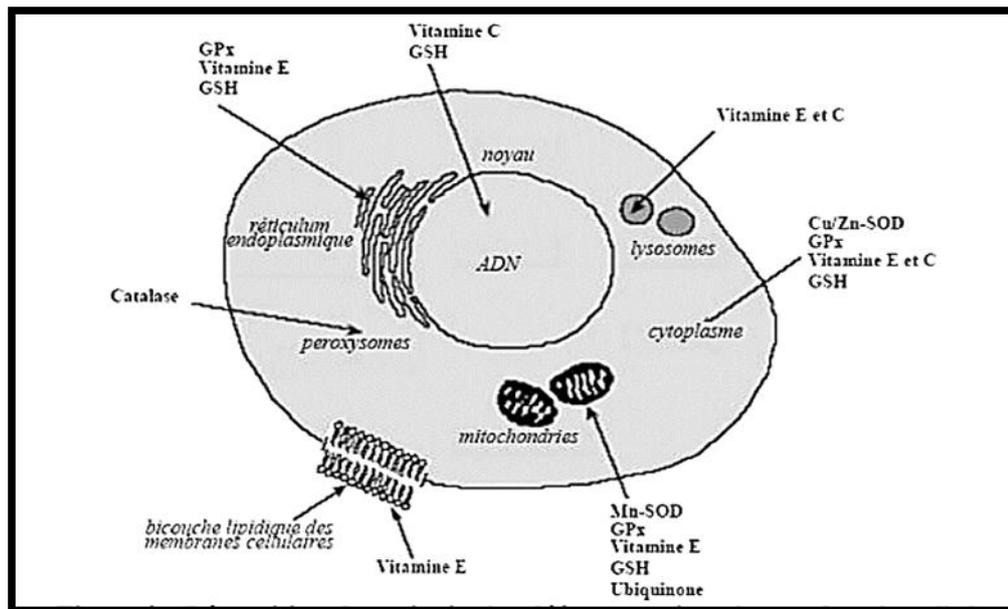


Figure 9: Répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule.

(Benaraba, 2007)

2.1.4.1 Système antioxydant enzymatique

La première ligne de défense de notre organisme contre les ROS sont les antioxydants enzymatiques tels que :

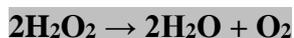
2.1.4.1.1 Superoxyde dismutase (SOD)

Ces métalloprotéines, qui représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant, assurent l'élimination de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. Chez l'homme, on décrit 3 isoenzymes : la Cu/Zn-SOD1 cytosolique, la Mn-SOD2 mitochondriale et la Cu/Zn-SOD3, qui diffèrent par la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire. La SOD3 est sécrétée par les cellules musculaires lisses et constitue le système antioxydant majeur de la paroi artérielle : son expression et sa sécrétion sont augmentées par les facteurs vasoactifs (histamine, endothéline 1, angiotensine II) et diminuées par l'homocystéine (Haleng *et al.*, 2007).

La SOD catalyse la dismutation des anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et oxygène moléculaire (Equation 2).

2.1.4.1.2 Catalase

La catalase ou CAT (EC 1.11.1.6) est une protéine hémique qui catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire selon la réaction suivante :



Équation 6 : La réaction catalysée par la catalase.

La catalase se trouve dans les hématies et dans les peroxysomes de nombreux tissus et cellules. Cette compartimentation l'empêche d'être un accepteur pour l' H_2O_2 formé dans le cytosol et les mitochondries (*Januel, 2003*).

2.1.4.1.3 Glutathion peroxydases

La glutathion peroxydase est une enzyme formée de quatre sous unités contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine. La GPx est présente dans les liquides extracellulaires (sang) et dans les cellules au niveau du cytoplasme et des membranes. Elle assure la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau, des hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools (ROH) et des espèces radicalaires en espèces nonradicalaires, grâce à la présence de glutathion réduit (GSH), selon les mécanismes suivants :

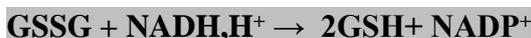
GPx (Se)



Équation 7 : Réactions de la glutathion peroxydase.

2.1.4.1.4 Glutathion réductase

Les molécules toxiques sont ainsi transformées en molécules assimilables comme l'eau et l'alcool. Dans chacune de ces réactions, une molécule de glutathion oxydée GSSG est obtenue. Pour que cette réaction perdure, il doit y avoir un taux constant de GSH, ce qui est rendu possible par la glutathion réductase (GR). Elle catalyse la réduction du GSSG en GSH (**Equation 08**), à l'aide du cofacteur NADPH sous forme réduite (NADPH, H^+). Le NADPH, H^+ provient de l'oxydation du glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconate par la glucose-6-phosphate déshydrogénase, de la voie des pentoses phosphates. (*Auberval, 2010*).



Équation 8 : Réduction du GSSG en GSH par la glutathion réductase.

La glutathion S transférase (GST) réduit les hydroperoxydes en alcools mais ne réduit pas H₂O₂. (*Benaraba, 2007*).

2.1.4.1.5 Thiorédoxine

Le milieu intracellulaire est plutôt réducteur, les protéines contiennent des groupements thiols libres et les ponts disulfures sont rares. L'antioxydant majeur responsable du maintien des protéines à l'état réduit est la thiorédoxine qui sera régénérée par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase (TrxR) qui possède un groupement sélénocystéine dans son site actif. Elle intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène, ainsi que dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique (*Haleng et al 2007*).

2.1.4.1.6 Hème Oxygénase-1

C'est une enzyme inductible et ubiquitaire qui dégrade l'hème en fer ferreux (Fe²⁺), monoxyde de carbone (CO) et biliverdine. Cette dernière est ensuite transformée par la biliverdine réductase en bilirubine, puissant antioxydant.

2.1.4.2 Systèmes antioxydants non enzymatique

Les antioxydants non enzymatiques comprennent des molécules qui sont apportés par l'alimentation (exogènes) et autres molécules dont dispose l'organisme (endogènes).

2.1.4.2.1 Molécules antioxydantes endogènes

2.1.4.2.1.1 Glutathion

Le glutathion est formé par la condensation de trois acides aminés (acide glutamique, cystéine et glycine). Il est la source majoritaire de résidus thiols (-SH) dans la cellule où il est présent sous forme réduite (GSH). En condition physiologique normale, sa forme oxydée (GSSG) est présente en très faible concentration. Le rapport GSH/GSSG est un excellent marqueur de la peroxydation lipidique. Ce rapport tend à diminuer lors d'un exercice physique intense et au cours du vieillissement (*Guerin-Dubourg, 2014*).

Le glutathion présente deux caractéristiques structurales : une liaison γ -carboxyle entre les résidus glutamate et cystéine, et un groupement thiol porté par le résidu cystéine. La liaison γ -carboxyle étant un type de liaison peu fréquent et hydrolysée uniquement par la gamma-Glutamyl-Transpeptidase (γ GT), le glutathion est donc métabolisé de façon extracellulaire par les cellules exprimant la γ GT, et est ainsi plus résistant à la dégradation intracellulaire (**Figure 10**) (*Clémentine P., 2013*).

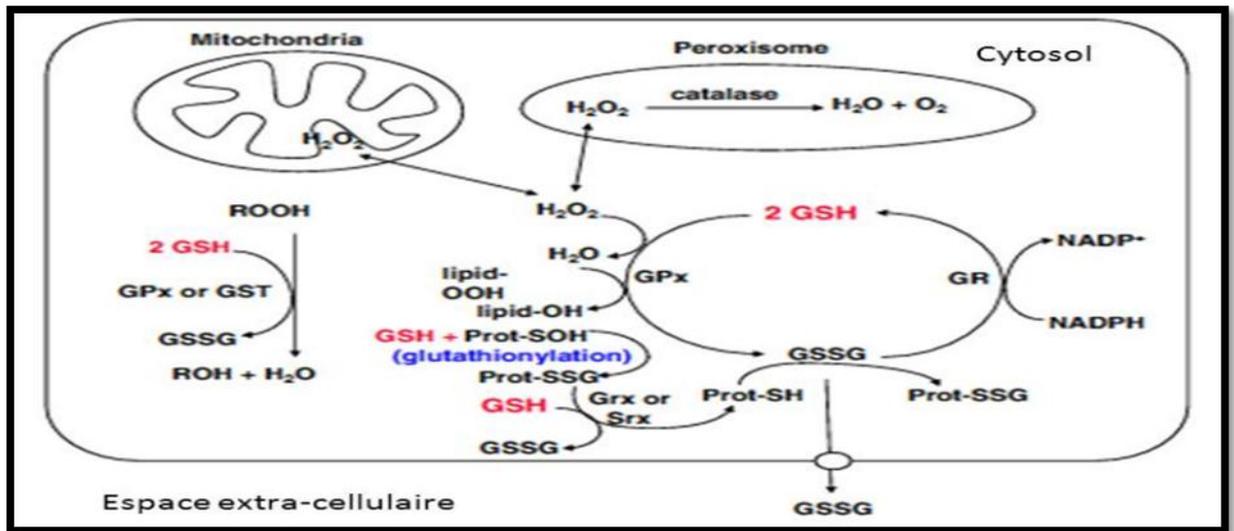


Figure 10 : Les réactions impliquant le glutathion. (Clémentine P., 2013).

2.1.4.2.1.2 Coenzyme Q10

Le coenzyme Q10, appelé ubiquinone en raison de son ubiquité dans les cellules, est un dérivé benzoquinolique avec une longue chaîne latérale isoprénique. Cette chaîne latérale confère à la molécule un caractère lipophile qui lui permet de s'insérer dans les membranes et les lipoprotéines. Il joue un rôle essentiel dans la chaîne mitochondriale de transport d'électrons et est un puissant inhibiteur de peroxydation lipidique, en synergie avec la vitamine E. S'il n'existe pas d'apport journalier recommandé pour cet antioxydant, il semble toutefois qu'il soit nécessaire d'en ingérer au moins 30 mg par jour. Il est à noter que la synthèse de cet antioxydant est en tout point parallèle à celle du cholestérol. La formation de ces deux molécules dépend en effet de l'acide mévalonique formé à partir de la transformation de la HMG CoA(3-hydroxy-3 methylglutaryl-CoA) par la HMG-CoA réductase. Ou, les agents hypocholestérolémiants comme les statines agissent en inhibant cette dernière enzyme, ce qui a comme effet secondaire une réduction significative du taux plasmatique d'ubiquinone. Connaissant le rôle de cette dernière au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, on comprend pourquoi les personnes prenant des statines se plaignent régulièrement de douleurs musculaires (Haleng *et al.*, 2007).

2.1.4.2.2 Molécules antioxydant exogènes

2.1.4.2.2.1 Oligoéléments

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action prooxydante (réaction de Fenton, d'Haber-Weiss) (*Baratli, 2015*).

2.1.4.2.2.2 Polyphénols

Les polyphénols ont un effet antioxydant par leurs interactions directes avec l' O_2^- et les autres ROS tels que OH^- et $ONOO^-$. Les polyphénols peuvent aussi protéger l'endothélium via leurs effets sur les LDL oxydées, qui jouent un rôle précurseur dans la dysfonction endothéliale. Il a été démontré que la dysfonction endothéliale induite par les LDL oxydées peut être renversée par les antioxydants polyphénoliques (*Baratli, 2015*).

2.1.4.2.2.3 Vitamines

Tableau 2 : Les apports exogènes de vitamines nécessaires à l'homme. (Malika et al., 2009)

Vitamines	Propriétés	Fruits, légumes,	Apports journaliers recommandés
<p><u>Vitamine C</u> (Acide ascorbique)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Hydrosoluble, co-substrat de plusieurs oxygénases et oxydases. - In vitro, maintient la vitamine E sous sa forme réduite, active lors de l'inhibition de la peroxydation lipidique membranaire 	<ul style="list-style-type: none"> - Fruits, légumes, feuillés (forte concentration dans la cassis, les agrumes, les kiwis, les poivrons, les brocolis, le chou et le persil). Souvent utilisée comme additif dans agroalimentaire. 	<ul style="list-style-type: none"> - Une orange, un kiwi sont suffisants (les effets de carence sont bien connus ; a fortes doses, un effet prooxydant a été décrit).
<p><u>Vitamine E</u> (8 composés proches dont 4 tocophérols et 4 tocotriénols)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Hautement lipophiles, se concentrent dans les membranes biologiques et les lipoprotéines. - Agissent via la peroxydation lipidique des acides gras insaturés. - Propriétés immunostimulantes sur l'immunité humorale et cellulaire et la phagocytose. 	<ul style="list-style-type: none"> - Huiles végétales et produits dérivés (pépins, germe et grain de blé, noix et certains légumes à feuilles verts (peu dans les fruits, baies et légumes). 	<ul style="list-style-type: none"> - Une cuiller à soupe d'huile de tournesol, ou 2 d'huile de colza, ou une petite tasse de noix
<p><u>Caroténoïdes</u> (Composés pigmentés colorant de jaune à rouge de nombreux fruits et légumes. Le β-carotène est un précurseur de la vitamine A*)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Lipophiles comme la Vit E, donc présents dans Les compartiments lipidiques des tissus. - Puissants neutralisateurs des dérivés activés de l'oxygène, comme l'oxygène singulet et les radicaux peroxydes. - Contribuent également à la protection contre la peroxydation donc la réduction du risque cardiovasculaire. - Peuvent avoir un effet prooxydant, voire cancérigène. 	<ul style="list-style-type: none"> - Carotte (α-β carotène) Tomate et melon (lycopène) Agrumes (β-crypto xanthine) Épinards et endives (β-carotène et lutéine) Maïs (zeaxanthine). 	<ul style="list-style-type: none"> - Pas d'AJR pour les caroténoïdes seuls mais un mélange de fruits et de légumes (5/jour) est fortement conseillé (cf.PNNS) (à fortes doses, la vitamine A peut être responsable d'hypertension intracrânienne).

2.2 Implication de stress oxydant dans le diabète

2.2.1 Relation entre le diabète et le stress oxydant

Le diabète se traduit par une augmentation du glucose qui va entraîner l'activation de différentes voies dont la formation de produits de glycation avancés qui aboutissent à un stress oxydant à long terme. Les défenses antioxydantes sont diminuées et les réactions prooxydantes augmentées (production d'espèces réactives de l'oxygène, oxydation des lipides...). Cela va induire une destruction des cellules bêta du pancréas, cellules sécrétrices d'insuline, ainsi qu'une altération de l'action de l'insuline qui vont provoquer une augmentation de glucose et donc du diabète (**Figure 11**) (Clémentine P. , 2013).

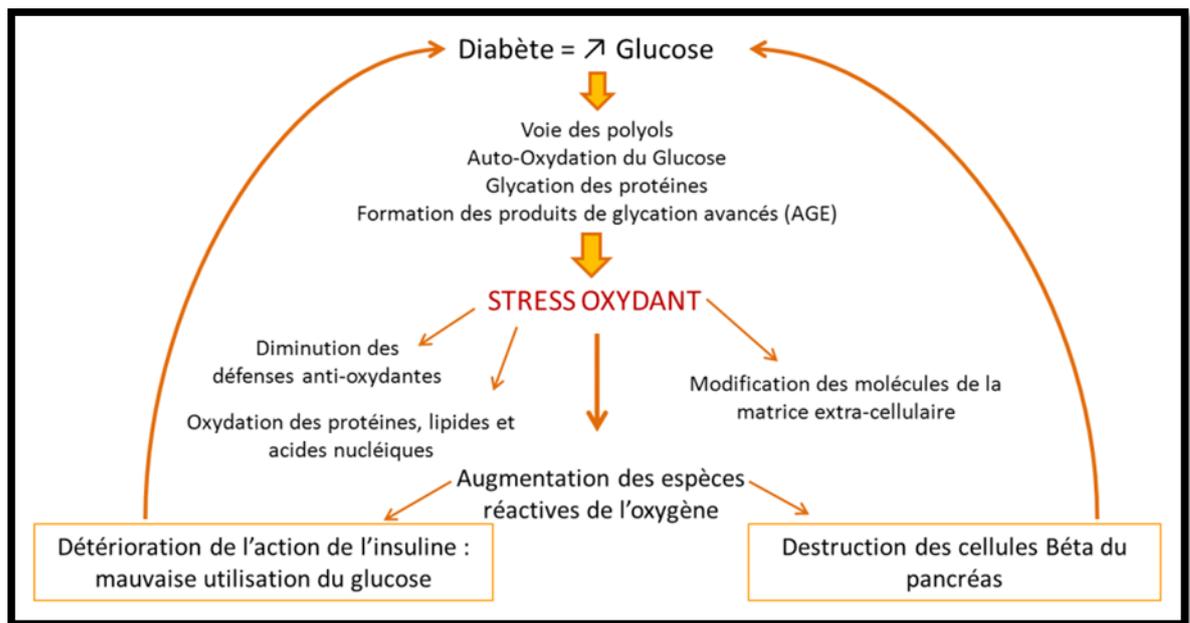


Figure 11 : Diabète et stress oxydant (Clémentine P. , 2013).

2.2.1.1 Défenses antioxydantes des cellules β

Les cellules β pancréatiques sont très vulnérables au stress oxydant d'autres cellules expriment peu les enzymes antioxydantes classiques, ce qui les rend particulièrement sensibles aux dommages infligés par le stress oxydatif. Il en est ainsi des cellules β pancréatiques qui sont particulièrement pauvres en catalase, glutathion peroxydase et CuSOD par rapport aux hépatocytes alors qu'elles expriment d'autres enzymes antioxydantes comme la MnSOD mitochondriale.

2.2.1.2 Effet du stress oxydant sur l'insulinorésistance

Les ROS sont également impliquées dans l'insulinorésistance. Des études sur des cellules en culture démontrent que les ROS inhibent la transduction du signal de l'insuline. Elles empêchent l'autophosphorylation du récepteur à l'insuline et par conséquent celle

de la protéine IRS-1, conduisant à un blocage des voies en amont de la PI3K. La translocation du récepteur GLUT4 est alors inhibée ne permettant pas l'entrée du glucose dans la cellule. (**Figure 12**) En effet des concentrations de l'ordre du micromolaire en peroxyde d'hydrogène suffisent à inhiber l'autophosphorylation du récepteur à l'insuline sur des cellules en culture entraînant ou favorisant l'insulinorésistance (*Auberval, 2010*).

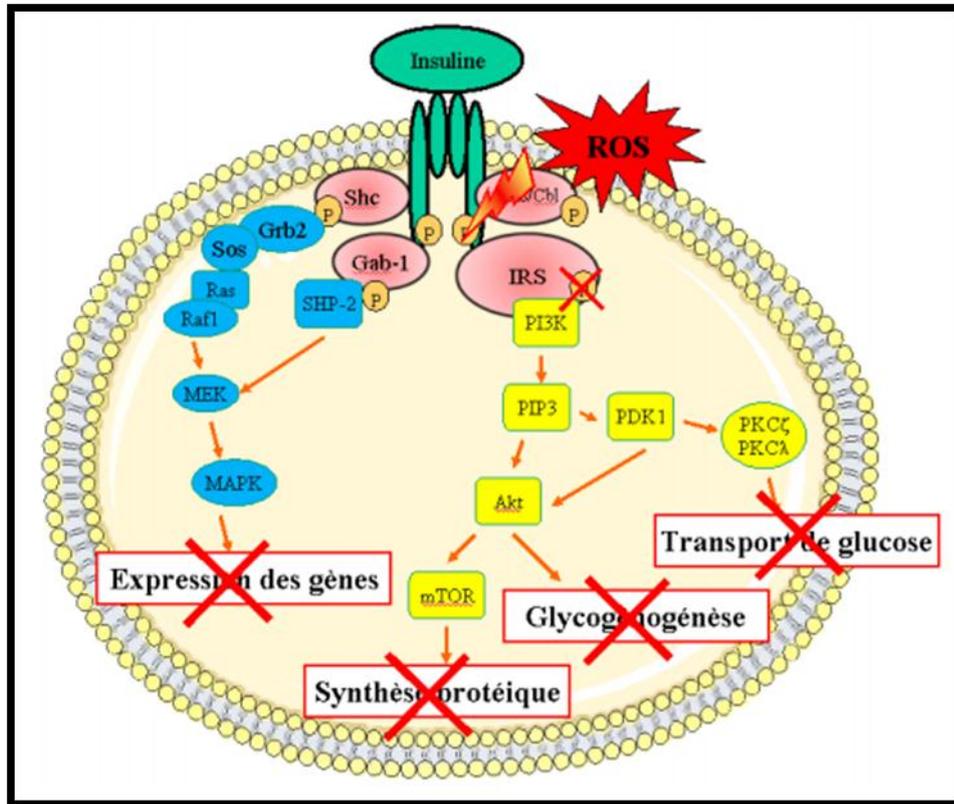


Figure 12 : Mécanisme de la résistance à l'insuline induit par les stress oxydant (*Auberval, 2010*).

2.2.2 Glucotoxicité et le stress oxydant

2.2.2.1 Voie des polyols

Dans des conditions physiologiques normales, le glucose est métabolisé en glucose-6-phosphate par l'hexokinase puis est dirigé soit dans la voie de la glycolyse, soit dans la voie des pentoses phosphates (**Figure 13**). Dans le diabète, lorsque le taux de glucose augmente, l'hexokinase est alors saturée et le glucose en excès est métabolisé par la voie des polyols. Cette voie fait intervenir deux enzymes en cascade: l'aldose réductase et la sorbitol déshydrogénase. L'aldose réductase, qui n'est active qu'à de fortes concentrations de glucose du fait de sa faible affinité pour celui-ci, réduit le glucose en sorbitol (**Figure 16**). Le donneur d'hydrogène est le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) qui est oxydé en NADP^+ . Cette enzyme est particulièrement étudiée car elle est

régulée par l'hyperosmolarité (*Smardo et al., 1992*) et il semble que son expression soit augmentée dans le diabète (*Ghahary et al., 1989; Shimizu et al., 2000*)

La deuxième enzyme de la voie des polyols, la sorbitol déshydrogénase, oxyde une partie du sorbitol formé en fructose, en utilisant le NAD^+ comme cofacteur (**Figure 13**).

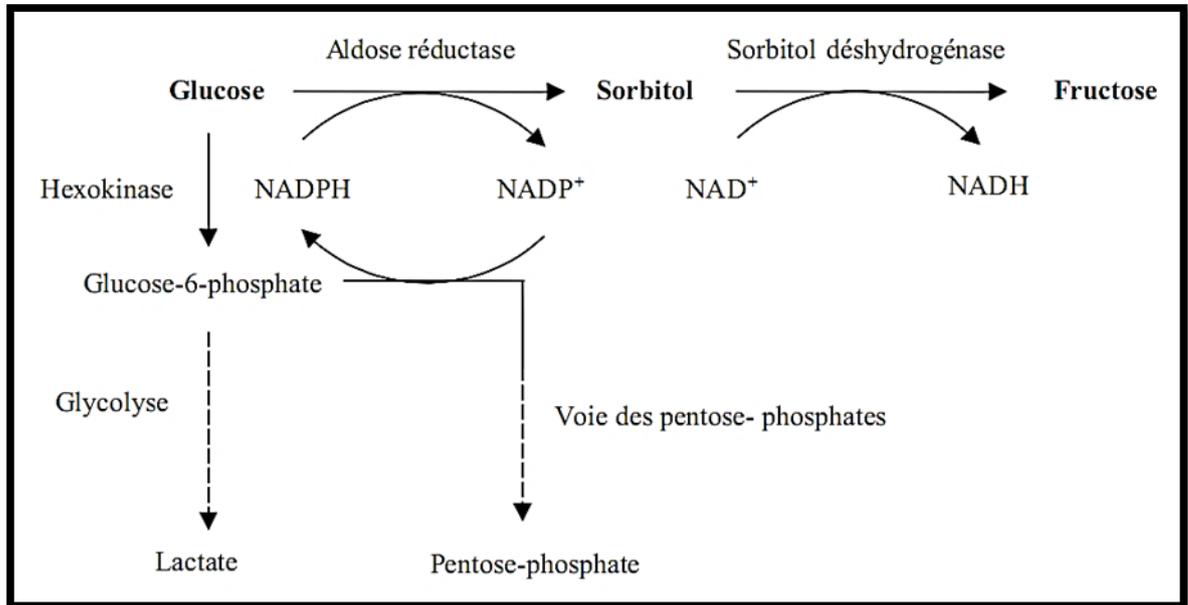


Figure 13 : Voie de sorbitol (*Audrey, 2002*).

La métabolisation du glucose en excès par la voie des polyols a deux conséquences principales : un stress osmotique intracellulaire et une altération du potentiel redox des cellules. Tout d'abord, comme le sorbitol formé traverse difficilement les membranes, celui-ci s'accumule dans la cellule. L'hyperosmolarité intracellulaire résultante pourrait être responsable de la déplétion en d'autres osmolytes organiques comme le myoinositol ou la taurine. La déplétion intracellulaire en myoinositol entraînerait une diminution de la synthèse des phosphoinositides, ayant des conséquences négatives sur l'homéostasie du calcium intracellulaire, l'activation de la protéine kinase C et l'activité de la pompe Na^+/K^+ ATPase. Mais la principale conséquence de l'activation de la voie des polyols semble être la modification du potentiel redox des cellules. En effet, la voie des polyols consomme du NADPH et du NAD^+ , au détriment d'autres réactions qui requièrent également ces cofacteurs (Figure 14). En particulier, la glutathion réductase, enzyme majeure pour la régénération du glutathion réduit, utilise des niveaux élevés de NADPH. La diminution des ressources en NADPH pour le cycle redox du glutathion pourrait augmenter le stress oxydant dans de nombreux tissus et contribuer ainsi à la pathogenèse des complications diabétiques comme la rétinopathie. La voie des polyols rentre également en compétition avec d'autres réactions nécessitant du NADPH, comme la synthèse de NO par la NO

synthase. Or il a été montré que la production de NO était déficiente chez les patients diabétiques (*Calver et al., 1992*), et ce déficit est prévenu par une inhibition de l'aldose réductase chez des rats diabétiques (*Cameron et Cotter, 1992*).

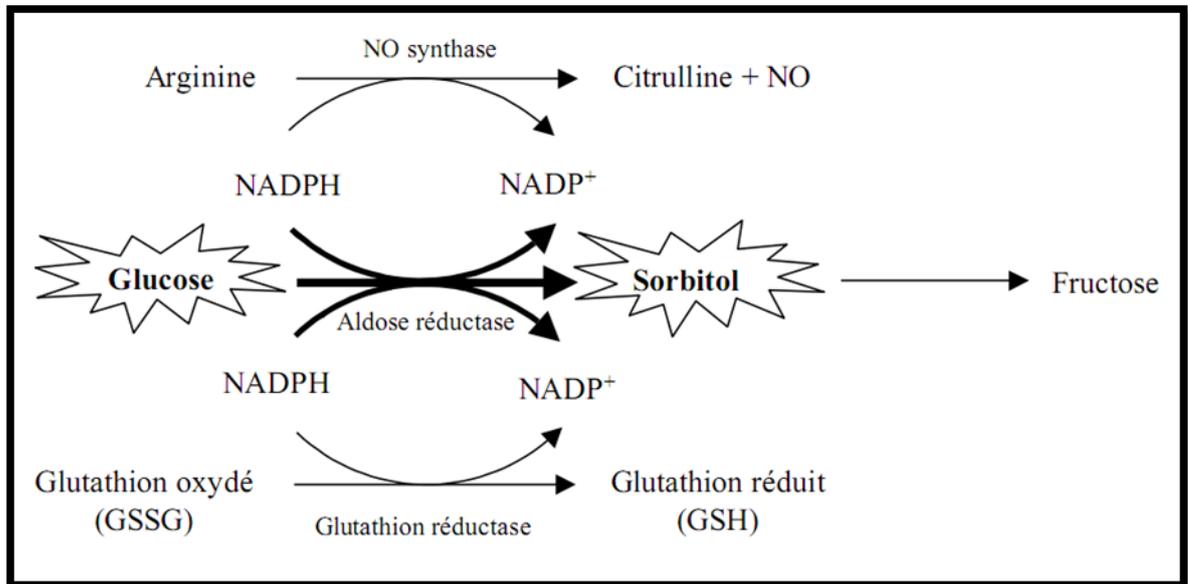


Figure 14 : Compétition de diverses réactions pour le NADPH (*Audrey, 2002*).

2.2.2.2 Glycation non enzymatique des protéines

La glycation non enzymatique, qui augmente au cours de l'hyperglycémie prolongée résulte de la réaction entre une fonction amine des protéines et un ose comme le glucose ou le ribose-5P avec production de fructosamines et autres ketoamines. Ces dernières sont ensuite converties en α -dicarbonyls (méthylglyoxal...) et plus lentement et de façon irréversible en produits de la glycation avancée (Advanced Glycation End-products ou AGE) qui ne peuvent être éliminés que par dégradation des protéines glyquées. Il existe cependant deux enzymes de déglycation des protéines, la fructosamine 3-kinase (FN3K) et la FN3K-RP (FN3K related protein) qui sont exprimées dans un grand nombre de tissus, y compris dans les cellules β pancréatiques. Ces enzymes phosphorylent les cetoamines en cetoamine 3-phosphates instables qui se décomposent spontanément pour régénérer la fonction amine non glyquée en libérant du phosphate inorganique et de la 3-déoxyglucosone et autres α -dicarbonyls (*Delpierre, 2003*); (*Collard, 2004*).

La 3-déoxyglucosone est elle-même un puissant agent glycant responsable de la formation d'AGE, mais peut être détoxifiée par les cellules.

Les AGE induisent une activation de la voie du complément, une fuite protéique urinaire, une rigidification des vaisseaux et contribuent à la formation de la plaque d'athérome. Toutes ces conséquences physiologiques sont dues au fait que les AGE entraînent une modification de la structure et de la fonction des protéines et des lipoprotéines (LDL). De plus, les AGE sont les agonistes de récepteurs cellulaires appelé RAGE. La stimulation du RAGE par les AGE est génératrice d'un stress oxydant via l'activation de la NADPH oxydase. Le stress oxydant induit par l'activation de la NADPH oxydase stimule le facteur de transcription NFκB, qui est à l'origine de phénomènes pro inflammatoires. **(Figure 14) (Bertry, 2011).**

2.2.2.3 Activation de la protéine kinase C

Contrairement à ce que laisserait supposer l'activation de la voie des polyols, plusieurs travaux ont montré une activation de la protéine kinase C (PKC) au cours du diabète dans de nombreux tissus. Dans la rétine, ce sont les isoformes βII et δ qui sont les plus spécifiquement activées. Ainsi, in vitro, l'activité de la PKC est augmentée dans les membranes de cellules endothéliales rétinienne incubées en présence d'une forte concentration en glucose. Le mécanisme responsable de cette activation semble être lié principalement à une augmentation de la synthèse de diacylglycérol (DAG) à partir des intermédiaires de la glycolyse. Il semble que le stress oxydant puisse être également responsable de l'activation de la PKC, puisque l'utilisation d'antioxydants comme la vitamine E ou le probucol prévient cette activation et corrige le flux vasculaire rétinien de rats diabétiques. Les conséquences de l'activation de la PKC par l'hyperglycémie sont multiples. Il a été rapporté une activation de la phospholipase A2 cytosolique, entraînant la libération d'acide arachidonique, la formation de prostaglandine E2, et l'inhibition des pompes Na⁺/K⁺ATPases **(Audrey, 2002).**

2.2.2.4 Voie des hexosamines

La voie des hexosamines est activée lorsque le fructose-6-phosphate produit à partir du glucose n'est pas entièrement pris en charge par la glycolyse. Il est alors converti par la GFAT (glucosamine fructose-6 phosphate amidotransférase) en glucosamine-6 phosphate et finalement en uridine diphosphate N-Acétyl glucosamine (UDPGlcNac). Sous cette forme, la glucosamine se fixe alors aux résidus sérine et thréonine de certains facteurs de transcription et les active **(Figure 15).** C'est le cas notamment du facteur ubiquiste SP1 qui entraîne une augmentation de l'expression de PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) et du TGF-β impliqués dans l'occlusion des capillaires de l'aorte. De même, l'augmentation

du flux de glucose dans cette voie métabolique altérerait l'activité et la translocation à la membrane des transporteurs GLUT4 dans les adipocytes et les cellules musculaires (Audrey, 2002).

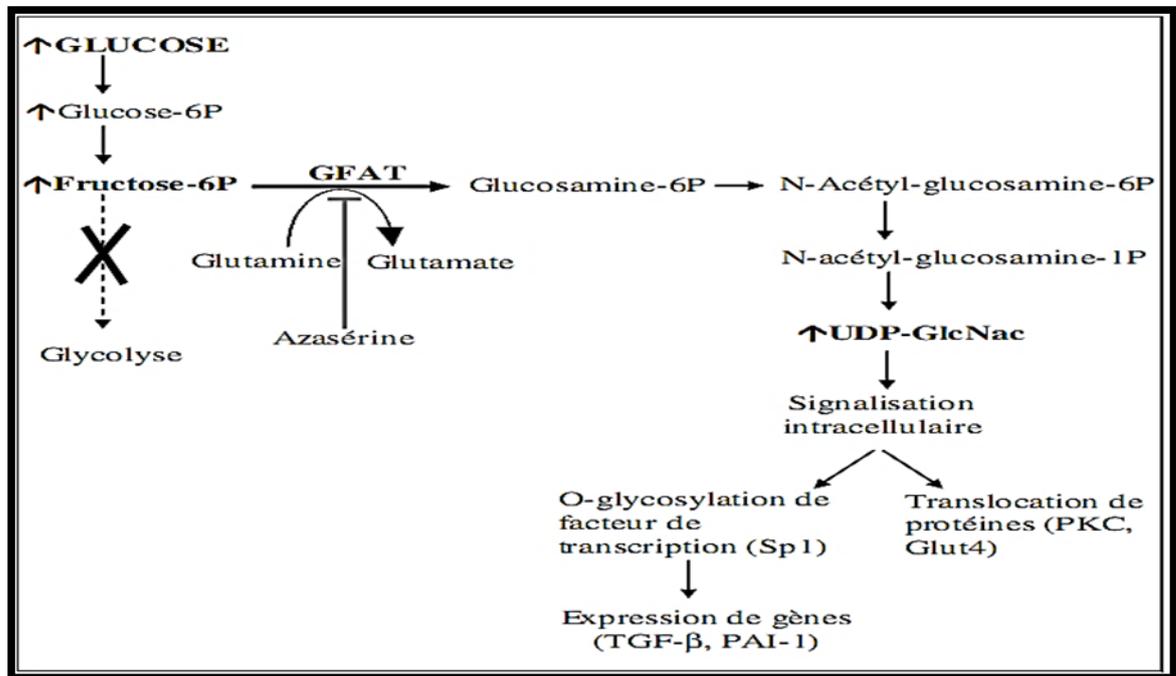


Figure 15 : Stimulation de la voie des hexosamines par l'hyperglycémie et conséquences (Audrey, 2002).

Chez l'homme, l'hyperglycémie associée au DT2 s'accompagne d'une activation de la voie des hexosamines et les complications vasculaires qui en résultent font de la GFAT une cible nouvelle dans la recherche de médicaments traitant le DT2. Son activité peut être inhibée selon un rétrocontrôle négatif par son produit UDP-GlcNac mais également par l'azasérine, ce qui pourrait réduire la prolifération des cellules endothéliales et la prolifération de la matrice extracellulaire impliquées dans la pathogenèse de la rétinopathie diabétique. (Bertry, 2011).

L'activation de la voie des hexosamines conduit à :

- L'augmentation de l'expression des facteurs de croissance TGF- α et TGF- β qui sont à l'origine de certaines complications diabétiques comme l'épaississement de la membrane basale des capillaires. Elle conduit aussi à l'augmentation de la production de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 (PAI-1) suite à l'O-GlcNac-glycosylation du facteur de transcription Sp1. Le facteur

plasminogène joue un rôle dans la fibrinolyse, donc, son inhibition entraîne un effet procoagulant. (Bertry, 2011).

- L'inhibition de la NO synthase endothéliale par O-GlcNAc-glycosylation de cette enzyme.

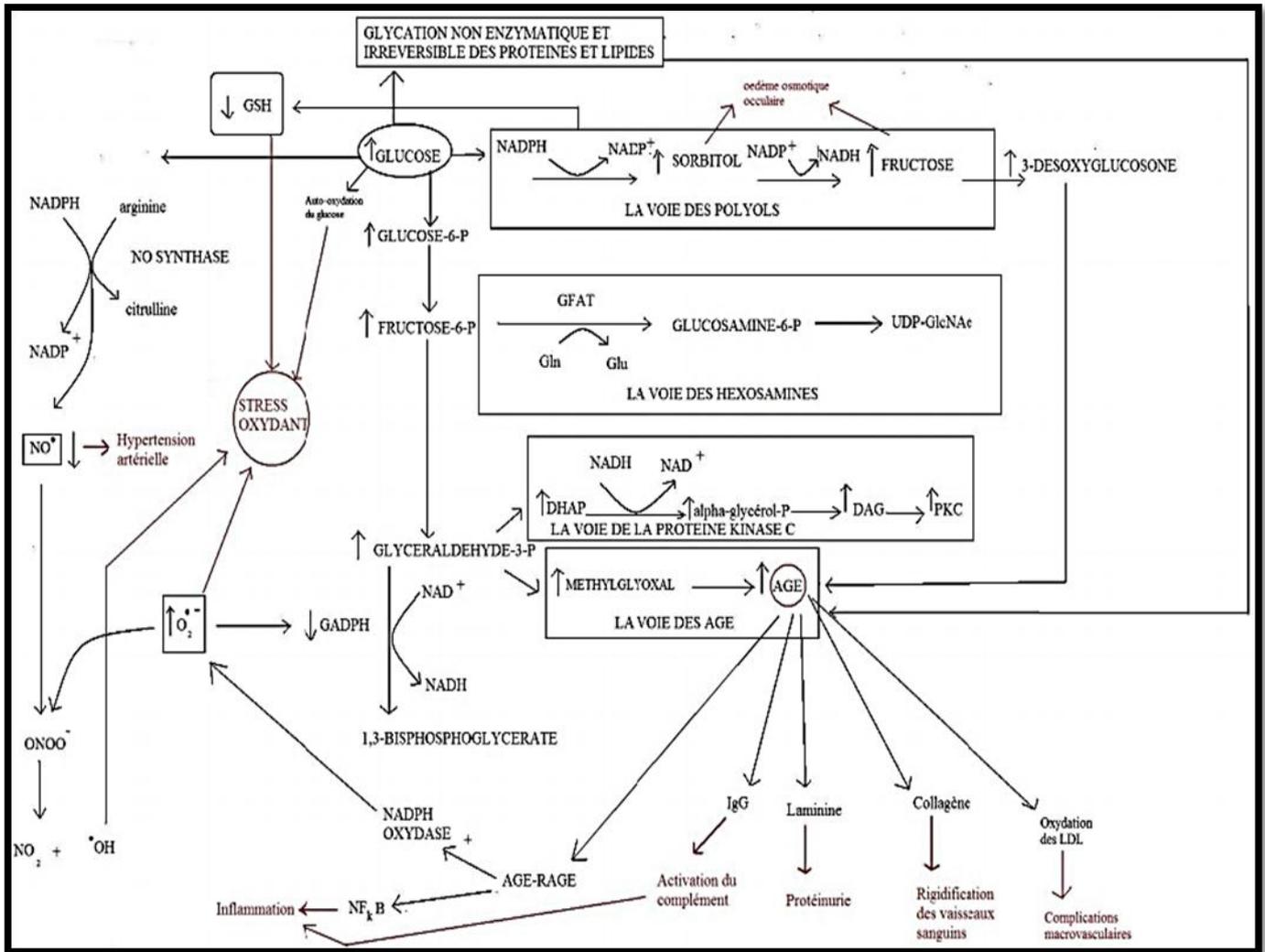


Figure 16 : Les voies et les complications biochimiques et physiopathologiques liées à l'hyperglycémie chronique et le stress oxydant (Bertry, 2011).

DEUXIEME PARTIE :
PARTIE
EXPERIMENTALE

Méthodologie

La présente étude a été menée dans le but de vérifier l'hypothèse suivante :

« Les maladies métaboliques et plus spécifiquement le diabète sucré conditionné par une diminution de la défense antioxydante même s'il est équilibré ».

Dans le but d'évaluer l'état du stress oxydant chez les diabétiques ayant un diabète équilibré et leurs répercussions sur la genèse des complications

1. Protocole :

Nous avons travaillé sur 177 patients diabétiques (Type I et Type II) et 20 sujets sains (Témoin) auxquels nous avons effectué bilan biochimique complet

[Glycémie-HbA1c-Cholestérol Total – Triglycérides – HDL – LDL – Urée – Créatinine – TGO – TGP-Acid Urique- Phosphatase Alcaline - Bilirubine (T&D) -Protéine Totaux-Albumine].

Parmi ces patients nous avons choisis 40 patients ayant un diabète équilibré et un bilan biochimique assez normal plus les 20 sujets normaux, pour faire un dosage des paramètres de la défense antioxydante [**GPx**, **GSH**, **GST**] et un paramètre de la peroxydation lipidique « **MDA** » sériques et érythrocytaires.

La (**Figure 17**) schématise les différentes étapes du protocole expérimental utilisé.

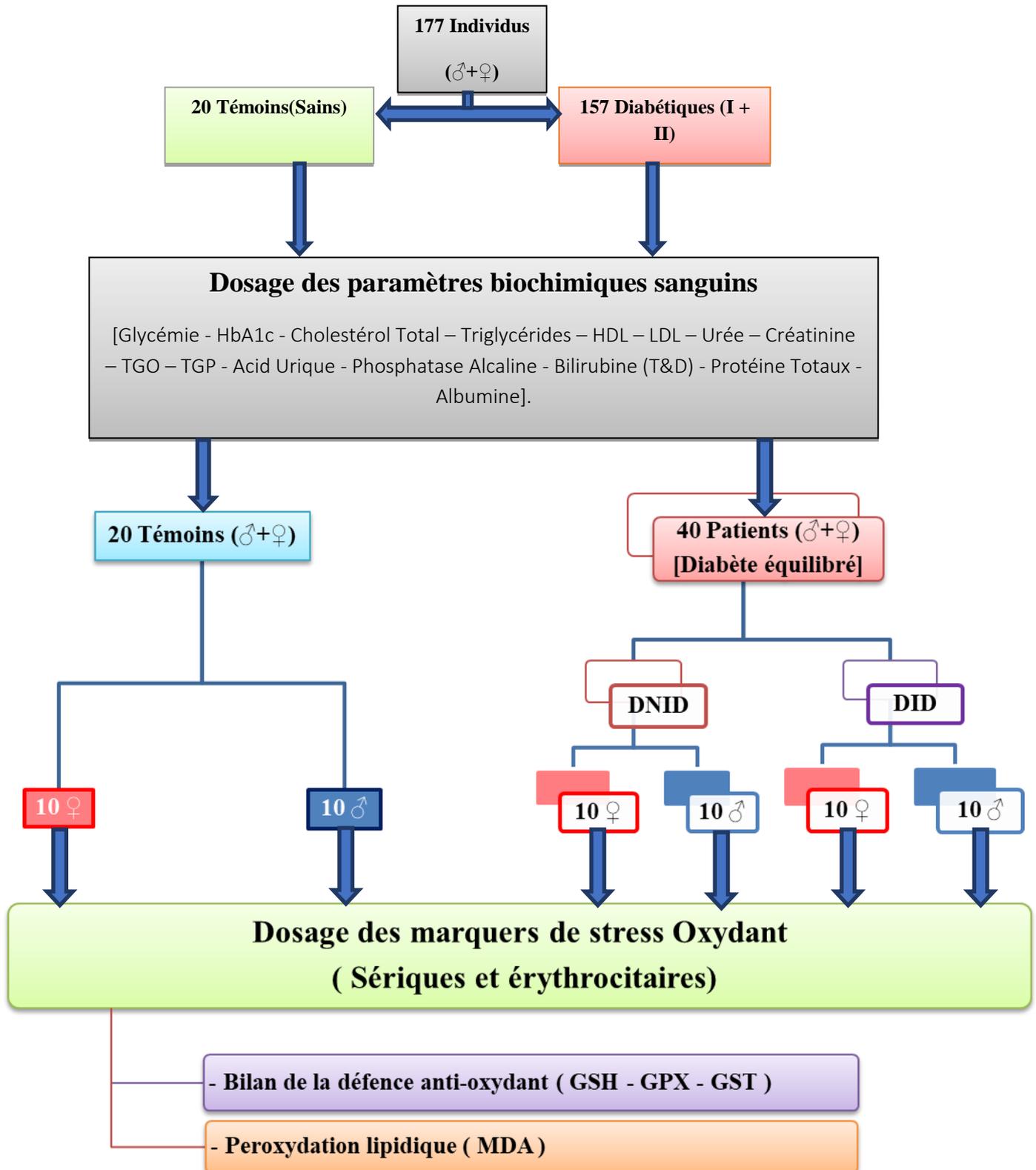


Figure 17: Schéma récapitulatif de protocole expérimental.

2. Déroulement de l'étude

L'étude s'est déroulée du 18/02/2017 au 28/03/2017. Après les démarches administratives pour l'obtention de l'autorisation d'accès aux établissements, nous sommes présentées et expliqué notre travail aux directeurs et au personnel des établissements concernés.

2.1 Lieux de l'étude

L'étude a été réalisée au niveau de deux structures hospitalières :

- L'établissement Public Hospitalier (*EPH*) *Bouguerra Boulaares Bekarria - Tébessa.*
- L'établissement Public Hospitalier (*EPH*) *Alia Saleh - Tébessa*

Les analyses ont été effectuées aux niveaux des trois laboratoires suivants :

- Laboratoire Centrale de *l'EPH Alia Salah.*
- Laboratoire Centrale de *l'EPH Bouguerra Boulaares Bekarria.*
- Laboratoire de biochimie de la faculté des SNV via de *L'Université De Tébessa.*

2.2 Pré enquête

Dans le but de s'assurer que les questions sélectionnées soient pertinentes et pouvant apporter l'information recherchée en rapport avec notre problématique, le questionnaire élaboré a été testé en réalisant une pré-enquête (enquête test) auprès de 10 sujets de notre entourage (famille, voisins ...). Cette pré-enquête nous a permis d'évaluer la pertinence des questions posées. Les observations et les remarques des sujets interrogés ont été prises en compte, certaines questions ont été modifiées. Ainsi le questionnaire définitif est devenu plus clair, compréhensible et adapté au besoin de notre travail.

2.3 Questionnaire

Il s'agit d'un questionnaire d'enquête par entretien. Avant chaque entretien, nous avons expliqué à chaque sujet le but de notre étude. Une fois le consentement obtenu, les sujets sont interviewés. L'entretien se terminait par les mesures anthropométriques (poids, taille). Chaque sujet a été interrogé durant 5 à 10 minutes. Les patients qui ont accepté d'être enquêtés ont fait l'objet d'un prélèvement de sang veineux.

Ainsi le questionnaire final nous a permis de recueillir les données suivantes :

- **L'identification de la personne enquêtée :** (Date d'hospitalisation, confirmation du diabète, type de diabète. Ces informations ont été mentionnées sur les dossiers des malades.)
- **Informations sociodémographiques :** Cette rubrique est consacrée aux renseignements sur : l'âge, le sexe, profession du patient, le lieu de résidence). Ce volet en plus de fournir des informations importantes pour cette étude il nous a permis de se familiariser avec les patients.
- **Le tabagisme, l'activité physique et hérédité :** Ces rubriques sont très importantes pour ce travail car chaque variable constitue un facteur de risque pour le diabète. Les données recueillies vont nous permettre d'étudier de près la relation entre ces facteurs de risque et le diabète.
- **La taille :** La mesure de la taille a été faite à l'aide d'un mètre ruban de couturière, le sujet toujours pied nu et le long d'un mur plat, nous avons tracé la hauteur puis nous avons mesuré avec le mètre ruban (faute de la non disponibilité d'une toise).
- **Le poids :** La mesure du poids a été réalisée sur une pèse personne "TIAN SHAN - 2003A" plage de mesure son capacité de 180 Kg (396 IB), sa précision est de 100 g pour un kg, chaque sujet doit enlever les vêtements lourds et les chaussures, se tenir debout et droite sur la pèse.
- **Maladies associées :** Ces rubriques sont très importantes pour ce travail par ce qui nous permet de connaître si le patient souffre d'autres complications diabétiques comme l'Hypertension artérielle, maladie coronarienne, maladie des artères périphériques, rétinopathie, maladie cérébrovasculaire, néphropathie diabétique, neuropathie diabétique, etc.)

2.4 Le prélèvement sanguin

Les prélèvements ont été réalisés classiquement sur des patients à jeun entre 8h et 10h du matin, le sang veineux est récupéré sur deux tubes de prélèvement contenant des anticoagulants différents et un tube sec, selon les exigences des fiches techniques des examens biochimiques à réaliser :

- Un tube à EDTA comme anticoagulant, pour le HbA1C.
- Un tube hépariné pour le dosage des paramètres biochimiques (protéines sériques, ionogramme et autres dosages ...).

Après avoir effectué le bilan biochimique, le reste de sérum des tubes sec et le sang des tubes EDTA et hépariné ont été transmis au congélateur dans le laboratoire de la fac pour conservation à -80 C° pour le dosage de bilan de stress oxydant.

2.5 Lotissement :

Les sujets sont répartis en 3 lots :

Lot Témoins : sains constitués des sujets normaux (n = 20 / 10♂ + 10♀).

Lot DID : constitué des sujets qui ont un diabète insulino-dépendant (n = 20 / 10♂ + 10♀).

Lot DNID : constitué des sujets qui ont un diabète non-insulino-dépendant (n = 20 / 10♂ + 10♀).

3. Réalisation du dosage des paramètres biologiques :

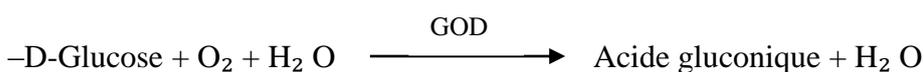
Le sérum récupéré par centrifugation est déposé dans un analyseur automatique de marque (Mindray BS-200) et le résultat est affiché sur l'écran, ensuite il est imprimé par une imprimante attachée à l'automate.

3.1 Méthodes des paramètres biochimiques

3.1.1 Glycémie

Principe

Les mesures sont réalisées sur du sérum par la méthode à la GOD et la fiche technique Spinreact. Le glucose est transformé par la glucose oxydase (GOD) en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce dernier, en présence de peroxydase (POD), oxyde le chromogène incolore (4-aminophénazone) en un composé coloré en rouge (quinoneimine) (*Kaplan, 1984 ; Trinder, 1969*), selon les réactions suivantes : β



Dans un tube sec 10 µl sérum d'échantillon sont ajoutés à 1ml de réactif de glucose [(GOD : 1500U/L, POD : 1000 U/L, 4 aminophénazone : 2.6 m.mol/l) dissout dans un tampon tris pH 7.4 contenant 3 mmol/l du phénol], incubation à 37°C pendant 10 minutes, lecture contre un blanc réactif à 500 nm avec utilisation d'un étalon.

Calculs

$$[\text{Glucose}] \text{ (mg/dl)} = \frac{\text{(A) Echantillon}}{\text{(A) L'étalon}} \times 10 \text{ (concentration d'étalon)}$$

3.1.2 Hémoglobine glycosylée

Principe

Cette méthode de Spinreact utilise l'interaction entre l'antigène et l'anticorps, afin de déterminer directement la HbA1c totale dans le sang. L'hémoglobine totale et la HbA1c ont la même absorption non spécifique pour les particules de latex. En cas d'ajout de l'anticorps monoclonal anti-HbA1c(souris) (R2), un complexe latex - HbA1c - anticorps HbA1c de souris est formé. Une agglutination a lieu lorsque l'anticorps polyclonal IgG de chèvre antisouris interagit avec l'anticorps monoclonal. La quantité d'agglutination est proportionnelle à la quantité de HbA1c absorbée sur la surface des particules de latex. La quantité d'agglutination est mesurée comme absorbance. La valeur de HbA1c est obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (*American diabetes association, 2001*).

Méthode

- On Ajuste le spectrophotomètre à zéro par rapport à l'eau distillée.
- On prend R1 360 µL (Anticorps monoclonal anti-HbA1c (souris) 0,05 mg/mL, anticorps polyclonal IgG de chèvre anti-souris 0,08 mg/dL) + échantillon (µL) 10
- Mélanger et incuber pendant 5 minutes à température ambiante.
- On rajoute R2 120 µL
- Mélanger et lire l'absorbance (A) à 660 nm, 5 minutes après l'ajout du Réactif R2. (Tietz, 1999)

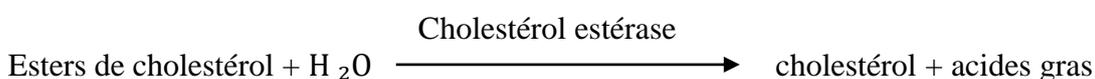
Calculs

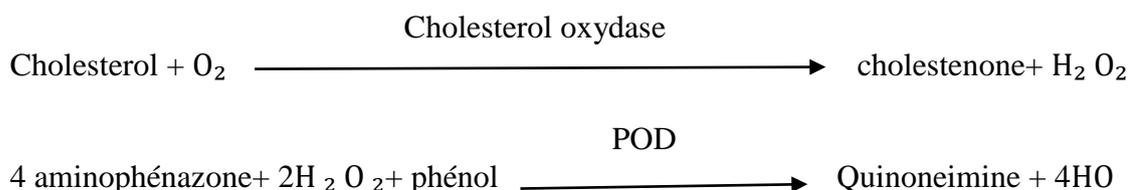
On Représente l'absorbance (A) obtenue par rapport aux concentrations de HbA1c de chaque Calibrateur (du 1 au 4). Le pourcentage de HbA1c dans l'échantillon est calculé par interpolation de son absorbance (A) dans la cuve d'étalonnage.

3.1.3 Cholestérol total

Principe

Méthode colorimétrique selon la fiche technique Spinreact. Le cholestérol présent dans le sérum se transforme en composé coloré selon les réactions suivantes (**Naito et Kaplan, 1984**) :





Méthode

Dans un tube sec 10µl d'échantillon (sérum) sont additionnées à 1ml de réactif de travail [R2(Cholestérol estérase : 300 U/L, Cholestérol oxydase : 300 U/L, Peroxydase (POD) : 1250U/L,

4- aminophénazone: 0.4 mmol/l) dissout dans le tampon ; R1(PIPESpH6.9 : 96 mmol/l, phénol : 26 mmol/l)], agitation, incubation à 37°C pendant 05 minutes. Lecture de la densité optique à $\lambda=505$ nm contre un blanc réactif en utilisant un tube étalon.

Calculs

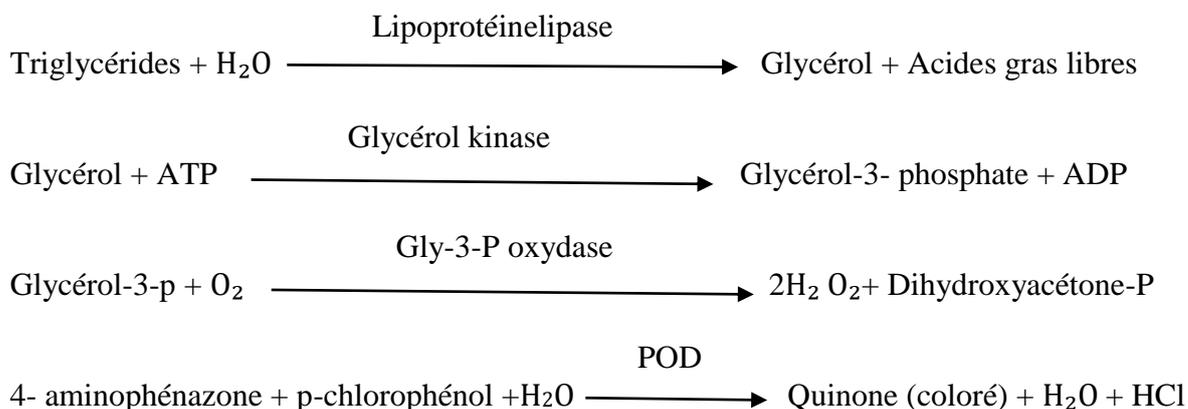
$$[\text{Cholestérol}](\text{mg/dl}) = \frac{(\text{A}) \text{ échantillon}}{(\text{A}) \text{ Etalon}} \times 200 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

Facteur de conversion : mg/dl x 0.0258 = mmol/L

3.1.4 Triglycérides

Principe

Détermination quantitative des triglycérides sériques par une méthode enzymatique colorimétrique à la GPO-POD selon la fiche technique Spinreact. Hydrolyse des triglycérides par les lipoprotéinelipases (LPL) avec libération du glycérol et acides gras libres. Le glycérol est converti en glycérol-3- phosphate et adénosine di phosphate ADP par la glycerol kinase et l'ATP. Le G3P est converti par GPDH en dihydroxyacétone phosphate et HO. Ce dernier réagit avec le 4- aminophénazone et pchlorophenol en présence de peroxydase (POD) pour donner une coloration rouge selon les réactions **(Buccolo, 1973)** :



Méthode

Dans un tube sec 10µl d'échantillon (sérum) sont additionnées à 1ml de réactif de travail [R2 (Lipoprotéine lipase (LPL) :150 000U/L, Glycérokinase (GK) : 500 U/L, Glycérol-3Poxydase (GPO) : 2500 U/L, Peroxydase (POD) : 440 U/L, 4- aminophénazone (4-AP) : 0.1 mmol : l, ATP : 0.1 mmol/l) dissout dans le tampon ; R1(GOODpH7.5 : 50 mmol/l, pchlorophénol : 2 mmol/l)], agitation, incubation à 37°C pendant 05minutes. Lecture de la densité optique à $\lambda=505$ nm contre un blanc réactif en utilisant un tube étalon

Calculs

$$[\text{Triglycérides}] \text{ (mg/dl)} = \frac{(\text{A}) \text{ échantillon}}{(\text{A}) \text{ étalon}} \times 200 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

Facteur de conversion : mg/Dl x 0.0258 = mmol/L.

3.1.5 HDL-c

Principe

Les lipoprotéines de très basse densité (VLDL), et de basse densité (LDL) présentent dans le sérum ou le plasma sont précipitées par le phosphotungstate en présence des ions magnésium.

Après centrifugation le surnageant contient les lipoprotéines de haute densité (HDL). Cette fraction (HDL-C) est déterminée en utilisant le réactif et le protocole de dosage du cholestérol total (*Naito et Kaplan, 1984 ; Grove, 1979*).

Méthode

Dans un tube sec 100µl de réactif de précipitation des LDL et VLDL (acide phosphotungstique :14 mmol/l, magnésium chlorure : 2 mmol/l) sont additionnés à 1ml de sérum. Agitation puis incubation pendant 10min à température ambiante, centrifugation à 4000 t/min (rpm) pendant 20 min. le surnageant est utilisé comme échantillon pour le dosage du cholestérol T = HDL-c.

3.1.6 LDL-c

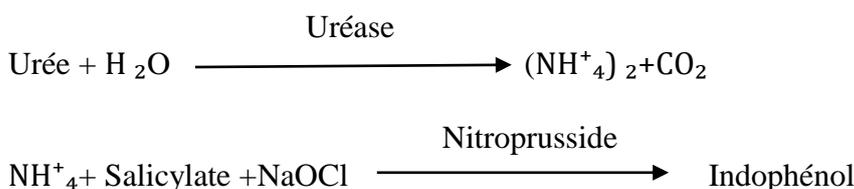
Le calcul de LDL-Cholestérol est effectué par la formule de Friedewald (*Friedewald et al., 1972*).

3.1.7 Urée sanguine

Principe

Le dosage est réalisé sur le sérum par la méthode colorimétrique utilisant l'uréase selon la fiche technique Spinréact.

L'uréase hydrolyse l'urée en ammoniacque (NH_4^+) et le dioxyde de carbone (CO_2). Les ions réagissent avec le salicylate et l'hypochlorite (NaClO), en présence de nitroprusside pour former l'indophénol de couleur verte (**Kaplan et al., 1984**), selon les réactions :



Méthode

Dans un tube sec 10 μl d'échantillon sont additionnées à 1 ml de réactif 1 [uréase 30000 U/L dissoute dans un tampon phosphate pH=6.7 : 50 mmol/l contenant (EDTA : 2 mmol/l, salicylate de sodium : 400 mmol/l, nitroprusside de sodium : 10 mmol/l)] , agitation, incubation à 37°C pendant 5 minutes , ensuite 1 ml de réactif 2 (hypochlorite de sodium : 140 mmol/l, hydroxyde de sodium : 150 mmol/l) est ajouté au mélange , , agitation, incubation à 37°C pendant 5 minutes, lecture contre un blanc réactif à 580 nm avec utilisation d'un étalon.

Calculs

$$[\text{Urée}] \text{ (mg/dl)} = \frac{\text{(A) Echantillon}}{\text{(A) Etalon}} \times 50 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

3.1.8 Créatinine

Principe

Ce dosage est basé sur la réaction de la créatinine avec l'acide picrique en milieu alcalin (NaOH) pour donner un composé coloré en rouge selon la réaction de Jaffé (**Murray et al., 1984**) et la fiche technique Spinreact.

Méthode

100 μl d'échantillon (sérum) sont ajoutés à 1 ml de réactif de travail [V/V : R1 : 17.5 mmol/l d'acide picrique + R2 : 0.29 mmol/l d'hydroxyde de sodium], agitation, lecture

de l'absorbance (A1) après 30 secondes et après 90 secondes (A2), a une longueur d'onde 492 nm.

Calculs

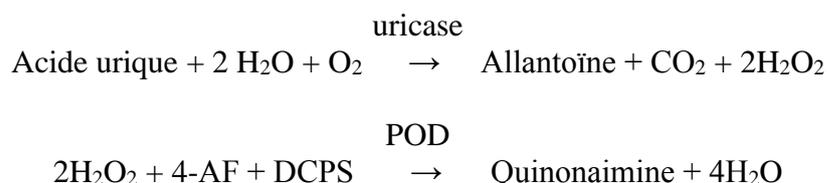
$$\text{nm} \cdot \Delta A = A2 - A1$$

$$[\text{Créatinine}] \text{ (mg/dl)} = \frac{\Delta A \text{ échantillon}}{\Delta A \text{ Etalon}} \times 2 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

3.1.9 Acide urique

Principe

L'acide urique est oxydé par l'uricase à l'allantoïne et le peroxyde d'hydrogène ($2\text{H}_2\text{O}_2$) qui, en présence de la peroxydase (POD), 4-aminophénazone (4-AF) et du 2-4 Diclorophénol sulphonate (DCPS) forme un composé rosacé (**Schultz A., Kaplan A et al., 1984**)



L'intensité de quinonaimine rouge formée est proportionnelle à la concentration d'acide urique présente dans l'échantillon testé.

Réactifs et méthodes

R1 Tampon :

(Phosphates pH 7,4 50 mmol/L) + (2-4 Diclorophénol sulphonate (DCPS) 4 mmol/L)

R 2 Enzymes :

(Uricase+ 60 U/L) + (Peroxydase POD 660U/L) + (Ascorbate oxydase 200U/L) + (Ascorbate oxydase 1 mmol/L)

- 1 mL RT + 25 μL Echantillon mélanger et incuber pendant 5 minutes à 37°C ou 10 minutes à 15- 25°C.
- Lire l'absorbation (a) du patron et l'échantillon 520 nm, en comparaison avec le blanc du réactif. La couleur reste stable pendant au moins 30 minutes.

Calculs

$$\frac{(A) \text{ Echantillon} - (A) \text{ Blanc}}{(A) \text{ Etalon} - (A) \text{ Blanc}} \times 6 \text{ (concentration de l'étalon)} = \text{mg/dL d'acide urique dans}$$

L'échantillon.

Urine de 24h :

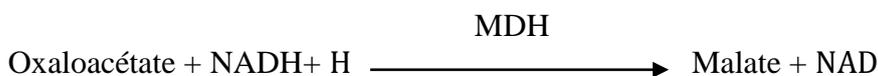
$$\frac{(A) \text{ Echantillon} - (A) \text{ Blanc}}{(A) \text{ Etalon} - (A) \text{ Blanc}} \times 6 \times \text{vol. (dL) urine/24h} = \text{mg/24h d'acide urique.}$$

Facteur de conversion : mg/dL x 59.5 = μmol/L.

3.1.10 TGO

Principe

Méthode cinétique de dosage des transaminases sériques selon la fiche technique Spinreact. L'aspartate aminotransferase (AST) appelée aussi Transaminase glutamateoxaloacétate. Le (TGO) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au α-cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH,H (**Murray, 1984**):



Méthode et calculs

Dans un tube sec 100μl d'échantillon (sérum) sont additionnées à 1ml de réactif de travail

- [R2 (NADH : 0.18mmol/lactate déshydrogénase :800 U/L, Malate déshydrogénase(MDH) : 600 U/L, α cétoglutarate: 12 mmol/l) dissout dans le tampon ; R1(TRIS pH7.8 : 80 mmol/l, L)]
- Aspartate : 200 mmol/l)], agitation, incubation pendant 01 minutes. Lecture de l'absorbance (A) à λ=340 nm chaque minute pendant 03 minutes.

$$\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{U/L de TGO}$$

3.1.11 TGP

Principe

Méthode cinétique de dosage des transaminases sériques selon la fiche technique Spinreact. Alanine aminotransférase (ALT) ou Glutamate pyruvate transaminases (TGP) catalyse le transfert réversible de groupement amine de l'alanine à l' α -cétoglutarate formant le glutamate et pyruvate. Ce dernier est réduit en lactate par l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) et le NADH selon les réactions (*Murray, 1984*) :



Méthode et claculs

Dans un tube sec 100 μ l d'échantillon (sérum) sont additionnées à 1 ml de réactif de travail [R2 (NADH :0.18mmol/lactate déshydrogénase :1200 U/L, α cétoglutarate : 15 mmol/l) dissout dans le tampon ; R1(TRIS pH7.8 : 80 mmol/l, L-Alanine: 500 mmol/l)], agitation, incubation pendant 01 minutes. Lecture de l'absorbance (A) à $\lambda=340$ nm chaque minute pendant 03 minutes.

$$\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{U/L de TGP}$$

3.1.12 Bilirubine totale et direct

Principe

La bilirubine réagit avec l'acide sulfanilique diazote à pH acide pour produire l'azobilirubine. Cette réaction est instantanée avec la bilirubine directe (la bilirubine conjuguée), par contre avec la bilirubine totale (bilirubine non conjuguée) elle est indirecte nécessite la solubilisation par le diméthylsulfoxyde (DMSO). (En absence de DMSO, seule la bilirubine directe réagit). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de la bilirubine dans l'échantillon (*Malloy et al., 1937 ; Kaplan et al., 1984*), selon la fiche technique Spinreact.

Réactifs et méthodes

R1(BD) : 30mmol/l d'acide sulfanilique + 150 mmol/l d'acide hydrochlorique. R2 (BT) :30mmol/l d'acide sulfanilique + 150 mmol/l d'acide hydrochlorique + 7mmol/l DMSO. R3 : 29 mmol/l de nitrite de sodium.

Pour les deux dosages la réaction se fait en présence d'un blanc échantillon contenant le réactif de travail (R1 ou R2) avec 100 µl d'échantillon. Alors que le tube essai contient en plus de réactif 1 ou 2 et échantillon (sérum) le R3 (50µl). Agitation, incubation pendant 05min à

Température ambiante, lecture à une longueur d'onde $\lambda = 555\text{nm}$.

Calculs

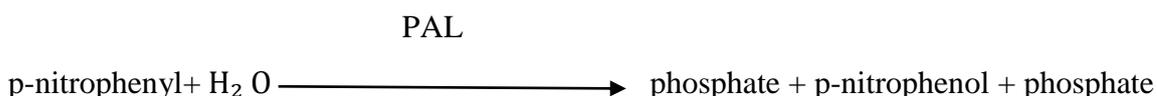
$$[\text{Bilirubine}](\text{mg/dl}) = \frac{(\text{A})\text{Echantillon} - (\text{A})\text{ blanc échantillon}}{(\text{A})\text{ Étalon} - (\text{A})\text{ blanc échantillon}} \times [\text{étalon}]$$

Facteur de conversion : $\text{mg/dl} \times 17.1 = \mu\text{mol/L}$

3.1.13 Phosphatase alcaline

Principe

La phosphatase alcaline (PAL) catalyse l'hydrolyse de p-nitrophenyl phosphate à pH 10.4, en libérant p-nitrophénol et le phosphate (*Wenger et al., 1984*), selon la réaction :



La formation de p-nitrophénol est mesurée photométriquement, où elle est proportionnelle à l'activité catalytique de la phosphatase alcaline dans le sérum selon la fiche technique Spinreact.

Méthode et calculs

Dans un tube sec 20 µl d'échantillon (sérum) sont additionnés à 1.2 ml de réactif de travail [R2 (α Nitrophénylphosphate : 10 mmol/l), dissout dans le tampon ; R1 (Diéthanolamine pH10.4 : 1 mmol/l, Chloride de magnésium : 0.5 mmol/l)], agitation, incubation pendant 01 minutes. Lecture de l'absorbance (A) à $\lambda = 405\text{ nm}$ chaque minute pendant 03 minutes.

$$\Delta A/\text{min} \times 3300 = \text{U/L de ALP}$$

3.1.14 Protéines totales

Principe

En milieu alcalin, les protéines donnent une couleur violette/bleue en présence de sels de cuivre, ces sels contiennent de l'iode qui agit comme un antioxydant.

L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de protéines totales dans l'échantillon testé (*koller, 1984*)

Méthode et calculs

(R) Biuret : (Tartrate de potassium de sodium 15 mmol/L + Iodure de sodium 100 mmol/L + Iodure de potassium 5 mmol/L + Sulfate de cuivre (II) 5 mmol/L + Hydroxyde de sodium 1000 mmol/L)

- 1 mL (R) + 25 µL (Echantillon) mélanger et incubé 5 minutes à 37°C ou 10 minutes à température ambiante.
- Lire l'absorbance (A) du patron et l'échantillon 540 nm., en comparant avec le blanc du réactif. La couleur reste stable pendant au moins 30 minutes.

$$\frac{(A)_{\text{Echantillon}} - (A)_{\text{blanc}}}{(A)_{\text{étalon}} - (A)_{\text{blanc étalon}}} \times 7 [\text{étalon conc.}] = \text{g/dL de protéines totales.}$$

3.1.15 Albumine

Principe

L'albumine se combine au vert de bromocrésol, à pH légèrement acide, entraînant un changement de couleur de l'indice, passant du jaune-vert au vert-bleuté, et proportionnel à la concentration d'albumine présente dans l'échantillon testé (*Gendler S. Kaplan A et al., 1984*).

Réactif et méthode

(R) : Vert de bromocrésol (pH 4,2 0,12 mmol/L)

- 1 mL (R) + 5 µL (Echantillon) mélanger et incubé 5 minutes à 37°C ou 10 minutes à température ambiante.
- Lire l'absorbance (A) du patron et l'échantillon 630 nm., en comparant avec le blanc du réactif. La couleur reste stable pendant 1 heure à température ambiante.

Calculs

$$\frac{(A)_{\text{Echantillon}} - (A)_{\text{blanc}}}{(A)_{\text{étalon}} - (A)_{\text{blanc étalon}}} \times 5 [\text{étalon conc.}] = \text{g/dL d'albumine dans l'échantillon}$$

Facteur de conversion: g/dL x 144,9 = µmol/

3.2 Paramètres de stress oxydatif

3.2.1 Glutathion peroxydase (GPx)

Principe

L'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (**GPx**) a été mesurée par la méthode de (*Flohe et Gunzler 1984*). Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (HO) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :



Méthode et calculs

Dans un tube sec, 0.2 ml de surnageant est additionnée à 0.4 ml de GSH à 0.1 mM (réaction enzymatique) + 0.2 ml de KNaHPO à 0.067 M (tampon d'extraction pH 7.8). Le tube blanc contient 0.4 ml de GSH + 0.2 ml de KNaHPO (réaction non enzymatique). Incubation au bain marie à 25° C pendant 05 min puis addition de 0.2 ml d'H O (1.3mM) pour initier la réaction. Incubation 10 min. addition de 1ml de TCA 1% T pour arrêter la réaction. Le mélange se met dans la glace pendant 30 min. Centrifugation durant 10 min à 3000t/min. 0.48 ml de surnageant sont placés dans une cuve et additionnés de 2.2 ml de HPO à 0.32 M + 0.32 ml de DTNB à 1mM. Mesure de la densité optique à 412 nm dans les 05 min.

La détermination (calcul) de l'activité de la GPx se fait de la façon suivante :

Activité de GSH consommée / min / gr de protéine

– Blanc = 0.04 micro mole de GSH réduit ----- DO_b

– Extrait = 0.04 // // -----DO_e

Donc la concentration de GSH réduit qui sera oxydée (disparue) = DO_e -DO_b

$$X = \frac{(\text{DO}_e - \text{DO}_b) \times 0.04}{\text{DO}_b} = \text{quantité de GSH réduite disparue (oxydée)}.$$

$$\text{L'activité de la GPx} = \frac{\text{La quantité de GSH réduit disparue } X \times 5}{\text{La concentration de protéine}}$$

3.2.2 Glutathion (GSH forme réduite)

Principe

Le dosage du glutathion est réalisé selon la méthode de (**Weekbeker et Cory, 1988**). Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5- mercapturique qui résulte de la réduction de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Pour cela on réalise une déprotéinisation (par l'acide sulfosalicylique 0.25%) afin de garder uniquement les groupements (-SH) spécifique du glutathion.

Méthode et calculs

Les échantillons (Sérum ou Hémolysât) sont mis séparément en présence de 8 ml de solution d'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tetra Acétique) a 0.02 M. Une fois préparé l'échantillon, il doit subir une déprotéinisation : 0.8 ml de l'homogénat auquel est ajoute 0.2 ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) à 0.25%. Agitation, incubation dans un bain de glace pendant 15 minutes. Centrifugation 1000rpm pendant 5 minutes. 0.5 ml de surnageant au quel est ajouté 1 ml de tampon Tris-HCl + EDTA(0.02M) pH 9.6. Agitation et addition de 0.025 ml de DTNB à 0.01M dissout dans le méthanol absolu. Incubation 5 minutes à température ambiante puis lecture de la DO à $\lambda = 412$ nm.

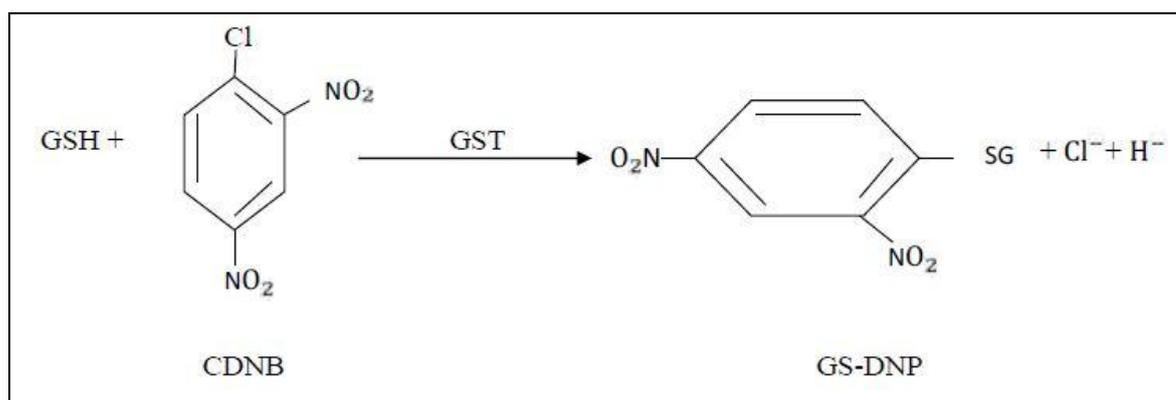
$$[GSH] = \frac{Do \times 1 \times 1.525}{131000 \times 0.8 \times 0.5} \text{ nM GSH / mg Pr t}$$

- **DO** : Densité optique.
- **1** : Volume total des solutions utilisées de la déprotéinisation (0.8 ml homogénat + 0.2 ml SSA).
- **1.525** : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant + 1 ml Tris – EDTA + 0.025 ml DTNB)
- **13100** : Coefficient d'absorbance (contenant le groupement –SH à 412 nm).
- **0.8**: Volume de l'homogénat après déprotéinisation trouvé dans un 1 ml.
- **0.5** : Volume du surnageant trouvé dans un 1.525 ml.
- On note que la concentration de GSH est mesurée par apport à 1 mg de

3.2.3 Glutathion S-transférase (GST)

Principe

La mesure de l'activité de la glutathion S- transférase (GST) est déterminée selon la méthode de (*Habig et al, 1974*). Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-Chloro2 ,4 di nitrobenzène) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH), la conjugaison entraine la formation d'une molécule nouvelle ; 1-S- Glutathionyl 2-4 Dinitrobenzène permettant de mesurer l'activité de GST selon la réaction suivante :



Méthode et calculs

La valeur de la densité optique mesurée est directement proportionnelle à la quantité de conjugué formé elle-même liée à l'intensité de l'activité GST. Les échantillons sont homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate (0.1 M, pH 6). L'homogénat est centrifugé à 1400 t/min pendant 30 min et le surnageant récupéré servira comme source d'enzymes. Le dosage consiste à faire réagir 200 µl du surnageant avec 1.2 ml du mélange CDNB (1mM), GSH (5mM) [20.26 mg CDNB, 153.65 mg GSH, 1 ml éthanol, 100 ml tampon phosphate (0.1M, p H 6)]. La lecture des absorbances est effectuée pendant une minute et chaque 15 secondes à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant.

3.2.4 Malonyldialdehyde (MDA)

Principe

Le MDA peut être détecté par une réaction colorimétrique à l'acide thiobarbiturique (TBA). La détection du MDA issue de la dégradation des acides gras polyinsaturés à 3 ou 4 doubles liaisons peroxydées, constitue une méthode très sensible pour déterminer une lipoperoxydation in vitro. Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode d'(*Esterbauer et*

al. 1992). Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique, pour former un pigment (rose). Ce chromogène peut être donc mesuré par spectrophotométrie à 530 nm (**figure 18**).

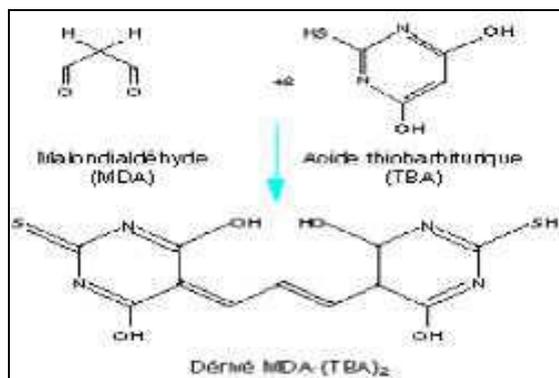


Figure 18 : Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique.

Méthode et calculs

Dans un tube sec ,375 μ l de l'homogénat (surnageant), sont additionnés à 150 μ l de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4) plus 375 μ l de la solution TCA BHT (TCA 20%, BHT 1%), agitation puis centrifugation à 1000 tours/min pendant 10 min. Prélèvement de 400 μ l du surnageant auquel est ajouté 80 μ l d'HCl 0.6M plus 320 μ l de la solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120 mM), agitation puis incubation au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes. Lecture de la densité optique à $\lambda=530$ nm. La concentration du MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert ($DO = E.C.L$) :

$$C \text{ (nmol/mg de protéine)} = \frac{DO.10^6}{E. L. X. Fd}$$

- **C** : Concentration en n.moles /mg de protéines ;
- **DO** : Densité optique lue à 530 nm ;
- ϵ : Coefficient d'extinction molaire du MDA = $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;
- **L** : Longueur du trajet optique = 0.779 cm ;
- **X** : Concentration de l'échantillon en protéines (mg/ml) ;
- **Fd** : Facteur de dilution : Fd = 0.2083.

4. Etude statistique

La saisie et le traitement des données ont été réalisés à l'aide des logiciels :

 *Microsoft Excel(2016).* 

 *MINITAB(V. 17.0).* 

Les résultats sont en *moyenne ± écart type moyenne*. Nous avons utilisé le test « t » de(*Student* a 2 échantillons) pour les comparaisons statistiques. Les résultats sont exprimés en moyenne ± un écart–type moyen (SEM), avec un seuil de significativité $p \leq 0,05$.

Résultats

Résultats

Les résultats du bilan biochimique sanguin complet et de la défense antioxydant de cette étude sont présentés dans les (Tableau 3), et (Tableau 4).

Tableau 3 : Variation de la concentration des paramètres biochimiques chez les diabétiques DID et DNID par rapport aux témoins sains.

Paramètres Biochimiques		Témoin [n = 20]	DID [n = 20]	DNID [n = 20]
Bilan Glucidique	Glycémie à jeun (g/L)	0,854 ± 0,017	1,505 ± 0,025***	1,204 ± 0,087***
	HbA1c (%)	4,859 ± 0,067	6,819 ± 0,14***	6,42 ± 0,41***
Bilan Lipidique	Cholestérol total (g/L)	1,526 ± 0,06	1,808 ± 0,076**	1,737 ± 0,061*
	Triglycérides (g/L)	0,7 ± 0,026	1,144 ± 0,11***	1,003 ± 0,11**
	HDL-c (g/L)	0,521 ± 0,0071	0,5983 ± 0,0074***	0,5345 ± 0,0067
	LDL-c (g/L)	0,88 ± 0,02	0,979 ± 0,017**	1,004 ± 0,02**
Bilan Rénal	Urée (g/L)	0,262 ± 0,016	0,3002 ± 0,017	0,427 ± 0,011***
	Créatinine ♂ (mg/L)	8,64 ± 0,46	9,83 ± 0,66	9,7 ± 0,87
	Créatinine ♀ (mg/L)	7,654 ± 0,16	8,08 ± 0,35	12,11 ± 0,18***
	Acide urique (g/L)	41,7 ± 0,18	32,4 ± 0,55***	43,4 ± 0,46**
Bilan Hépatique	TGO(UI/L)	20,72 ± 0,20	22,1 ± 0,27***	22,14 ± 0,3***
	TGP(UI/L)	16,44 ± 1	21,8 ± 1,9*	18,2 ± 1,9
	Bilirubine totale (mg/L)	6,48 ± 0,72	5,87 ± 0,5	5,42 ± 0,45
	Bilirubine directe (mg/L)	1,132 ± 0,098	1,06 ± 0,044	0,858 ± 0,052*
	Phosphatases alcalines(UI/L)	159 ± 8,6	179,4 ± 14	155,8 ± 11
	Protéines totale (g/L)	61,54 ± 0,33	64,5 ± 0,29***	64,88 ± 0,47***
	Albumine (g/L)	37,19 ± 0,73	42,21 ± 0,55***	39,28 ± 0,37*

Tableau 4: Variation des paramètres de la défense antioxydante (GPx, GSH et GST) et un paramètre de la peroxydation lipidique (MDA) dans le sérum et l'hémolysât chez les diabétiques DID et DNID par rapport aux témoins sains.

Paramètres		Témoin [n = 20]	DID [n = 20]	DNID [n = 20]
Sérum	GPx (nmol/g prot)	1,639 ± 0,047	1,167 ± 0,084**	1,942 ± 0,086**
	GSH (nmol/g prot) *10 ⁻³	13,01 ± 0,75	7,25 ± 0,54***	6,56 ± 0,92***
	GST (nmol/min/g prot)	7,019 ± 0,15	15,291 ± 0,10***	10,486 ± 0,078***
	MDA (nmol/g prot)	3,46 ± 0,42	4,22 ± 0,22	3,57 ± 0,45
Hémolysâ	GPX (nmol/g prot)	10,385 ± 0,11	12,075 ± 0,16***	12,164 ± 0,12***
	GSH (nmol/g prot) *10 ⁻³	3,818 ± 0,16	3,28 ± 0,10**	3,301 ± 0,18*
	GST (nmol/min/g prot)	3,709 ± 0,14	2,21 ± 0,21***	2,48 ± 0,42**
	MDA (nmol/g prot)	13,725 ± 0,15	18,702 ± 0,10***	16,87 ± 0,11***

1. Paramètres biochimiques

1.1. Exploration du bilan glucidique

Une augmentation de la glycémie à jeun et de HbA1c a été observée (**Tableau 5**), (**Figure 19**) chez les diabétiques de type 1 et 2 par rapport aux sujets témoins avec une différence très hautement significative ($P \leq 0,001$), mais reste toujours pré des normes.

Tableau 5: Variation de la concentration sérique du glucose et HbA1c chez les sujets témoins et les diabétiques DID et DNID.

	Paramètres Biochimiques	Témoin [n = 20]	DID [n = 20]	DNID [n = 20]
Bilan Glucidique	Glycémie à jeun (g/l)	0,854 ± 0,017	1,505 ± 0,025***↑	1,204 ± 0,087***↑
	HbA1c (%)	4,859 ± 0,067	6,819 ± 0,14***↑	6,42 ± 0,41***↑

P = Seuil de signification.

* = Différence significative.

** = Différence hautement significative.

*** = Différence très hautement significative.

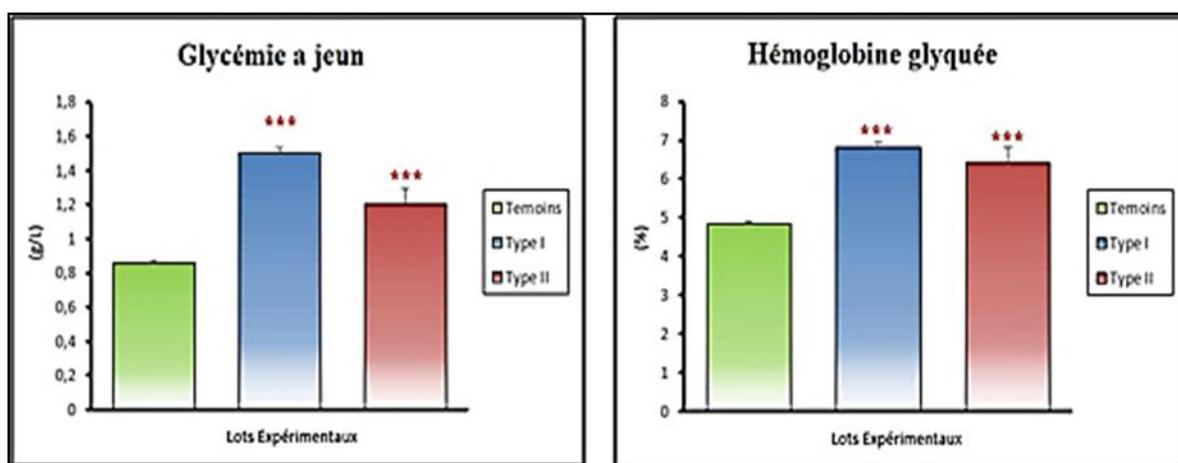


Figure 19 : Variation de la concentration sérique du glucose et de l'HbA1c chez les diabétiques DID et DNID par rapport aux témoins sains.

1.2. Exploration de bilan lipidique

Nos résultats montrent une augmentation hautement significative ($P \leq 0,01$) de la concentration sérique de Cholestérol Total chez les DID et une augmentation significative ($P \leq 0,05$) pour les DNID par rapport aux sujets témoins sains. (**Tableau 6**), (**Figure 20**).

Une augmentation très hautement significative ($P \leq 0,001$) des triglycérides sanguins et hautement significative ($P \leq 0,01$) chez les DID et hautement significative ($P \leq 0,01$) chez les DNID par rapport aux sujets témoins sains. (**Tableau 6**), (**Figure 20**).

L'HDL-c a été trouvé élevé chez les DID ($P \leq 0,001$) par rapport aux témoins et pas de différence chez les DNID. (Tableau 6), (Figure 20).

Une élévation de la concentration sérique de l'LDL-c avec une différence hautement significative ($P \leq 0,01$) chez les patients DID et DNID par rapport aux sujets témoins sains. (Tableau 6), (Figure 20).

Tableau 6 : Variation de la concentration sérique de Cholestérol Total, Triglycérides, HDL-c et d'LDL-c chez les diabétiques de type 1 et 2 par rapport aux témoins sains.

	Paramètres Biochimiques	Témoin [n = 20]	DID [n = 20]	DNID [n = 20]
Bilan Lipidique	Cholestérol total (g/l)	1,526 ± 0,06	1,808 ± 0,076 ^{**↑}	1,737 ± 0,061 ^{*↑}
	Triglycérides (g/l)	0,7 ± 0,026	1,144 ± 0,11 ^{***↑}	1,003 ± 0,11 ^{**↑}
	HDL-c (g/l)	0,521 ± 0,0071	0,5983 ± 0,0074 ^{***↑}	0,5345 ± 0,0067
	LDL-c (g/l)	0,88 ± 0,037	0,979 ± 0,017 ^{**↑}	1,004 ± 0,02 ^{**↑}

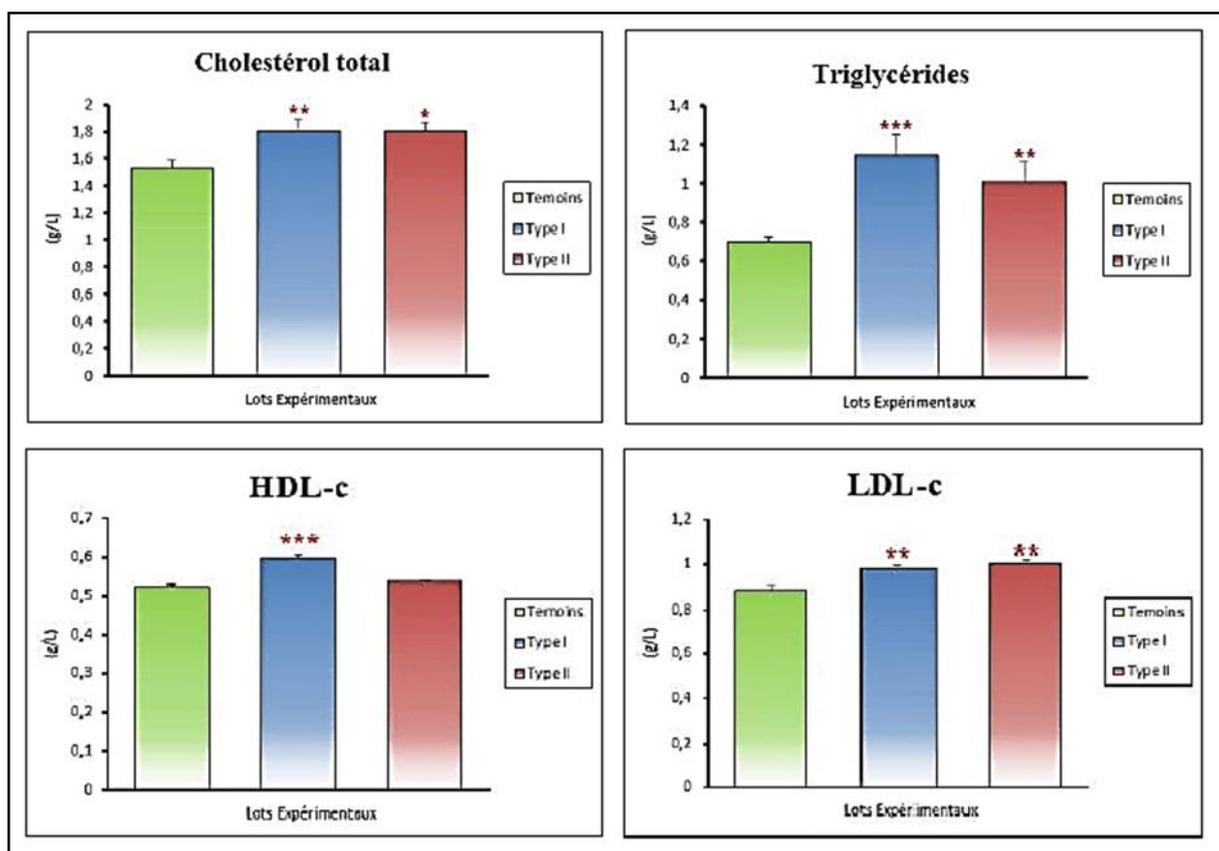


Figure 20 : Variation de la concentration sérique des paramètres du bilan lipidique chez les diabétiques DID et DNID par rapport aux témoins sains.

1.3. Bilan Rénal

Une augmentation de l'urémie avec une différence très hautement significative ($P \leq 0,001$) a été observé chez le lot DNID par rapport aux témoins, pas de différence pour le DID par rapport aux témoins (**Tableau 7**), (**Figure 21**).

Pas de différence significative pour la créatinine chez les hommes diabétiques (DID et DNID) par rapport aux témoins et chez les femmes on a observé aucune signification pour le DID, mais une augmentation très hautement significative pour les femmes diabétiques DNID (**Tableau 7**), (**Figure 21**).

On observe une diminution très hautement significative ($P \leq 0,001$) de l'uricémie chez les DID et une augmentation hautement ($P \leq 0,01$) significative pour les DNID par rapport aux sujets témoins sains (**Tableau 7**), (**Figure 21**).

Tableau 7 : Variations des concentrations sériques des paramètres du bilan rénal chez les diabétiques (DID et DNID) par rapport aux témoins sains.

	Paramètres Biochimiques	Témoin [n = 20]	DID [n = 20]	DNID [n = 20]
Bilan Rénal	Urée (g/l)	0,262 ± 0,016	0.3002 ± 0.017	0,427 ± 0,011***↑
	Créatinine ♂ (mg/l)	8,64 ± 0,46	9,83 ± 0,66	9,7 ± 0,87
	Créatinine ♀ (mg/l)	7,654 ± 0,16	8,08 ± 0,35	12,11 ± 0,18***↑
	Acide urique (g/l)	41,7 ± 0.18	32,4 ± 0,55***↓	43,4 ± 0,46**↑

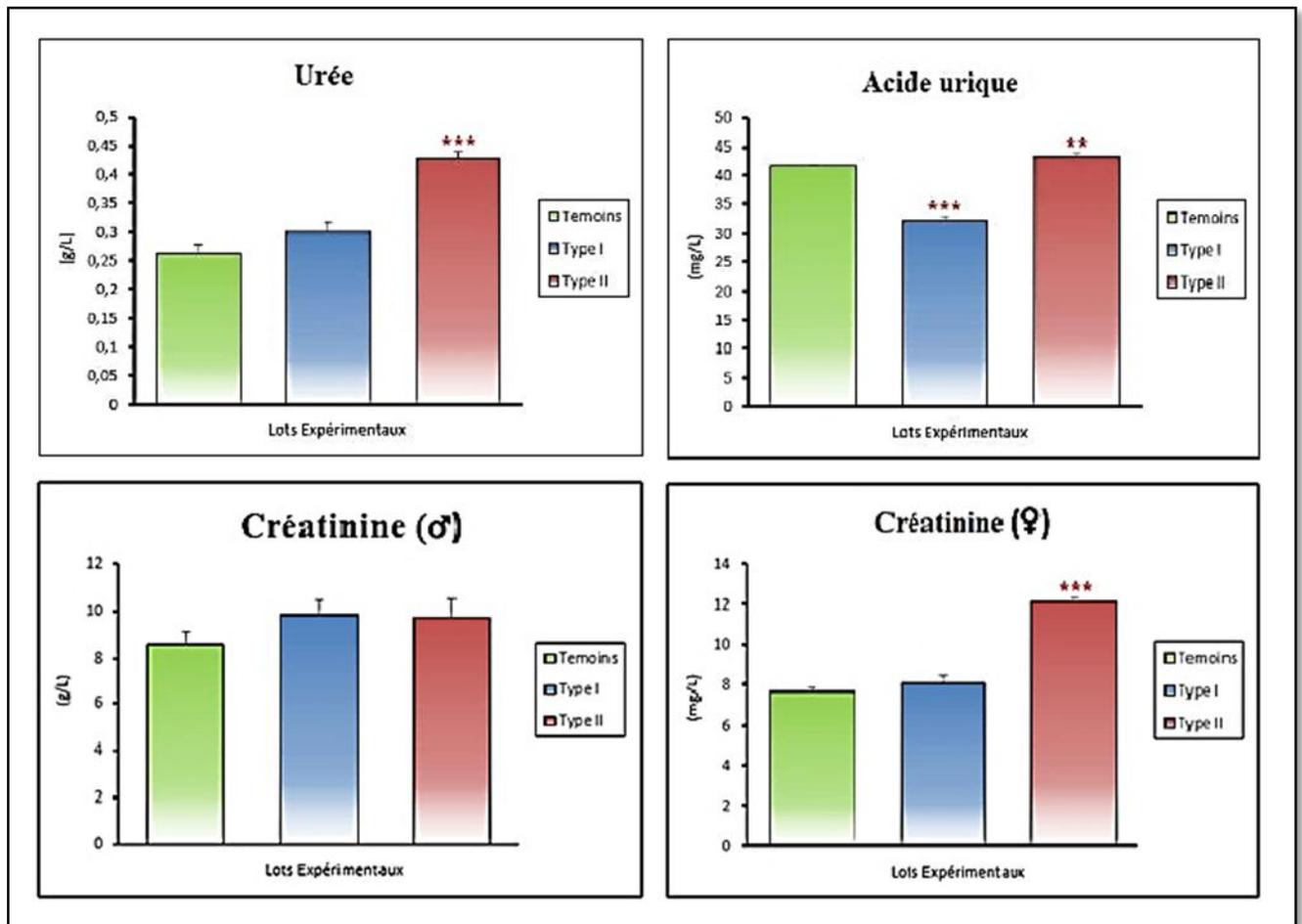


Figure 21 : Variation de la concentration des sérique des paramètres du bilan rénal chez les diabétiques (DID et DNID) par rapport aux témoins sains.

1.4. Bilan Hépatique

Une augmentation avec une différence très hautement significative ($P \leq 0,001$) de l'activité enzymatique TGO, a été observé chez les diabétiques DID et DNID par rapport aux témoins sains, de même l'augmentation de la TGP chez les DID est significative ($P \leq 0,05$) par rapport aux sujets témoins (reste toujours dans les normes) et pas de signification chez les DNID (**Tableau 8**), (**Figure 22**).

Concernant les taux de la bilirubine Total et Directe, Nos résultats ne montre aucune signification pour la Bilirubine Total, alors nous avons enregistré une diminution significative ($P \leq 0,05$) de la Bilirubine Directe chez les DNID par rapport aux sujets témoins (**Tableau 8**), (**Figure 23**).

Une augmentation très hautement significative ($P \leq 0,001$) des Protéines Totales a été enregistré chez les deux types de diabète, de même on a enregistré une augmentation très hautement significative de l'Albumine sérique chez les diabétiques de type 1 (DID)

et pas de différence chez les DNID de même que pour la phosphatase alcaline (**Tableau 8**), (**Figure 23**).

Tableau 8 : Variation des paramètres du bilan hépatique chez les diabétiques (DID et DNID) par rapport aux témoins sains.

Paramètres Biochimiques	Témoin [n = 20]	DID [n = 20]	DNID [n = 20]
TGO (UI/L)	20,72 ± 0,20	22,1 ± 0,27***↑	22,14 ± 0,3***↑
TGP (UI/L)	16,44 ± 1	21,8 ± 1,9*↑	18,2 ± 1,9
Bilan Hépatique			
Bilirubine totale (mg/l)	6,48 ± 0,72	5,87 ± 0,5	5,42 ± 0,45
Bilirubine directe (mg/l)	1,132 ± 0,098	1,06 ± 0,044	0,858 ± 0,052*↓
Phosphatase alcaline(UI/L)	159 ± 8,6	179,4 ± 14	155,8 ± 11
Protéines totales (g/l)	61,54 ± 0,33	64,5 ± 0,29***↑	64,88 ± 0,47***↑
Albumine (g/l)	37,19 ± 0,73	42,21 ± 0,55***↑	39,28 ± 0,37*↑

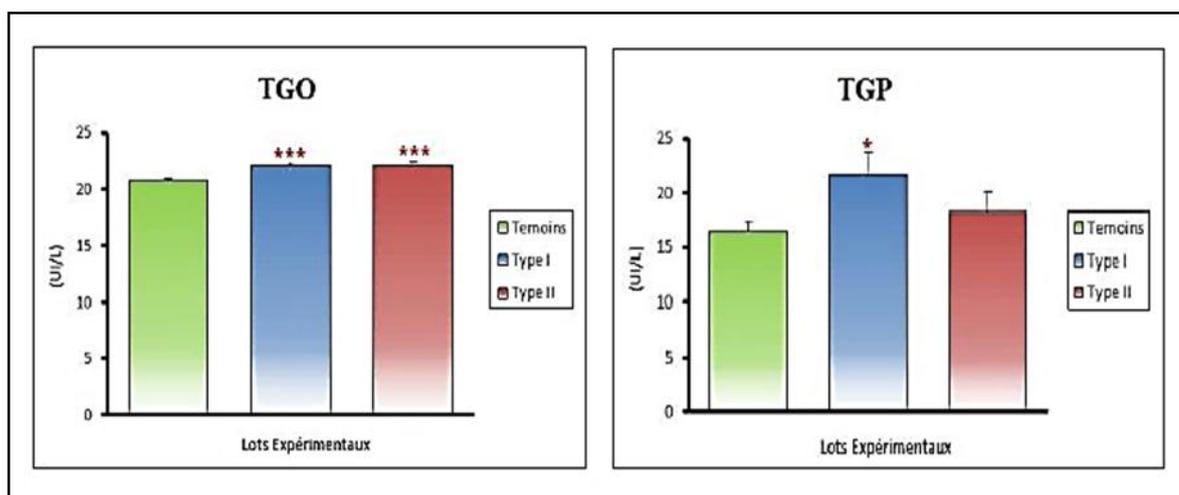


Figure 22 : Variation de l'activité des transaminases sériques chez les diabétiques (DID et DNID) par rapport aux témoins sains.

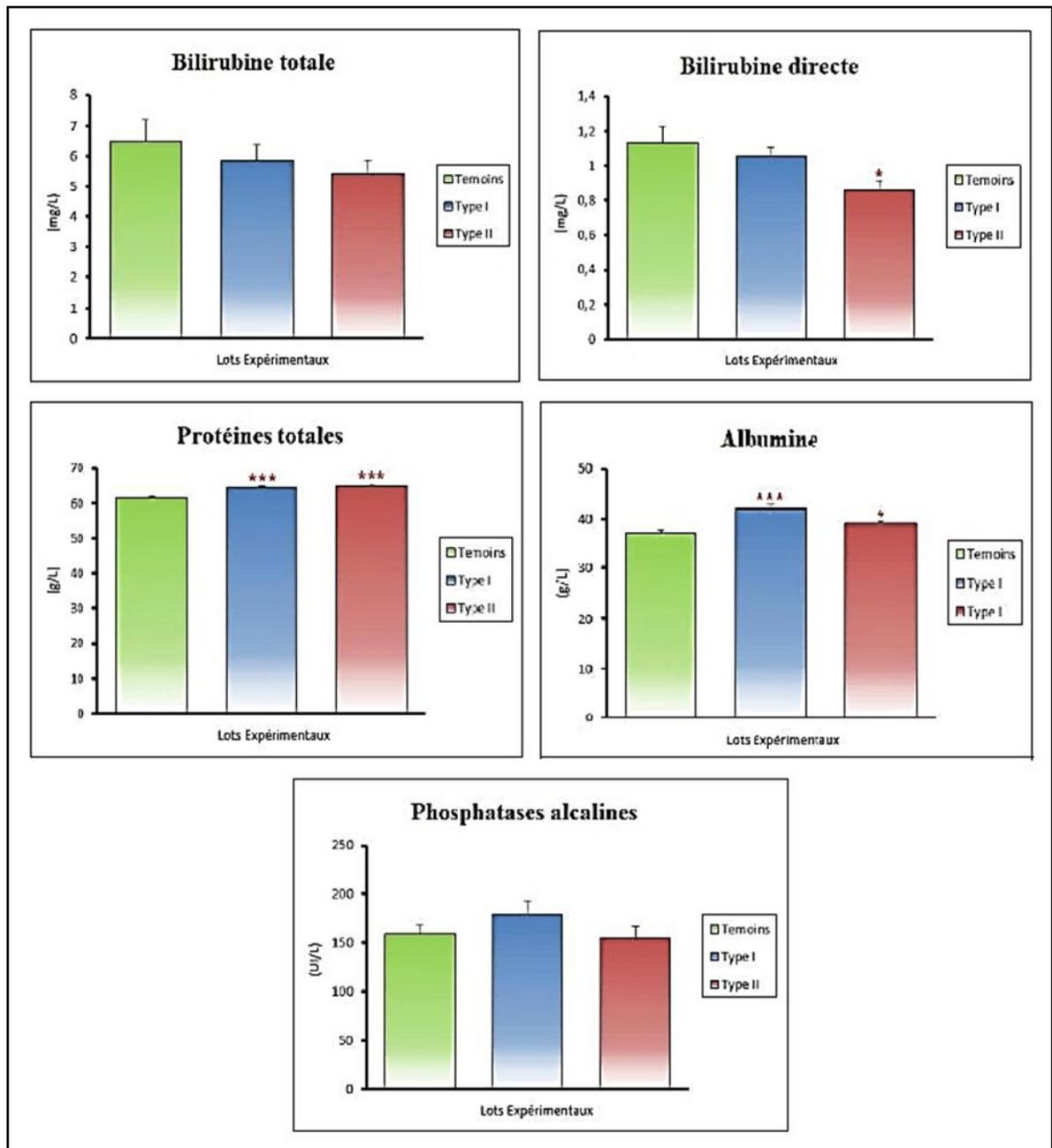


Figure 23 : Variation des concentrations sériques de Bilirubine Total, Direct, Protéines Totales, Albumine et la Phosphatase Alcaline chez les diabétiques de type 1 et 2 par rapport aux témoins sains.

2. Paramètres de la défense antioxydante et la peroxydation lipidique

Dans le sérum on a enregistré une diminution très hautement significative ($P \leq 0,001$) de l'activité enzymatique de la GPx chez les DID et une augmentation très hautement significative chez les DNID. La concentration de GSH a été enregistrée une diminution très hautement significative chez les diabétiques (DID et DNID) par rapport aux témoins, alors que l'activité enzymatique de la GST a enregistré une augmentation très hautement significative chez le DID et le DNID par rapport aux sujets témoins sains. Pour le paramètre de la peroxydation lipidique (MDA), nous avons enregistré aucune signification entre les diabétiques et les témoins (**Tableau 9**), (**Figure 24**).

Tableau 9 : Variation sérique des paramètres de la défense antioxydante et de la peroxydation lipidique chez les diabétiques (DID et DNID) par rapport aux témoins sains.

Paramètres	Témoin [n = 20]	DID [n = 20]	DNID [n = 20]
Sérum GPx (nmol/g prot)	1,639 ± 0,047	1,167 ± 0,084**↓	1,942 ± 0,086**↑
GSH (nmol/g prot) *10 ⁻³	13,01 ± 0,75	7,25 ± 0,54***↓	6,56 ± 0,92***↓
GST (nmol/min/g prot)	7,019 ± 0,15	15,291 ± 0,10***↑	10,486±0,078***↑
MDA (nmol/g prot)	3,46 ± 0,42	4,22 ± 0,22	3,57 ± 0,45

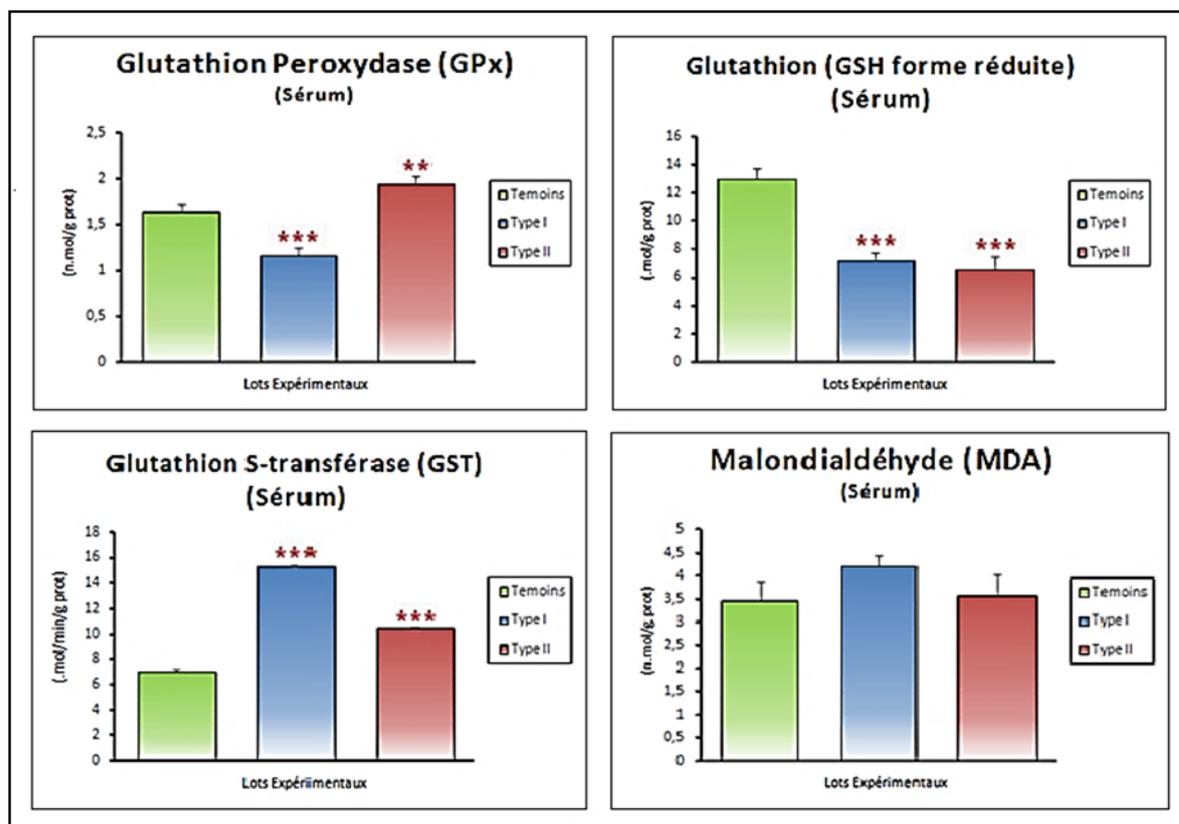


Figure 24 : Variation sérique des paramètres de la défense antioxydante et de la peroxydation lipidique chez les diabétiques (DID et DNID) par rapport aux témoins sains.

Dans l'hémolysât, nous avons enregistré une augmentation très hautement significative ($P \leq 0,001$) de l'activité enzymatique de la GPx et la concentration du MDA chez les diabétiques (DID et DNID) par rapport aux témoins. Aussi, nos résultats montrent une diminution hautement significative ($P \leq 0,01$) de la concentration de GSH chez les DID avec une diminution significative ($P \leq 0,05$) chez les DNID. Pour la GST, on a enregistré une diminution très hautement significative chez les diabétiques de type 1, et une diminution hautement significative chez les diabétiques de type 2 par rapport aux sujets témoins sains (**Tableau 10**), (**Figure 25**).

Tableau 10 : Variation des paramètres de la défense antioxydante et de la peroxydation lipidique dans l'hémolysât chez les diabétiques (DID et DNID) par rapport aux témoins sains.

Paramètres		Témoin [n = 20]	DID [n = 20]	DNID [n = 20]
Hémolysât	GPX (nmol/g prot)	10,385 ± 0,11	12,075 ± 0,16***↑	12,164 ± 0,12***↑
	GSH (nmol/g prot) *10 ⁻³	3,818 ± 0,16	3,28 ± 0,10**↓	3,301 ± 0,18*↓
	GST (nmol/min/g prot)	3,709 ± 0,14	2,21 ± 0,21***↓	2,48 ± 0,42**↓
	MDA (nmol/g prot)	13,725 ± 0,15	18,702 ± 0,10***↑	16,87 ± 0,11***↑

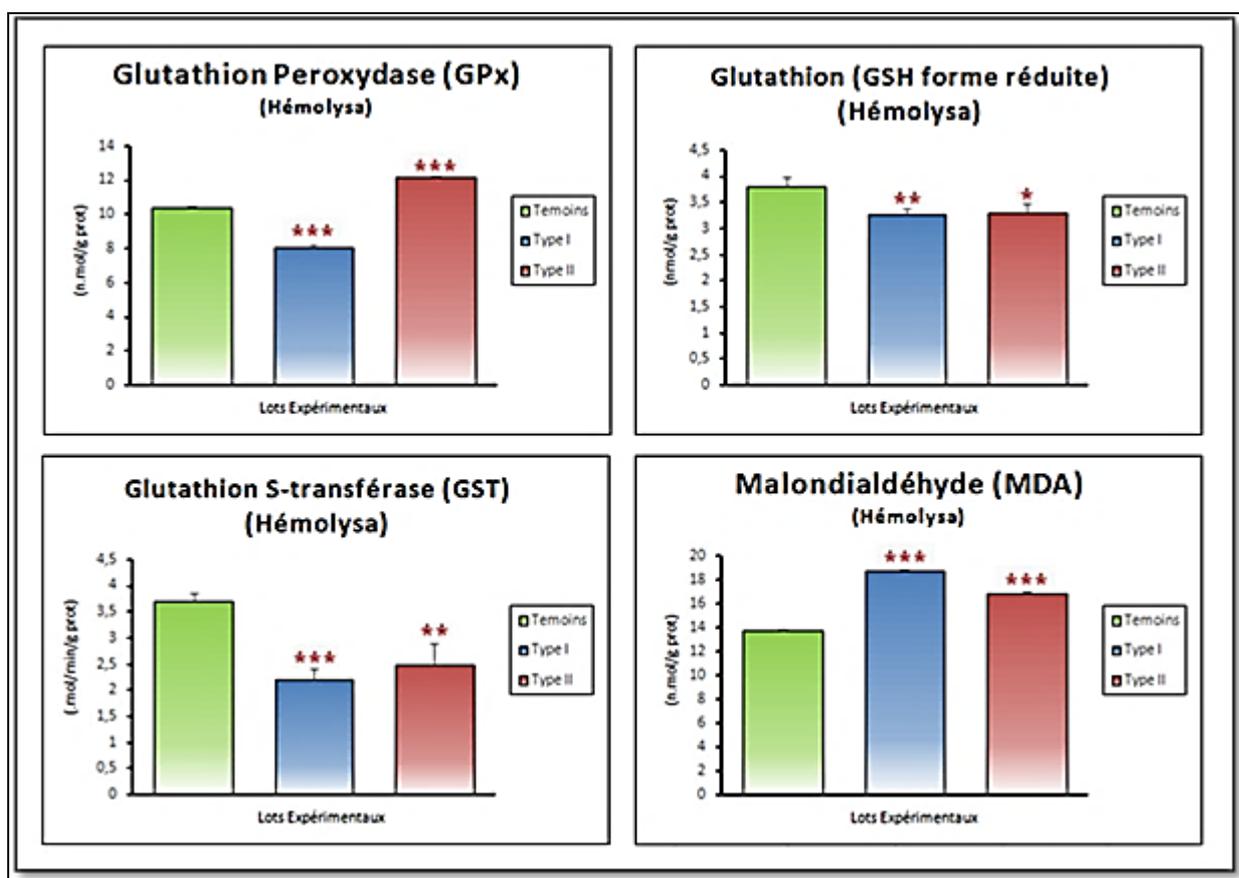


Figure 25 : Variation des paramètres de la défense antioxydante et de la peroxydation lipidique dans l'hémolysât chez les diabétiques (DID et DNID) par rapport aux témoins sains.

Discussion

Le stress oxydant qui résulte d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et leur élimination par les défenses anti oxydantes, contribue à l'initiation et à la progression de plusieurs maladies. Les radicaux sont très réactifs et peuvent attaquer, s'ils ne sont pas détruits, différentes cibles telles que les protéines, l'ADN, et surtout les acides gras poly insaturés (peroxydation lipidique). Au cours de diabète l'hyperglycémie provoque la génération des radicaux libres via multiples mécanismes ; auto-oxydation de glucose, glycation non enzymatique, la voie des polyols et la réduction de la défense antioxydante (*Bonnefont et al., 2000 ; Sharma et al., 2000*).

1. Bilan glucidique

Au cours de notre recherche, nous avons enregistré une glycémie à jeun et un taux d'HbA1c légèrement élevé, chez les diabétiques de type I et II par rapport aux sujets témoins sains, mais cette augmentation est significative mais elle reste toujours dans les normes, ce qui explique que le diabète est équilibré. Ce qui est en accord avec les travaux de (*Çakatay., 2005 ; Marcus et al., 2014 ; Sharma et al., 2000*).

2. Bilan lipidique

Une augmentation significative de la cholestérolémie et de triglycéridémie et de LDL-c, a été enregistrée chez les sujets DID et DNID par rapport aux témoins mais reste toujours dans les normes, ces résultats peuvent être expliquées comme suite :

- Aux cours de diabète (maladie métabolique), il ya toujours une perturbation du métabolisme lipidiques du VLDL due d'une part à la surproduction hépatique du VLDL, et par la diminution de l'activité enzymatique de la lipoprotéine lipase d'autre part (*Adeli et al., 2001*) et ce qui en accord avec les travaux de (*Çakatay, 2005*) qui a fait une comparaison entre le diabète équilibré et le diabète non équilibré.
- L'augmentation de l'LDL chez les diabétiques peut être due à leurs oxydation et glycation ce qui provoque une augmentation de leur demi de vie en circulation (*Min-Xin et al., 1996 ; Jane E et al., 2000*).

Nos résultats ont montré qu'au cours d'un diabète équilibré les concentrations sériques des Triglycérides et LDL-c sont normaux et le HDL-c est normal ou légèrement augmenté, ce qui en accord avec les résultats trouvés par(*Vergès., 2009*). On peut expliquer l'élévation de l'HDL-c chez les patients diabétiques de type 1 (DID) avec un bon

control glycémique par l'augmentation des particules de l'HDL-c contenant uniquement l'apoA-1 due à l'hyperactivité de LPL hépatique sous l'action de l'insuline c'est à dire le traitement du diabète par l'insuline fait augmenter l'HDL-c (*Kahri J, 1993*) (*Veki, 1993*).

3. Bilan rénal

Chez les sujets atteints de DID aucune différence significative de la concentration sérique de l'urée et de la créatinine a été enregistré.

Alors que l'étude a montré une diminution très hautement significative de l'uricémie (Acide urique) chez les DID par rapport aux témoins et pas de différence par rapport aux normes. La diminution de l'uricémie par rapport aux témoins peut être expliquer par le pouvoir antioxydant de l'Acide urique (*Stephen et al., 2006 ; Maxwell et al., 1997*). Dans le diabète non insulino dépendant, nos résultats révèlent une augmentation significative des concentrations sériques d'urée, de l'acide urique et de la créatinine (femmes) par rapport aux témoins ce qui montre que la population malade est exposée au risque d'insuffisance rénale(*Boeri et al., 2009*). La tolérance de glucose provoque une néphropathie ce qui augmente la concentration de l'acide urique dans le DNID ce qui en accord avec (*Olukoga et al., 1991*).

4. Bilan hépatique

En ce qui concerne les enzymes hépatiques (TGO, TGP), nous avons remarqué une augmentation significative de leur activité sérique chez les diabétiques de type I. Cette augmentation est expliquée par l'accumulation des acides aminés comme l'alanine et l'acide glutamique dans le sang provenant de la dégradation des protéines du corps. Ainsi ces acides aminés peuvent se transformés sous l'action des transaminases en composés carboxyliques tel que l'acide α céto-glutamique et l'acide pyruvique puis en glucose, ce qui traduit la forte activité enzymatique des transaminases (*Meral et al., 2005*).

Concernant la phosphatase alcaline et le bilirubine Totale, notre étude n'affiche aucune signification malgré qu'il y ait une diminution de taux de Bilirubine T et une augmentation de l'activité de PAL chez le DID.

Nous avons enregistré une diminution dans le taux de Bilirubine D chez les diabétiques. Cette diminution de taux de bilirubine D est devenue significative chez les patients DNID. Cette diminution de Bilirubine D a été expliqué par (*Fukui et al., 2008*)

qui ont dit que la Bilirubine est inversement proportionnelle aux marqueurs de stress oxydant.

La Bilirubine inhibe l'oxydation des lipoprotéines particulièrement le LDL-c, donc la bilirubine se protège les LDL ce qui permet la protection contre l'athérosclérose. (*Stocker et al., 1987 ; Wu et al., 1996*). La diminution de bilirubine est associée à une néphropathie parce que la bilirubine s'attache à l'Albumine pour être excréter par les reins (*Fukui et al., 2008*) ce qui est en accord avec nos résultats qui montrent une augmentation significative de l'Albumine et les Protéines Totales de nos sujets diabétiques.

5. Bilan antioxydant

Les paramètres du statut antioxydant, de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) de l'activité de GST sont regroupés dans le (**Tableau 4**).

La GPx de nos sujets diabétiques présente une variation significative par rapport aux sujets témoins. Au cours de notre étude, nous avons enregistré une diminution de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) dans le diabète type I dans le sérum qui est due à l'hyperglycémie ($1,5 \pm 0.025 \text{g/l}$) qui provoque l'inhibition de la voie du pentose phosphate par l'inhibition de la G6PD ce qui conduit à la déclenchement de la voie des polyols et la diminution du taux de NADPH qui est un cofacteur pour la GPx pour réduire le GSSG en GSH, ce qui provoque la diminution du GSH puis la diminution de l'activité de la GPx. Aussi, la glycation des protéines joue un rôle important dans la diminution de taux de la Gpx dans le DID. (*Yizhen Xu et al., 2005 ; Mohsen Firoozrai et al., 2007*).

Nous avons noté qu'il y a une augmentation très hautement significative dans le taux de la Gpx sérique chez les diabétiques de type 2, qui ont une glycémie bien équilibrée (1.2 ± 0.87), ce qui est en accord avec (*Tribe R et Poston L, 1996*) qu'ils ont trouvé que l'activité de la GPx plasmatique est toujours élevée et l'activité enzymatique érythrocytaire de l'enzyme est augmentée dans le diabète de type 2.

Dans l'hémolysât nous avons enregistré une augmentation très hautement significative de l'activité de la GPx (presque 10 fois plus que le sérum). Cette augmentation de l'activité de GPx est associée avec une augmentation de la LP dans l'hémolysât qui est peut-être due à la diminution de l'activité de SOD et de catalase (carence en NADPH^+) ce qui conduit à l'augmentation de dommage oxydatif des lipides ; bonne preuve de l'augmentation de la peroxydation lipidique, ainsi que l'augmentation de l'activité de GPx dans l'hémolysât, ce qui est en accord avec les travaux de (*Matkovics et al., 1982*).

Notre étude montre que la concentration du glutathion réduit (GSH) dans les érythrocytes ou bien le sérum est significativement diminué par rapport aux sujets témoins. Nos résultats concordent avec ceux de (*Mosaad et al., 2004; Susan et al., 1991*) et de (*Moussa, 2008*). Tout d'abord, au cours de l'activation de la voie des polyols induite par une hyperglycémie chronique, et par l'intermédiaire de l'aldose réductase utilisant le NADPH⁺ comme cofacteur, le glucose génère du sorbitol, converti ensuite en fructose par la sorbitol déshydrogénase à NAD (*Huertas et al., 2005 ; Ayepola et al., 2014*).

Le mécanisme moléculaire de la déplétion de la concentration du GSH est médié par la diminution de l'activité de l'enzyme clé de la synthèse du GSH; γ -glutamylcystéine synthétase (γ -GCS) ou par la dégradation importante du glutathion au cours du diabète (*Altan et al., 1994*); une autre explication est que cette déplétion due à l'augmentation de la concentration des intermédiaires de la peroxydation lipidique observées dans ces conditions, qui joue probablement un rôle très important dans la promotion des altérations du gène codant de cette enzyme ou la protéine elle-même (*Wolff et al., 1991 ; Tian et al., 1997*). D'autre part le glutathion (GSH) peut être converti en glutathion oxydé (GSSG) (*Griffith et Meister, 1979*).

La glutathion S-transférase (GST), joue un rôle important dans la désintoxication des xénobiotiques et/ou dans la protection contre des métabolites nocifs générés après la dégradation des macromolécules suite à leur exposition au stress oxydant (*Mulder et al., 1999*). D'après nos résultats on a observé une augmentation très hautement significative de la GST dans le sérum chez le DID et DNID. L'augmentation de l'activité de cette enzyme est une réponse physiologique pour compenser les altérations provoquées par les radicaux libres (*Nuriye et Belma, 2005*). Donc la GST est impliquée dans l'élimination des radicaux libres générés au cours de diabète (*Xu et al., 2002*). Notre point de vue dans le cas de l'augmentation significative de la GST est dû à la consommation des groupements thiols par les radicaux libres ce qui permet l'augmentation de l'activité de la GST qui transfère le groupement -S.

Le MDA, composé très toxique produit au cours de l'oxydation des lipides, et physiologiquement lors de la synthèse des prostaglandines et thromboxanes (*Gillery, 2006*). Nos résultats ont montré une augmentation significative de taux d'MDA chez les patients diabétiques qu'au pour les sujets témoins (sains). Des résultats similaires ont été rapportés par (*Noberasco et al., 1991 ; Gallou et al., 1993 ; Kumar et al., 2013*), et (*Sato et al., 1979*).

Cette attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires. Les conséquences seront différentes : l'attaque des lipides circulants aboutissant à la formation de LDL (lipoprotéines de densité légère) oxydées qui, captées par des macrophages, formeront dépôt lipidique de la plaque d'athérome (*Kassab A et al., 2003*) des maladies cardiovasculaires, l'attaque de phospholipides membranaires modifiant la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement des nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (*Favier, 2003*).

La peroxydation des lipides résulte de l'attaque par des radicaux libres des acides gras. Cette réaction est à l'origine de dommages tissulaires responsables de cancers, de maladies inflammatoires, du vieillissement et de lésions vasculaires comme l'athérosclérose (*Raccab, 2004*).

Nos résultats montrent que l'activité enzymatique de GPx est proportionnelle avec la concentration du lipoperoxyde (MDA) et inversement proportionnelle avec l'activité de la GST. On a noté quand l'activité de la GST augmente, l'activité de GPx est diminuée, ce qu'on peut l'expliquer peut-être, par l'activation de voie des polyols ce qui provoque la diminution du NADPH⁺ un cofacteur des nombreuses enzymes qui conduit à une diminution de l'activité de glutathion réductase catalase et SOD, et par conséquence, une élévation des radicaux dans le cytosol provoquant la peroxydation des lipides ce qui explique l'augmentation de la concentration du MDA érythrocytaires. Donc l'affinité de la GPx aux lipoperoxydes augmentera et alors elle va réduire les lipoperoxydes utilisant la GSH ce qu'il explique l'augmentation de l'activité de GPx et la diminution de l'activité enzymatique de GST dans l'hémolysât.

L'activité enzymatique de GST augmente dans le sérum par rapport au GPx car elle est la conséquence de la suractivité des mitochondries (hyperglécémie) qui libèrent le ROH traité par GST (avec consommation GSH ce qui explique l'augmentation de l'activité de GST chez les DID et DNID par rapport aux sujet témoin sains.

CONCLUSION

Les maladies métaboliques et plus spécifiquement le diabète sucré conditionné par la diminution de la défense antioxydante même si le diabète est équilibré. Nous avons observé une diminution de la défense antioxydante, ce qui provoque l'augmentation des marqueurs du stress oxydant comme les lipoperoxydes. La génération de radicaux libres et la peroxydation lipidique est le premier signe des complications diabétiques (neuropathie, rétinopathie, cardiopathie et néphropathie).

Nous avons noté aussi qu'il y a une relation inversement proportionnelle entre l'activité enzymatique de la GPx et celle de la GST.

Il faut garder en équilibre la balance du statut oxydant/antioxydant, et pour le faire il faut avoir un traitement adéquat, une bonne hygiène alimentaire riche en légumes et en fibres, une activité physique régulière, et une supplémentation en antioxydants devient nécessaire. Aussi, il faut suivre les patients par une détermination du statut anti oxydant (SOD, GPx, GSH, GST, Catalase), ainsi que les marqueurs de la peroxydation lipidique (MDA), qui constituent un signe d'alarme des complications graves qui apparaîtront à moyen et à long terme.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. (s.d.). Récupéré sur INSERM: <http://www.inserm.fr/thematiques/physiopathologie-metabolisme-nutrition/dossiers-d-information/atherosclerose>
2. Adeli. K., T. C. (2001). Mechanisms of hepatic very low-density lipoprotein overproduction in insulin resistance. *Trends Cardiovasc Med*, 11(5), 170-6.
3. Albertus, C. (2015). Relations entre obesite et maladie parodontale. .These de doctorat en chirurgie dentaire, 152p. Nancy, Universite de lorraine faculte d'odontologie de Nancy.
4. Altan, O. N. (1994). Effect of the sulfonylurea glyburide on glutathione and glutathione peroxidase activity in alloxan– induced diabetic rat hepatocytes. *GenPharmacol*, 25, 875-878.
5. American diabetes association. (2001). clinical practice recommendations (position statement). *Diabetes care*, 1, 33-55.
6. American Diabetes Association. (2011). Diagnosis and classification of diabetes. *Diabete care*, Volume 34, S62–S69.
7. ANNICOTTE, J.-S. (2004). Etude des fonctions pancréatiques du récepteur nucléaire orphelin Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1) et du facteur de transcription E2F1. Thèse de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie, 115. Strasbourg, UNIVERSITE STRASBOURG I - LOUIS PASTEUR Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire.
8. Auberval, N. (2010). Prévention du stress oxydant dans le diabète et ses complications par des antioxydants d'origine naturelle. Thèse de doctorat, 257. Strasbourg, Université de Strasbourg.
9. Audrey, D.-N. (2002). Etude des glycosphingolipides des cellules microvasculaires rétiniennes: effet d'un environnement diabétique. Thèse de doctorat, 264. Lyon, L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.
10. Ayepola, A. N. (2014). Oxidative stress and diabetic complications: The role of antioxidant vitamins and flavonoids. *InTech, Antioxidant-Antidiabetic Agents and Human Health*, 26-58, 26-58.
11. Badouard, C. (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 de doctorat, 182 p. Grenoble, Université Joseph Fourier Grenoble I.
12. Baratli, Y. (2015). ETUDE DE LA TOXICITE DES NANOPARTICULES De Fe₃O₄ CHEZ LE RAT ANALYSES MITOCHONDRIALES ET DU STRESS OXYDANT. Thèse de doctorat, 137 p. Université de Strasbourg et Université de Carthage.

13. Benaraba, R. (2007). Insulinorésistance et stress oxydant dans le syndrome métabolique : Etude expérimentale des effets protecteurs de microconstituants nutritionnels (polyphénols du thé, de la cannelle et chrome III). Thèse de doctorat, 246 p. UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBL 1.
14. Bertry, R. (2011). Les mécanismes toxiques liés à l'hyperglycémie chronique chez le diabétique de type 2. Thèse de doctorat en pharmacie, 102. Limoges, UNIVERSITE DE LIMOGES. Faculté de Médecine et de Pharmacie.
15. Betty, L. (2003). Physiopathologie du pancréas :Rôle de l'inflammation dans la cancérogenèse du pancréas exocrine. thèse de doctorat en pharmacie., 98. Limoges, Université de LIMOGES.
16. Boeri D, D. L. (1998). Intrarenal arteriosclerosis and impairment of kidney function in NIDDM subjects. *Diabetologia*, 41(1), 121–4.
17. Boeri, D., LE, D., C, M., G, S., L, S., D, S., . . . M, M. (2009). Intrarenal arteriosclerosis and impairment of kidney function in NIDDM subjects. *Diabetologia*, 41(1), 121-4.
18. Bonnefont-Rousselot, D., Bastard, J.P, Joudon, M., & and Dellala, J. (2000). Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxy balance. *Diabete and metabolism*, vol 26, 163-176.
19. Boussekine, S. (2014). Contribution à l'étude de l'effet du sélénium sur le mécanisme biochimique chez le diabète expérimental. Thèse de doctorat en biochimie, 100. Annaba, Université Badji Mokhtar.Département de Biochimie.
20. Çakatay, U. (2005). Protein oxidation parameters in type2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Diabetes Metab*, 31, 551-557.
21. Calver A., C. J. (1992). Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *Clin Invest*, vol 90, p 2548-2554.
22. Cameron, M. N. (1992). Impaired contraction and relaxation in aorta from streptozotocin- diabetic rats: role of polyol pathway. *Diabetologia*, vol 35, p 1011-1019.
23. Chabbaud, M. (2007). UTILISATION DES ANTIOXYDANTS EN HEPATOLOGIE CHEZ LES CARNIVORES DOMESTIQUES. Thèse de doctorat, 119 p. Lyon, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON.
24. Clémentine, P. (2013). Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique. Thèse de doctorat en toxicologie, 414 p. Paris, UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11.

25. Clémentine, P. (2013). Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique. Thèse de doctorat en toxicologie, 414 p. Paris, UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11.
26. Collard, F. W. (2004). Fructosamine 3-kinase-related protein and deglycation in human erythrocytes. *Biochem.J*, 382, 137-143.
27. COOKE, M., OLINSKI, R., & EVANS, M. (2006). Does measurement of oxidative damage to DNA have a clinical significance? *Clin Chim Acta*(365), 30-49.
28. Delpierre, G. &. (2003). Fructosamine 3-kinase, an enzyme involved in protein deglycation. *Biochem.Soc.Trans*, 31(6), 1354-1357.
29. Elouil, H. (2009). Glucotoxicité et alterations de l'expression génique dans les cellules β pancréatiques : rôle du facteur de transcription Nfkb et du stress du reticulum endoplasmique. Thèse de doctorat, 162 p. Louvain, Université catholique de Louvain. Département de Physiologie et Pharmacologie.
30. Favier, A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, l'actualité chimique. *Mécanismes biochimiques*, 108-115.
31. Fontbonne, D. A. (2001). Épidémiologie du diabète. *Encycl Méd Chir*, 10-366-B-10, 9 p.
32. Fukui, M., Muhei, T., Emi, S., Ichiko, H., Hiroko, H., Mai, A., . . . Naoto, N. (2008). Relationship between serum bilirubin and albuminuria in patients with type 2 diabetes. *Kidney International*, 74, 1197-1201.
33. Gallou, G., Ruelland, A., Legras, B., Maugendre, D., Allannic, H., & Cloarec, L. (1993). Plasma malondialdehyde in type 1 and type 2 diabetic patients. *ClinicaChimicaActa*, 214, 227-234. .
34. Ghafourifar, P., & Cadenas, E. (2005). Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci*, 26, 190-5.
35. Ghahary A., L. J. (1989). (1989). Increased renal aldose reductase activity, immunoreactivity, and mRNA in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, 38, 1087-1071.
36. Gillery, P. (2006). Stress oxydant et glycation des protéines au cours du diabète sucré,. *Ann Biol Clin*, 64(4), 309-314.
37. Griffith, A. O. (1979). Glutathione: Interorgan translocation, turnover, and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Biochemistry*, 76(11), 5606-5610.
38. Guerin-Dubourg, A. (2014). Etude des modifications structurales et fonctionnelles de l'albumine dans le diabète de type 2 : identification de biomarqueurs de glycoxydation et de facteurs de risque de complications vasculaires. Thèse de doctorat en biochimie, 170p. Réunion, Université de la Réunion.

39. HALENG, J. e., DEFRAIGNE, O., CHARLIER, C., & CHAPELLE, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Rev Med*(62 : 10), 628-638.
40. Hiramatsu, K., Edwin, L., Bierman, & Alan, C. (1985). Metabolism of low-density lipoprotein from patients with diabetic Hypertriglyceridemia by cultured human skin fibroblasts. *DIABETES*, 34, 8-14.
41. Huertas, C. (2005). Physiopathologie des complications rhumatologiques du diabète : Le pied. diabétique, la lettre de l'observatoire du mouvement, HS N° 07.
42. Jane E, W. H. (2000). Effect of supplementation with tomato juice, vitamin E, and vitamin C on LDL oxidation and products of inflammatory activity in type 2 diabetes. *DIABETES CARE*, 23(6), 733-738.
43. Januel, C. (2003). STRESS OXYDANT AU NIVEAU DES PLAQUETTES SANGUINES HUMAINES DANS LE CONTEXTE DU DIABETE Etude du glutathion et de la glutathion peroxydase 4. these de doctorat en biochimie, 200 p. Lyon, Université Lyon I / INSA-Lyon.
44. Jean-Baptiste, C. R. (2010). COMPARAISON ENTRE LA METHODE EPIDEMIOLOGIQUE ET LA METHODE BACTERIOLOGIQUE DE DIAGNOSTIC LORS D'UNE EPIZOOTIE DE MAMMITES EN ELEVAGE BOVIN. Thèse de doctorat veterinaire, 83 p. ÉCOLE NATIONALE VETERINAIRE D'ALFORT.
45. JenniferBaraka-Vidot, M. (2014). Stress oxydant et pathologie diabétique a l'île de La Réunion -Identification et caractérisation des propriétés structurales et fonctionnelles de l'albumine glyquée. Thèse de doctorat, 196. l'île de La Réunion, Médecine humaine et pathologie. Université de la Réunion.
46. Julien, F., & Filaire, G. L. (2006). Oxidative Stress Relationship with Exercise and Training. *Sports Med*, 4(36), 327-358.
47. Kahri J, G. P. (1993). Regulation of apolipoprotein A-I containing lipoproteins in IDDM. *Diabetes*, 42, 1281-1288.
48. Kaplan LA., & Kaplan A., A. (1984). Glucose. *Clin Chem the C.V Mosby CO*. 1032 -1036. St LouisToronto.Princeton.
49. Kassab A. Laradi, S. F. (2003). Paramètres du stress oxydant dans le diabète de type 2. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 18, 79-85.
50. Kassab, A., Laradi, S., Ferchichi, S., Omezzine, A., Charfeddine, B., Ammar, H., . . . Miled, A. (2003). Paramètres du stress oxydant dans le diabète de type 2. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée* , 18, 79-85.
51. KELLIL, S. (2015). Purification et caractérisation d'une enzyme coagulante d'origine microbienne pour application en fromagerie. Thèse de doctorat, 166 p. BOUMERDES, UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA.

52. KOCEIR, A. (s.d.). ASPECTS PHYSIOPATHOLOGIQUES ET BIOENERGETIQUES DU STRESS OXYDANT DANS LE DIABETE : Rôle de la mitochondrie. 6. Alger, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene. Faculté des Sciences Biologiques.
53. Koller, A. (1984). total serum protein. 1268-1273. ST Louis. Toronto. Princeton.
54. Kumar, V. G., Benerji, G., Babu, F. M., & Kumari, R. D. (2013). Lipids and Lipid Peroxidation in Diabetes Mellitus with Complications. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 4(4).
55. Ladouari, A., & Harkouk, Y. (2012). Effet du décocté de *Zygophyllum album* Coss sur le diabète et le stress oxydant associé. Alger, Université d'Alger.
56. Lafiance, L. (1996). L'insulinothérapie intensive et son application clinique chez les adultes et les adolescents diabétiques insulinodépendants. Thèse de Ph.D, 233. Montréal, Faculté de Médecine. Département de nutrition.
57. LAVERDET, B. (2013). Physiopathologie du pancréas : Rôle de l'inflammation dans la cancérogenèse du pancréas exocrine. UNIVERSITE DE LIMOGES Faculté de Pharmacie.
58. Maahs DM, N. K.-B. (2011). Association of insulin sensitivity to lipids across the life span in people with type 1 diabetes. *Diabetic Medicine*, 28(8), 148-155.
59. Malika, T., Anne, M., & Begué, S. (2009, juin). Antioxydants Première partie: les anti oxydants dans l'alimentation. *MÉDECINE*, 265, 5.
60. Marcus, L., & Ann-Marie, S. M. (2014). Glycemic Control and Excess Mortality in Type 1 Diabetes. *N Engl J Med*(371), 1972-1982.
61. Marie-Jennifer Baraka-Vidot. (2014). Stress oxydant et pathologie diabétique à l'île de La Réunion - Identification et caractérisation des propriétés structurales et fonctionnelles de l'albumine glyquée. Médecine humaine et pathologie. Université de la Réunion.
62. Matkovic, B., Varga, S., Szabo, L., & Witas, L. (1982). The Effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolism enzymes. *Horm. metabol. Res*, 14, 77-79.
63. Maxwell S. R. J, T. H. (1997). Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non insulin-dependent diabetes mellitus. *European journal of clinical investigation*, 27, 484-490.
64. Meral, K., Sevim, T., Sehnaz, B., & Refiye, Y. (2005). Effect of vanadyl sulphate on liver of streptozotocine induced diabetic rats. *Biol Trace Elem Res*, vol 104, 233-245.
65. Min-Xin, F., Jesus, R. R., & John W, B. S. (1996). The advanced glycation end product, Nε-(Carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions*. *BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 271(17), 9982-9986.

66. Mohsen Firoozrai, M. a.-A. (2007). Erythrocyte susceptibility to oxidative stress and antioxidant status in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 72, 427-432.
67. Mongens, M. (2013). ORIGINE ET CONSÉQUENCES DU STRESS OXYDANT. Thèse de doctorat, 113 p. Alfort, ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT.
68. Monterrat, C. (2004). Les synaptotagmines et le transport vésiculaire dans les cellules β pancréatiques : une isoforme pour chaque étape. Thèse de doctorat, 211. Bordeaux, l'université Bordeaux I.
69. MORALES, F. (s.d.). Consulté le Novembre 5, 2009, sur <http://www.intellego.fr/soutien-scolaire--/aide-scolaire-svt/schemade-la-regulation-de-la-glycemie/38404>
70. Morhan, S. D. (s.d.). *Oxidative stress and Diabetes*. Michigan, Wayne State University School of Medicine.
71. Mosaad A. Abou-Seif, A.-A. Y. (2004). Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients, Elsevier B.V. *Clinica Chimica Acta*, 346, 161-170.
72. Moussa, S. (2008). Oxidative stress in diabetes mellitus, , . *Romanian J. Biophys*, 18(3), 225-236.
73. Mulder, T. P., Court, D. A., & Peter, W. H. (1999). Variability of glutathione-S-transferase in human liver and plasma. *Clin. Chem*, 45, 355-359.
74. Niedernhofer, L., Daniels, J., Rouzer, C., & Greene, R. a. (2003). Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem*, 278, 31426-33.
75. Nkhili, E. (2009). Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. These de doctorat, 320 p. MARRAKECH, UNIVERSITÉ CADI AYYAD - FACULTÉ DES SCIENCES SEMLALIA– MARRAKECH.
76. Noberasco, G., Odetti, P., Boeri, D., Maieilo, M., & Adezati, L. (1991). Malondialdehyde (MDA) level in diabetic subjects. Relationship with blood glucose and glycosylated hemoglobin. *Biomed Pharmacother*, 45, 193-196.
77. Nuriye, N. U., & Belma, T. (2005). Beneficial effects of selenium on some enzymes of diabetic rats heart. Humana Press Inc. *Biological trace element research.*, vol 103, 207-215.
78. Olukoga, A., Erasmus, R., Akinlade, K., Okesina, A., & Alanamu, A. e. (1991). Plasma urate in diabetes: relationship to glycaemia, glucose disposal, microvascular complications and the variations following oral glucose. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 14, 99-106.

79. Orban, J. -C., & Ichai, C. (2008). Complications métaboliques aiguës du diabète. *Réanimation*(17), 761-767.
80. PAPIN, J. (2009). Bases moléculaires des défauts sécrétoires des cellules β pancréatiques lors de la glucotoxicité. Thèse de doctorat : Sciences de la vie et de la santé, 192. Bordeaux, UNIVERSITÉ BORDEAUX 1.
81. Quesada, I., EvaTuduri, Cristina, R., & Angel, N. (2008). Physiology of the pancreatic alpha cell and glucagon secretion role in glucose homeostasis and diabetes. *Journal of Endocrinology*(199(1)), 5-19.
82. Raccach, D. (2004). *Epidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré*. Elsevier SAS. EMC-Endocrinologie, 1, 29-42.
83. SebbaghN, C. S. (2007). Evaluation 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. *Diabète & Métabolisme*, 33(155).
84. Sharma, A., Kharb, S., Chugh, S., & Kakkar, R. e. (2000). Evaluation of oxidative stress before and after control of glycemia and after vitamin E supplementaion in diabetic patient. *Metabolism*, vol 49, 160-162.
85. Sharma, A., Simmi, K., S.N, C., & Rajesh, K. a. (2000). Evaluation of oxidative stress before and after control of glycemia and after vitamin E supplementation in diabetic patients. *Metabolism*, 149(2), 160-162.
86. Shimizu H., O. K. (2000). Aldose reductase mRNA expression is associated with rapid development of diabetic microangiopathy in Japanese Type 2 diabetic (T2DM) patients. *Diabetes Nutr Metab*, vol 13, p 75-79.
87. Smardo, F. L., Burg, J. M., & A, G.-P. (1992). Kidney aldose reductase gene transcription is osmotically regulated. *Am J Physiol*, 268, p C776-C782.
88. Stephen W, W., John A, M., & David J, W. a. (2006). Uric acid restores endothelial function in patients with Type1 diabetes and regular smokers. *DIABETES*, vol 55, 3127-3132.
89. Stocker, R., Yamamoto, Y., & McDonagh, A. e. (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, 235, 1043–1046.
90. Susan V. Mclennan, S. H. (1991). Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. *DIABETES*, 40, 344-348.
91. Tian, S. L. (1997). Increased transcription of the regulatory subunit of gamma-glutamylcysteinesynthetase in rat lung epithelial L2 cells exposed to oxidative stress or glutathione depletion. . *Arch BiochemBiophys*, 342, 126-133.
92. Tietz, N. (1999). *textbook of clinical chemistry*. 794-795. Philadelphia, Saunders company.

93. Tribe RM, P. L. (1996). Oxidative stress and lipids in diabetes: a role in endothelium vasodilator dysfunction. *Vasc Med*, 1, 195-206.
94. Veki, H. O. (1993). Increase in lipoprotein lipase activity in isolated rat adipose tissue by selenate. *Biol. Pharm. Bull*, 16, 6-10.
95. Vergès, B. (2009). Lipid disorders in type 1 diabetes. *Diabetes & Metabolism* 353–360, 35, 353-360.
96. Wolff, J. S. (1991). Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free BiolMed. Free BiolMed*, 10, 339-352.
97. Wu, T., Fung, K., Wu, J., & al, e. (1996). Antioxidation of human low density lipoprotein by unconjugated and conjugated bilirubins. *Biochem Pharmacol*, 51, 859-862.
98. Xu, Z., Patel, K. P., Lou, M. F., & Rozanski, G. J. (2002). Up-regulation of K⁺ channels in diabetic rat ventricular myocytes by insulin and glutathione. *Cardiovasc. Res*, 53, 80-88.
99. Yizhen Xu, B. t. (2005). Diabetes causes inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase via activation of PKA, which contributes to oxidative stress in rat kidney cortex. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289, F1040–F1047.

ANNEXES



Questionnaire



Madame, Mademoiselle, Monsieur,
 Dans le cadre de la réalisation de notre mémoire de fin d'études, le recueil de certaines données vous concernant est jugé utile. Pour ce faire, je vous prie de remplir le questionnaire ci-dessous.

Information Générales :

Nom Et Prénom : N° :
 Date De Naissance : / / Age :

Taille : cm Poids : kg
 Tension artérielle : /

Diagnostic :

Diagnostic :

Date de découverte : / / Date de la dernière consultation : / /

Traitement :

	Non	Oui	Commentaires
Antidiabétiques oraux	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Depuis : <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
Insulinothérapie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Depuis : <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
Autres médicament	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Lesquels ? <input type="text"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Pourquoi ? <input type="text"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Lesquels ? <input type="text"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Pourquoi ? <input type="text"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Lesquels ? <input type="text"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Pourquoi ? <input type="text"/>

Evolution

Hypoglycémie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Seulement occasionnelle <input type="checkbox"/> Episodes fréquents
Diabète contrôlé	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Depuis le : <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
Sous surveillance médicale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Depuis le : <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
Antécédent d'acido-cétose, de coma acido-cétosique ou hyperosmolaire non cétosique	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Nombre : <input type="text"/> Dernier le : <input type="text"/>

Manifestation

	NON	OUI	Commentaires	Dates
Retentissement rénal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Néphropathie diabétique	<input type="text"/>
Retentissement vasculaire	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Maladie coronarienne	<input type="text"/>
			<input type="checkbox"/> Maladie des artères périphériques	<input type="text"/>
			<input type="checkbox"/> Rétinopathie proliférative	<input type="text"/>
			<input type="checkbox"/> Maladie cérébrovasculaire	<input type="text"/>
Retentissement neurologique	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Neuropathie diabétique autonome <input type="checkbox"/> Neuropathie diabétique périphérique	<input type="text"/>
Facteurs de risques associés :				
Hérédité	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Père <input type="checkbox"/> Mère <input type="checkbox"/> Frère(s) <input type="checkbox"/> Sœur(s)	
Tabac	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Fumeur actuel <input type="checkbox"/> Ancien fumeur Consommation : <input type="text"/> / jour Date d'arrêt : <input type="text"/>	
Cholestérol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Total : <input type="text"/> HDL : <input type="text"/>	
HTA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Résultat du dernier contrôle : <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/>	
Activité :				
Sédentaire : <input type="checkbox"/>		Actif(ve) : <input type="checkbox"/>		Sportif(ve) : <input type="checkbox"/>

Profile Biologique :

Test	Nom Complet	Concentration	Unité	Références
Glucose	Glycémie		g/L	0.72 - 1.10
Urée	Urée sanguine		g/L	0.15 - 0.50
Créatinine	Créatininémie		mg/L	7.00 - 14.00
Cholestérol T	Cholestérolémie		g/L	1.50 - 2.50
Triglycérides	Triglycéridémie		g/L	0.30 - 1.70
TGO	ASAT		UI/L	< = 38.00
TGP	ALAT		UI/L	< = 40.00
Bilirubine T	Bilirubine Totale		mg/L	< = 12.00
Bilirubine D	Bilirubine Directe		mg/L	< = 04.00
Albumine	Albuminémie		g/L	35.00 - 55.00
Protéines T	Protéïnémie		g/L	55.00 - 80.00
CPK	Créatine Phosphokinase		UI/L	25.00 - 180.00
LDH	Lactate Déshydrogénase		UI/L	200.00 - 410.00
Acide Urique	Uricémie		mg/L	25.00 - 75.00
PAL	Phosphatase Alcaline		UI/L	95.00 - 280.00
HDL	α -lipoprotéïnémie		g/L	0.35 - 0.62
LDL	β -lipoprotéïnémie		g/L	1.35 - 1.75
HbA1c	Hémoglobine glyquée		%	4.5 - 6

