

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHESCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE BLIDA -1-

FACULTE DES SCIENCESDE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE



En vue de l'obtention du diplôme de  
**MasterII: EN SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**

**Filière : SCIENCES BIOLOQUES**

*Option : Génie biologique*

*Thème :*

MONOXYDE DAZOTE ( NO ) ET  
L'EQUILIBRE GLYCEMIQUE CHEZ LES  
DIABETIQUES TYPE 1

Présenté par :

❖ **BENYESSAD Karima**

Devant le jury composé de :

M <sup>r</sup> BOUKHATEM .M.N.	MAA	UB1	Président
M <sup>me</sup> CHAKHEMA.A	MAA	UB1	Examinatrice
M <sup>me</sup> EDDAIKRA A.	MAA	UB1	Promotrice

*Promotion : 2015 - 2016*

## REMERCIEMENTS

Avant toute chose, Je remercie Dieu le tout puissant de m avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

je tiens à remercier vivement notre promotrice **Mme EDDAIKRA**, qui a bien voulu par son aimable bienveillance diriger ce travail.

Nous voudrions également lui témoigner notre profonde gratitude pour sa patience et son soutien.

Je remercie monsieur BOUKHATEM, d'avoir Accepté de présider le jury de ma soutenance.  
Je remercie Mme . d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je remercie également tous les enseignants du Département de Biologie ainsi l'équipe du laboratoire d'analyse médicale de l'établissement de santé public de proximité «hassiba ben bouali» benboulaid BLIDA.  
pour toute l'aide apportée pendant mon stage.

A tous ceux qui ont contribué dans de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

# *Dédicaces*

*Je dédie ce mémoire à toutes les personnes qui me sont Chères  
et particulièrement :*

*À mes merveilleux parents que j'adore à qui je  
dois tout et qui je suis et serai fière, très chère  
maman, qui m'a donné la vie et m'a aidée grâce à  
son soutien total et très cher papa , qui m'a aidé  
et qui a déployé tous les moyens possibles pour ma  
réussite.*

*À mes chères sœurs et mes pour leurs  
soutiens moraux et matériels.*

*A tous mes amis.*

## *Résumé*

Le but de notre étude est dans de comprendre la relation qui existe entre le stress physiologique causé par l'hyperglycémie chronique et le monoxyde d'azote (NO) chez le DT1.

Notre étude a été menée sur 64 patients dont 32 cas sont des diabétiques de type 1 d'apparence saines sans complications, et 32 témoins sains.

Notre étude a démontré que le DT1 survient chez l'individu jeune avec une prédominance féminine avec une moyenne d'âge de  $36,54 \pm 1,97$ .

Nos résultats montrent également que le taux du NO est plus élevé chez les DT1 par rapport aux témoins. Le caractère insulinooprive du diabète est confirmé par les valeurs moyennes du peptide C. en effet, ce dernier ne semble pas être influencer l'augmentation du NO. L'analyse de régression du NO chez les diabétiques a montré une corrélation positive avec ( $r=+0,01437$ ,  $\alpha < 0,05$ ). En revanche, nos résultats montrent aussi une diminution des valeurs du NO en fonction de l'augmentation des pourcentages de l'HbA1C. ce dernier, semble indiquer un retour à l'état inflammatoire suite à un déséquilibre glycémique. En outre, la peroxydation lipidique été plus élevée chez les DT1 alors que le taux de la catalase été faible chez les DT1 par rapport aux témoins.

L'augmentation des taux de NO chez nos diabétiques suggère la présence d'un état inflammatoire et la présence d'un stress oxydatif. En effet, cet état inflammatoire peut contribuer à des complications vasculaires chez ces patients diabétiques

**Mots clés** : diabète type 1, monoxyde d'azote, stress oxydant malondialdehyde, hyperglycémie, peptide C, catalase.

# Abstract

The aim of this study is understand to the relationship between the physiological stress caused by chronic hyperglycemia and nitrogen monoxide (NO) with T1D.

Our study was conducted on 64 patients of which 32 cases are type 1 diabetics without complications healthy appearance), and 32 healthy controls.

Our study showed that T1D occurs in individuals with a young female with an average age of  $36.54 \pm 1.97$ .

Our results also show that NO rate is higher in T1DM compared to controls. The insulin-dependent diabetes character is confirmed by the average values of C-peptide in fact, it does not seem to influence the increase of NO. The regression analysis of NO in diabetes showed a positive correlation ( $r = 0.01437 +$ ,  $\alpha < 0.05$ ). However, our results also show a decrease in NO values depending on the increase in the percentages of HbA1c. it seems to indicate a return to the inflammatory condition following a glycemc imbalance. In addition, lipid peroxidation was higher in T1D while the rate of catalase was lower in T1DM compared to controls.

We can concluded that in levels NO increase in our diabetic and that suggests an inflammatory condition and the presence of oxidative stress. Indeed, this inflammatory state may contribute in vascular complications in diabetic patients

Key words: type 1 diabetes, nitric oxide, malondialdehyde oxidative stress, hyperglycemia, C-peptide, catalase.

## ملخص

الهدف من دراستنا هو فهم العلاقة بين الإجهاد الفسيولوجي الذي يسببه ارتفاع السكر في الدم المزمن وأول أكسيد النيتروجين عند مرضى السكري نوع 1.

وقد أجريت الدراسة على 64 مريض منهم 32 حالة هي مرضى السكري نوع 1 من دون مضاعفات، و 32 من الأصحاء.

وأظهرت دراستنا أن مرض السكري نوع 1 منتشر عند فئة الشباب ( $1,97 \pm 36,54$ ) سنة مع ارتفاع نسبته عند الإناث.

تظهر نتائجنا أيضا أن كمية أول أكسيد النيتروجين مرتفعة لدى مرضى السكري نوع 1 مرتفعة مقارنة مع الأصحاء الطابع السكري insulinoprive أكد متوسط قيم البيبتيد c, هذا الأخير لا يبدو متأثر بارتفاع أول أكسيد النيتروجين عند مرضى السكري ووجود علاقة ( $r=+0,01437, \alpha < 0,05$ ) مع ذلك , نتائجنا تظهر أيضا انخفاض في قيم أول أكسيد النيتروجين بدلالة الارتفاع في نسبة الهيموجلوبين السكري. هذا الأخير يدل على العودة إلى حالة الالتهاب بعد اختلال نسبة السكر في الدم. بالإضافة إلى ذلك, كان بيروكسيدهون جد مرتفع لدى مرضى السكري نوع 1 مقارنة مع الأصحاء.

الارتفاع في مستويات أكسيد النيتروجين عند مرضى السكري لدينا تشير إلى وجود حالة التهاب ووجود الدفاع التأكسدي, في الواقع هذه الحالة الالتهابية يمكن أن تساهم في المضاعفات الوعائية لدى مرضى السكري نوع 1

**الكلمات المفتاحية:** مرض السكري من النوع 1، الدفاع التأكسدي، الكاتالاز، ارتفاع السكر في الدم، أكسيد النيتروجين

البيبتيد c

## LISTE DES ABREVIATIONS

**ADA** : American Diabetes Association

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**AGE** : Advanced Glycation End-products

**AGL** : Acide Gras Libre **ALAT (GPT)**: Alanine Amino Transférase

**ATP** : Adénosine Triphosphate

**CHOD** : Cholestérol Oxydase

**CPA** : Cellule Présentatrice d'Antigène

**CMH** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

**CML** : CarboxyMéthylLysine

**DNPH** : Di-nitrophényl-hydrazone

**DAG** Di-acyl glycérol

**DT1** : Diabète de type 1

**ERN** : Les espèces réactives de l'azote

**ERO** : Les espèces réactives de l'oxygène

**GAPDH** Glycéraldehyde-3-phosphate-dehydrogénase

**GFAT** : Glucosamine fructose amido-transférase

**GPx** Glutathion peroxydase

**GAD** : Glutamate Acide Décarboxylase

**GADA** : Autoanticorps anti Décarboxylase d'Acide Glutamique

**GK** : Glycérol kinase

**GOD** : Glucose Oxydase

**GPO** : Glycérol-Phosphate-Oxydase

**4-HNE** : 4-Hydroxy-nonéal

**HPLC** : High Performance LiquidChromatography

**IAA** : Auto-anticorps anti-insuline

**IA-2A** : Anticorps anti-IA2

**ICA** : Isletcellantibody

**IMC** : Indice de masse corporel

**IR** : InsulinReceptor

**IRS** : InsulinReceptorsubstrates

**MAPK** : MitogenActivatedProtein kinase

**MDA** : Malondialdéhyde

**MGO** : Méthylglyoxal

**NAD<sup>+</sup>** Nicotinamide Adénine Dinucléotide

**NADPH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

**NF- $\kappa$ B** Nuclear factor kappa B

**NO** : Monoxyde d'azote

**PI3K** : Phosphadidyl-inositol-3-kinase

**PIP3** : PhosphatidylInositol tris-Phosphate

**PKB/Akt** : Proteine Kinase B

**PKC** : Proteine Kinase C

**PTEN** : Phosphatase and tensin homolog

**PTP** : Protéines Tyrosine Phosphatases

**RAGE** : Receptor for Advanced GlycationEndproducts

**SOD** : Superoxydedismutase

**TBARS** : ThioBarbituricAcidReactive Substances



**TNF  $\alpha$**  : TumorNecrosis Factor  $\alpha$

**UDP-GlcNac** : UDP-N-acétylglucosamine

# LISTE DES TABLEAUX

N° de tableau	titre de tableau	N° de page
<b>Tableau I</b>	Caractéristiques cliniques et épidémiologique de la population de l'étude.....	27
<b>Tableau 2</b>	Evaluation de la concentration du monoxyde d'azote chez les Diabétique de type1 et les Témoins .....	28
<b>Tableau 3</b>	Evaluation de la concentration du MDA chez les diabétiques de type1 et les témoins .....	29
<b>Tableau 4</b>	Evaluation du taux moyen de la catalase chez les DT1 et les témoins.....	30
<b>Tableau 5</b>	Variation des taux du NO en fonction de l'hémoglobine glyquée chez les DT .....	31
<b>Tableau 6</b>	Variation des taux du NO en fonction de peptide C chez les DT1 .....	32

## LISTE DES FIGURES

N° de figure	titre de figure	N° de page
<b>Figure 1:</b>	Interaction entre génétique, facteur environnementaux et système immunitaire lors de destruction auto-immune des cellules $\beta$ .....	02
<b>Figure 2 :</b>	mécanisme de destruction auto-immun de la cellule $\beta$ dans le diabète type 1.....	03
<b>Figure 3 :</b>	Le stress oxydant .....	05
<b>Figure 4 :</b>	Schéma récapitulatif des sources des ROS, des enzymes impliquées dans la défense antioxydantes et des cibles biologiques.....	07
<b>Figure 5 :</b>	Pyramide des systèmes de défenses antioxydants .....	07
<b>Figure 6 :</b>	Relation entre hyperglycémie et stress.....	08
<b>Figure 7 :</b>	Réactions à l'origine de la production d'ERO par autoxydation du glucose .....	12
<b>Figure 8 :</b>	Formation des produits avancés de glycation.....	13
<b>Figure 9 :</b>	Déplétion du glutathion par la voie des polyols .....	14
<b>Figure 10 :</b>	Activation des PKC .....	15
<b>Figure 11 :</b>	Voie des hexosamines et conséquences.....	16
<b>Figure 12 :</b>	Evaluation de la concentration de monoxyde d'azote chez les diabétiques de type 1 et les témoins.....	29
<b>Figure 13 :</b>	Evaluation évaluation de la peroxydation lipidique chez les diabétiques de type 1 et les témoins.....	30
<b>Figure 14 :</b>	Evaluation du taux moyen de la catalase chez les diabétiques de type 1 et les témoins.....	31
<b>Figure 15 :</b>	Variation des taux du NO en fonction de l'hémoglobine glyquée chez les DT1.....	32

**Figure 16** : Evaluation du taux du NO en fonction des taux du peptide C chez les DT1.....**33**

# *Sommaire*

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>01</b>
---------------------------	-----------

## **Chapitre I : Rappels bibliographiques**

<b>I-Diabète type 1 auto-immun.....</b>	<b>02</b>
I-1. Définition.....	02
I.2. Déroulement de la réaction auto-immune.....	03
.	
<b>I.2. Le stress oxydant.....</b>	<b>04</b>
I.2.1. Définition.....	04
I-2.2. Les radicaux libres .....	05
I.2.3. La source des radicaux libres au niveau cellulaire.....	06
I.2.4. Systèmes de défense antioxydante.....	07
I.2.5. Le Monoxyde d'azote « NO ».....	08
I.2.6. Marqueurs du stress oxydatif.....	09
I.2.6.1. Oxydation des protéines.....	10
I.2.6.2. Peroxydation lipidique.....	10
<b>I.3. Le diabète et le stress oxydant.....</b>	<b>10</b>
I.3.1. Monoxyde d'azote et diabète type 1 .....	10
I.3. 2. Mécanismes impliqués dans la genèse d'un stress oxydant dans le diabète .....	11
I.3. 2.1. Autoxydation du glucose.....	12
I.3. 2.2. Glycation des protéines.....	13
I.3. 2.3. Voie du polyol.....	14
I.3. 2.4. Activation des protéines kinases C (PKC).....	15
I.3. 2.5. Voie de l'hexosamine.....	16
I.3.3. Impact du stress oxydant sur les cellules $\beta$ et sur l'action de l'insuline.....	17

## Chapitre II : Matériel et Méthodes

<b>II.1. Matériel.....</b>	<b>18</b>
II.1.1. Matériel non biologique.....	18
II.1.2. Matériel biologique.....	18
<b>II.2. Méthodes.....</b>	<b>18</b>
II.3. Dosage du statut glycémique.....	<b>19</b>
II.3.1. Dosage du glucose.....	20
II. 3. 2. Dosage de l'hémoglobine glyquée (HbA1c).....	21
II.3.3. -Dosage du peptide C .....	22
II.4. Dosage des protéines totales.....	23
<b>II.2.2. Paramètres du stress</b>	
II.5.1. Dosage de la catalase .....	
II.5.2. Dosage du malondialdéhyde .....	21
II.5.3. Dosage du monoxyde d'azote.....	23
<b>II.6. Analyse statistique.....</b>	<b>25</b>

## Chapitre III- Résultats et discussion

27

III.1. Étude descriptive des caractéristiques cliniques et épidémiologiques de la population.....	27
	28
III.2. Exploration du statut oxydatif.....	
III.2.1. Etude de la variation des taux du NO .....	28
III.2.2. Etude de la relation de l'équilibre glycémique et le NO.....	29
III.2.2.1. Étude de la variation des taux du NO en fonction de l'hémoglobine glyquée.....	30
III.2.2.2. Etude de la variation des taux du NO en fonction des taux du peptide C.....	31
III.3. Autre paramètres du stress.....	31
III.3.1. Etude de la variation des taux de MDA.....	32
III.3.2. Etude de la variation des taux de la catalase .....	33
III-4. Etude de la corrélation entre l'équilibre glycémique et le NO.....	34
<b>V. Discussion.....</b>	<b>35</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>36</b>

**Références bibliographiques**

**Annexes**

# *INTRODUCTION*

Il est aujourd'hui bien admis par la communauté scientifique que l'hyperglycémie est l'une des causes majeures de stress oxydant, qui contribue elle-même de façon importante à l'évolution des complications diabétiques (**Malardé, 2012**).

Le diabète type 1 est un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une hyperglycémie chronique résultante de la destruction progressive des cellules bêta des îlots de Langerhans par un processus auto-immun (**Sharma et al., 2008**). Cet état est caractérisé par une hyperglycémie chronique qui en conséquence induit la surproduction des espèces réactives d'oxygène (ERO) et une baisse des systèmes de défenses antioxydantes (**Bonnefond-Rousselot et al., 2002**).

Le monoxyde d'azote ( NO ) est un gaz dissous et un agent dilatateur. Il joue un rôle essentiel dans la transmission de l'information et la réponse immunitaire. De plus, plusieurs études ont constaté une augmentation du NO dans le développement des maladies vasculaires liées au diabète. En effet, la littérature rapporte que le NO, possède des propriétés physiologiques à la fois bénéfiques et délétères dont une action anti-inflammatoire. (**Tamion et al., 2003**)

Etant donné l'implication du stress oxydant dans les complications de diabète, notre étude s'intéresse à la relation entre le stress oxydant et le diabète type 1 (diabète auto-immun) . dans le but de comprendre les mécanismes cellulaires, moléculaire et immunogénétiques engendrés par le stress oxydatif et l'hyperglycémie.

Notre choix du monoxyde d'azote l'un des marqueurs du stress oxydant nitré repose sur le fait qu'il soit impliqué dans les processus inflammatoires directement liés au processus auto-immun et à la cinétique de destruction des cellules bêta pancréatiques. En effet, l'objectif de cette étude a porté sur l'estimation du taux de monoxyde d'azote (NO) chez des sujets diabétiques de type 1 et d'étudier sa relation avec l'équilibre glycémique.

Pour cela, nous allons dans un premier temps par une revue bibliographique, étudier le diabète et sa relation avec le NO. Et dans un second temps, nous allons analyser nos résultats et les discuter.



**Partie**

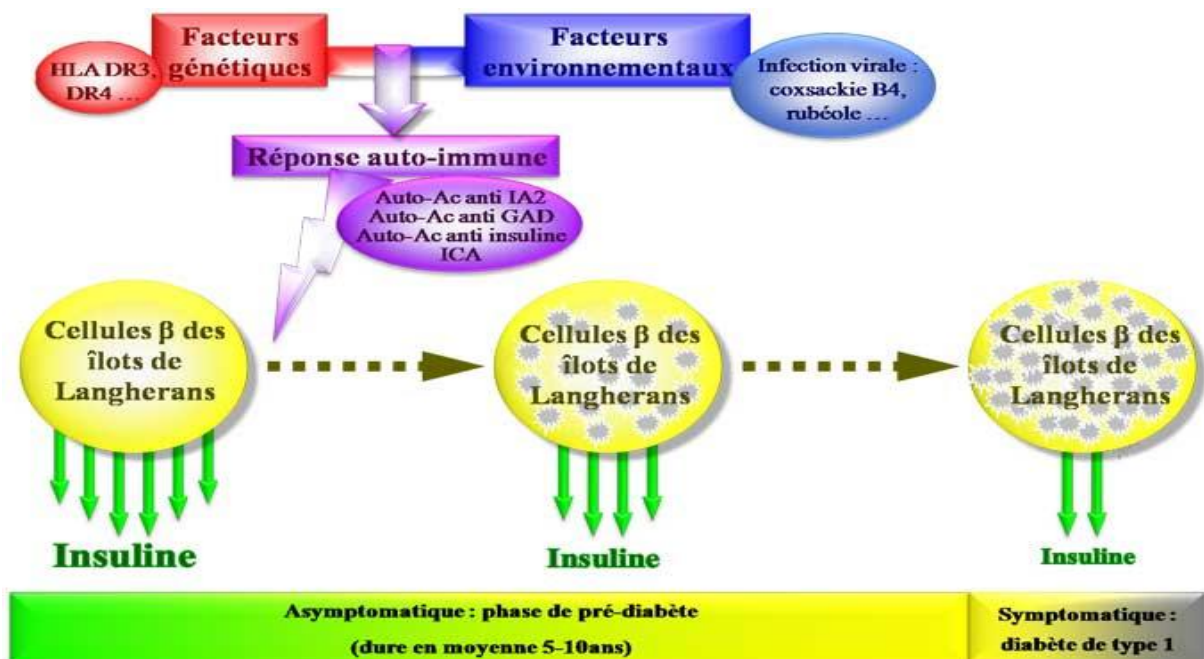
**bibliographique**

## I-Diabète type 1 auto-immun

### I-1. Définition

Le diabète de type 1 (précédemment insulino-dépendant) est une maladie auto-immune spécifique d'organe déclenchée par un ou plusieurs facteurs liés à l'environnement qui survient chez un sujet génétiquement prédisposé (RODIER, 2001). Le diabète de type 1 résulte d'une insuffisance totale en insuline liée à la destruction des cellules sécrétrices d'insuline du pancréas (cellules endocrines  $\beta$  des îlots de Langerhans) par un processus auto-immun à médiation cellulaire (TOURNANT *et al*, 1998; KAWASAKI *et al*, 2004). il est plus rare et se développe plus fréquemment chez les enfants et adolescents, mais elle se manifeste de plus en plus tard dans la vie (OMS, 2002).

La destruction des cellules  $\beta$  est authentifiée par la présence d'anticorps anti-îlots (cell antibody : ICA), anticorps anti-GAD (glutamate acide décarboxylase), des auto-anticorps insuline (IAA), et d'anticorps anti-IA2 (IA-2A) (PERLEMUTER *et al*, 2000 ; KNIP SILJANDER, 2008). (Figure 1)



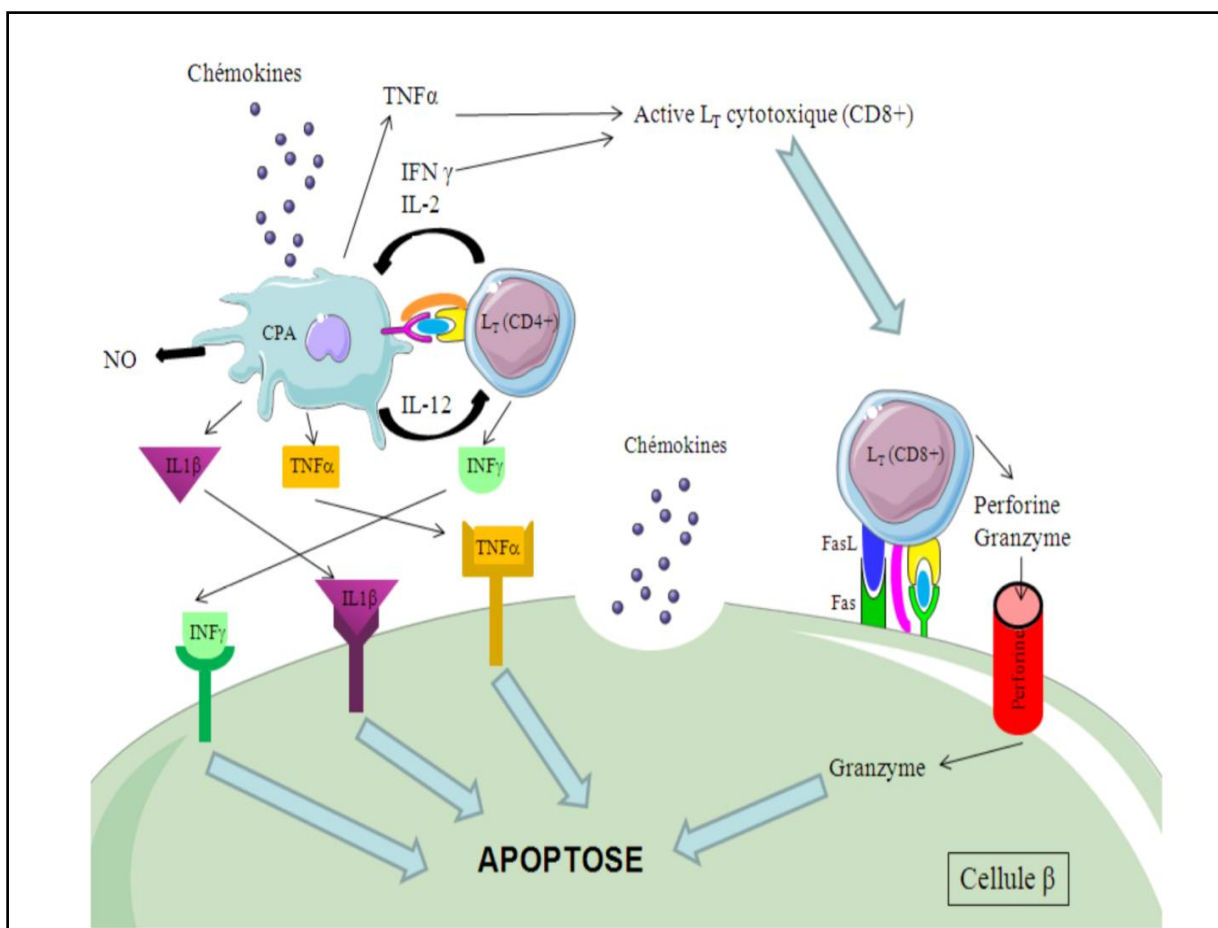
**Figure 1:** Interaction entre génétique, facteur environnementaux et système immunitaire lors de destruction auto-immune des cellules  $\beta$

### I.2. physiopathologie du diabète type 1

Le processus de recrutement des lymphocytes dans l'îlot pancréatique n'est pas clairement compris, mais il implique la production de cytokines à la fois par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA), les cellules de l'endothélium vasculaire et les cellules  $\beta$ .

La figure 2 présente un mécanisme simplifié de la destruction des cellules  $\beta$  lors d'un diabète de type 1.

Au niveau de la liaison des lymphocytes, les récepteurs jaunes correspondent aux TCR, l'ovale bleu à l'antigène, le récepteur rose (sur la CPA) à la molécule de CMH, et le vert (sur la cellule  $\beta$ ) à la molécule du CMH de classe I. enfin, la connaissance spécifique entre CPA et  $L_T$ <sub>h1per</sub> est assurée par le CMH de classe II et la molécule CD4+(orange) tandis que celle entre la cellule  $\beta$  et le  $L_t$



**Figure 2 :** mécanisme de destruction auto-immun de la cellule  $\beta$  dans le diabète type 1 (modifié d'après PIROT *et al* , 2008)

Les CPA présentent l'antigène de la cellule  $\beta$  au lymphocyte T (LT) helper (CD4+) naïf via la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et au récepteur TCR du

lymphocyte T.

Cela induit la production par la CPA d'interleukine 12 (IL-12) permettant la différenciation du LT en un LT halper . Celui-ci en retour sécrète de l'interleukine 2 (IL-2) et de l'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), qui vont stimuler la production d'interleukine 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), de Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) et d'oxyde nitrique (NO), un radical libre.

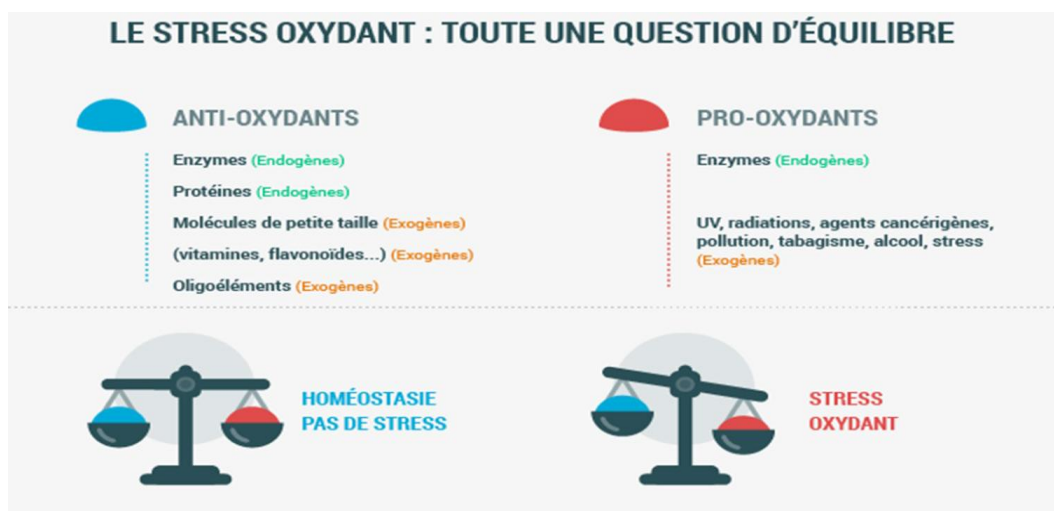
La sécrétion de ces cytokines active les LT cytotoxique (CD8+) qui arrivent dans l'îlot et qui entraînent la sécrétion, par les cellules  $\beta$ , de chémokines. Le LT cytotoxique se lie à la cellule  $\beta$  par son TCR et via la molécule du CMH de classe I à la surface de la cellule pancréatique. De plus, il exprime à sa surface la protéine FasL qui va se lier au récepteur Fas (de la famille des récepteurs au TNF) de la cellule  $\beta$ . L'activation de la voie Fas induit l'activation des caspases, notamment celle de la caspase 8, et la mort cellulaire par apoptose. En parallèle, ces LT déversent le contenu de leurs granules, qui contiennent le système granzyme/perforine (Pearl-Yafe et al., 2007). La perforine génère des pores sur la cellule  $\beta$ , permettant la pénétration d'une protéase à sérine, appelée granzyme qui va activer les caspases et induire la mort cellulaire par apoptose. Enfin, la fixation de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$ , l'INF $\gamma$  et l'IL-1 $\beta$ , sécrétées par les cellules immunitaires (CPA et LT) sur leurs récepteurs à la surface de la cellule  $\beta$ , induit l'apoptose par différentes voies de signalisation dont la voie NF $\kappa$ B .

## **I.2. Le stress oxydant**

Si le diabète est à l'origine des phénomènes de glycation et de glycoxydation, il engendre également un stress oxydant à travers de la production de ROS. Nous allons donc définir le stress oxydant et les facteurs qui y contribuent.

### **I.2-1 . Définition**

Le stress oxydant peut être défini comme la résultante d'un déséquilibre en faveur des espèces pro-oxydantes et au détriment des espèces antioxydantes (**wassmann et al,2004**) Ce déséquilibre provient, soit d'une production exagérée d'agents oxydants (radicaux libres et ROS), soit d'une altération des mécanismes de défense( figure 3). Les premiers travaux dans le domaine ont montré le rôle important joué par les intermédiaires oxygénés, appelés également radicaux libres, dans les phénomènes physiologiques et leurs effets délétères dans les processus cellulaires (**Mraitim et al, 2003**)



**Figure 3 :** Le stress oxydant (Mraitim et al, 2003).

### **I.2-2. Les radicaux libres :**

Les entités oxydantes sont souvent des radicaux libres, c'est-à-dire des espèces chimiques qui possèdent un électron célibataire ou non apparié sur la dernière couche électronique. Cet électron célibataire n'est pas compensé ce qui provoque des dérèglements dans leur champs magnétique, rendant ainsi ces espèces très instables. Elles vont alors tenter de récupérer des électrons sur d'autres molécules comme les substrats biologiques, en les oxydant. Il existe majoritairement trois grandes familles d'espèces réactives :

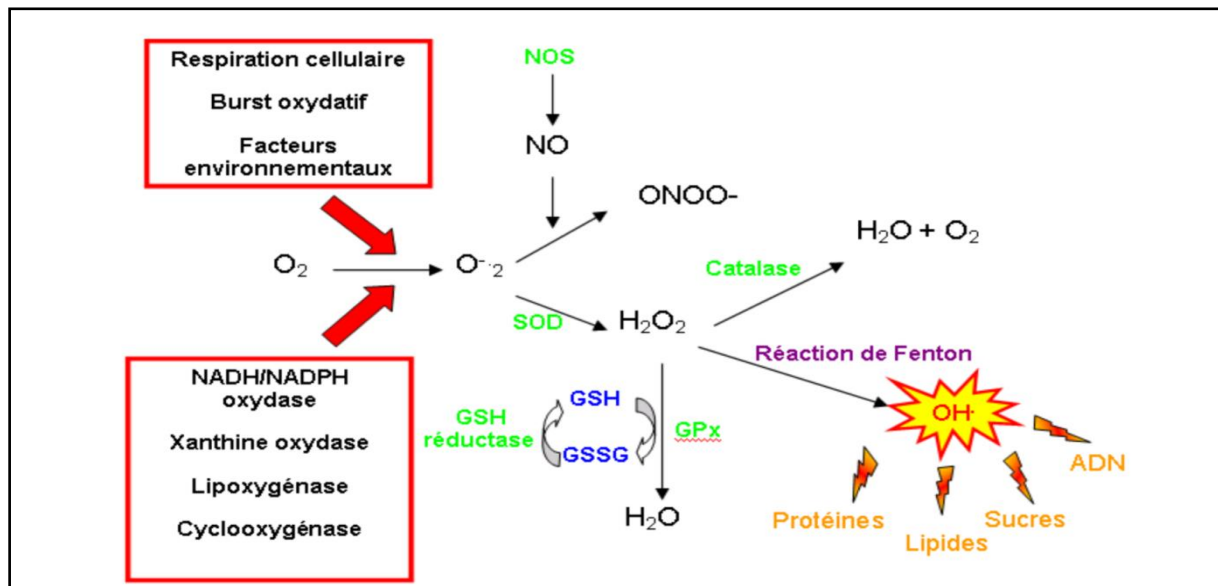
- **Les espèces réactives de l'oxygène ou ROS** (Reactive Oxygen Species), issues de la réduction incomplète de l'oxygène, dont le précurseur est l'anion superoxyde  $O_2^-$ . Il est à l'origine de la formation d'autres ROS tel que le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  et le radical hydroxyl  $OH\cdot$ . L'oxygène singulet  $O_2$  est également une entité oxydante.
- **Les espèces réactives de l'azote ou RNS** (Reactive Nitrogen Species) qui donnent entre autres des peroxynitrites ( $ONOO^-$ ), du monoxyde d'azote  $NO$ . et le radical peroxyde ( $ROO\cdot$ ).
- **Les espèces réactives du chlore ou RCS** (Reactive Chlorine Species) comme l'acide hypochlorique,  $HOCl$  (Cai and Harrison, 2000) .

### **I.2.3. La source des des radicaux libres au niveau cellulaire**

Le précurseur des ROS, l'anion superoxyde  $O_2^-$ , peut provenir de plusieurs sources cellulaires. Il est formé après réduction de l'oxygène  $O_2$  par un électron et en présence d'un cofacteur NADPH. Cet anion est très instable et peut traverser la membrane plasmique (Mao and Poznansky, 1992). Les différentes enzymes permettant cette réaction sont : la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, les cyclo-oxygénases ou COX, les lipo-oxygénases, les Nitric Oxyde Synthases (NOS), les enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochrome P450) et celles de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie (Cai and Harrison, 2000)

Les NOS génèrent normalement du monoxyde d'azote NO, mais lorsque la concentration de son cofacteur, la tétrahydrobioptéridine (BH4) diminue, elle produit  $O_2^-$ . De plus, le NO formé par les NOS peut réagir avec l'anion superoxyde pour former des peroxynitrites, un composé oxydant secondaire.

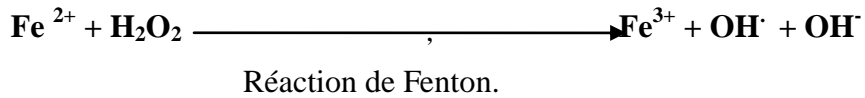
Les superoxydes dismutase (SOD) vont ensuite dismuter l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  qui est relativement stable et peut diffuser au travers des membranes. Cette molécule donne ensuite via la réaction de Fenton (non enzymatique) une entité très réactive, le radical hydroxyle, OH. Le peroxyde d'hydrogène peut également entrer dans une voie alternative et être converti en eau par les enzymes catalase et glutathion peroxydase (figure 4).



**Figure 4** : Schéma récapitulatif des sources des ROS, des enzymes impliquées dans la défense antioxydantes et des cibles biologiques

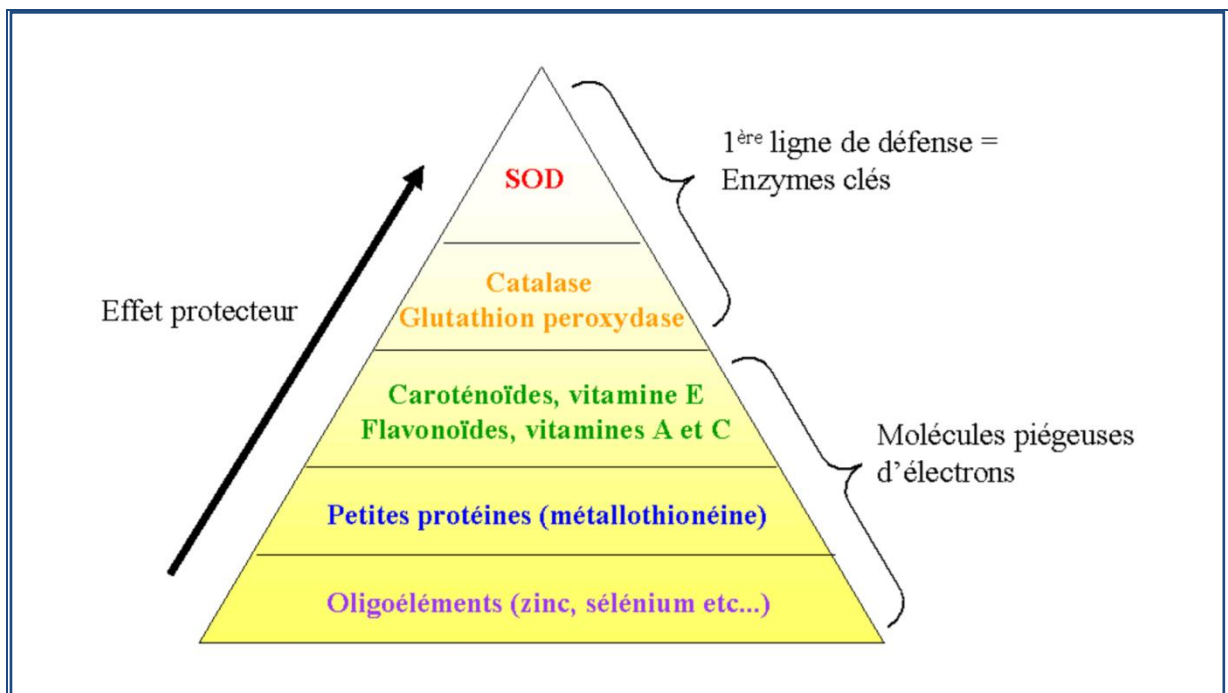
La réaction de Fenton implique des métaux de transition. L'oxydation de l'ion ferreux ( $Fe^{2+}$ ) en ion ferrique ( $Fe^{3+}$ ) en présence de peroxyde d'oxygène  $H_2O_2$  génère le radical hydroxyle, le

plus puissant oxydant de la famille des ROS, car il ne peut être détruit enzymatiquement. A noter que la réaction de Fenton peut se faire directement à partir de l'anion superoxyde pour générer le même radical réaction suivante



#### I.2-4 . Systèmes de défense antioxydante

Les cellules possèdent des mécanismes de défense endogènes enzymatiques et non enzymatiques qui, de manière générale, suffisent à renverser le stress oxydant, résultant du métabolisme aérobie, appelés antioxydants. Les antioxydants ont comme principal rôle de neutraliser et de dégrader les radicaux libres toxiques des tissus (Wassmann *et al.*, 2004).



**Figure 5** : Pyramide des systèmes de défenses antioxydants

#### - Catalase

La catalase est un antioxydant enzymatique présent dans les peroxysomes et les hématies (FAVIER, 2003 ; BAUDIN, 2006).

Le gène humain de la catalase est localisé dans la position 11 du chromosome 13 qui comprend 13 exons et 12 introns (GÓTH et NAGY, 2013).

#### I.2.5. Le Monoxyde d'azote « NO »

En 1987, les docteurs Murad, Ignarro et Furchgott firent une découverte majeure en révélant un nouveau système biologique, ce qui leur valut un prix Nobel. Ils découvrirent un gaz libéré par les cellules endothéliales qui se manifeste de multiples façons dans tout l'organisme: le monoxyde d'azote (NO).

Dans le système vasculaire, le NO maintient un tonus vasodilatateur nécessaire pour la régulation de la circulation sanguine et le contrôle de la pression artérielle ; il inhibe l'agrégation et l'adhésion des plaquettes, empêche l'adhésion des leucocytes et module la prolifération des cellules musculaires lisses.

Dans le système nerveux central, il agit comme un neuromédiateur..Il est associé à diverses fonctions physiologiques.

Le NO est, en outre, produit en grandes quantités dans les manifestations de défense de l'organisme.il contribue à protéger contre les cellules tumorales, les bactéries et les virus.

Ainsi libéré, le NO peut cependant aussi favoriser le développement de pathologies comme le choc septique et certaines formes d'inflammation aiguë ou chronique (**Petersen, K.F., et al, 2003**).

Le NO est donc un médiateur biologique ubiquitaire dont les fonctions sont tantôt physiologiques, tantôt pathophysiologiques.

En raison de son étendue d'action, de ses effets bénéfiques autant que de ses effets néfastes et de sa capacité à interagir avec une multitude de cibles, le NO mérite grandement son titre de molécule de l'année attribué en 1992 par la revue Science. Et pourtant, le NO est l'une des plus vieilles molécules connues, le NO est rapidement oxydé en nitrite (NO<sub>2</sub>) et en nitrate (NO<sub>3</sub>) ; il activera aussi la production de cyclic guanine monophosphate cGMP par l'activation de la guanylyl cyclase ; il pourra devenir un oxydant puissant par son association avec le superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) pour former le peroxyde (ONOO<sup>-</sup>), modifiant ainsi des protéines par leur nitration. Le NO peut aussi interagir avec les domaines

S-H de protéines leur causant une modification nommée s-nitrosation. En milieu biologique, sa grande capacité à diffuser l'amènera souvent à sortir de la cellule qui l'a produite pour atteindre ses cibles. Il s'agit donc d'une molécule simple aux effets complexes (**Dresner, A., et al., 1999**).

Le monoxyde d'azote (NO) extracellulaire ou produit par les NOS, a la capacité de se fixer et d'activer la guanylate cyclase, produisant un second messenger important à l'origine de nombreuses réponses physiologiques, le GMPc (Gerzer et al., 1981). Dans les cellules musculaires lisses, l'activation de la protéine kinase GMPc dépendante permet la phosphorylation et l'activation de canaux potassiques calcium dépendants responsables de la relaxation des vaisseaux (Archer et al., 1994). Le NO joue également un rôle dans l'inhibition de



l'adhésion plaquettaire (Radomski et al., 1987).

### **I.2-6. Cible du stress oxydatif**

Le stress oxydatif, dû aux radicaux libres, entraîne des dégâts tissulaires essentiellement par l'oxydation des protéines, de l'ADN ou des lipides. La mesure de leurs produits oxydatifs est difficile et la méthodologie imparfaite, mais ceux-ci apportent des indicateurs du stress oxydatif, qui peuvent être, de façon mécanistique, reliés au développement de la maladie (**Laight et al., 2000**).

#### **I.2-6.1.Oxydation des protéines**

La fonction et l'activité des protéines peuvent être affectées par altération de leur structure complexe, en particulier par oxydation (**Davies et al., 1999**). En effet, les protéines peuvent se fragmenter ou se dénaturer avec altération de leurs structures primaires et secondaires. En général, les protéines oxydées sont inactives et sont rendues vulnérables à l'action des protéases. Lors d'un stress oxydatif important, les cellules sont incapables d'éliminer par protéolyse les protéines oxydées accumulées, ce qui conduit aux dégâts protéiques observés dans le diabète. Les deux principaux marqueurs biologiques de l'oxydation des protéines sont la formation de carbonyles protéinés et de groupes nitrotyrosines. Les carbonyles protéinés sont formés lorsque les espèces réactives de l'oxygène attaquent les résidus d'acides aminés. L'histidine, la proline, l'arginine et la lysine sont particulièrement prédisposées à cette attaque. La formation de nitrotyrosines est due au peroxy-nitrite hautement toxique, produit par la réaction du monoxyde d'azote et du superoxyde. Les carbonyles protéinés et les nitrotyrosines sont tous deux très stables et ne sont généralement pas retrouvés chez les patients, faisant d'eux des marqueurs biologiques utiles et fiables (**Levine, 2002**).

#### **I.2-6.2.Peroxydation lipidique**

Les lipides, principalement les acides gras polyinsaturés, peuvent subir une attaque radicalaire, par le radical hydroxyle (OH $\cdot$ ), capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Une réaction en chaîne se produit conduisant à la transformation du radical peroxyde, au contact d'un autre acide gras, en un nouveau radical diène conjugué (**Esterbauer et al., 1992**).

### **I.3.Le diabète e stress oxydant**

#### **I.3.1. Monoxyde d azote et diabète type 1**

Le NO perd ses fonctions vasodilatatrices pour s'intégrer dans les cycles auto-entretenus d'oxydation des systèmes vivants. En présence d'agents antioxydants, la fonction vasodilatatrice de l'endothélium est potentialisée. Les cellules endothéliales produisent les deux espèces : le NO et l'anion superoxyde. Les cellules musculaires lisses produisent également l'anion superoxyde.

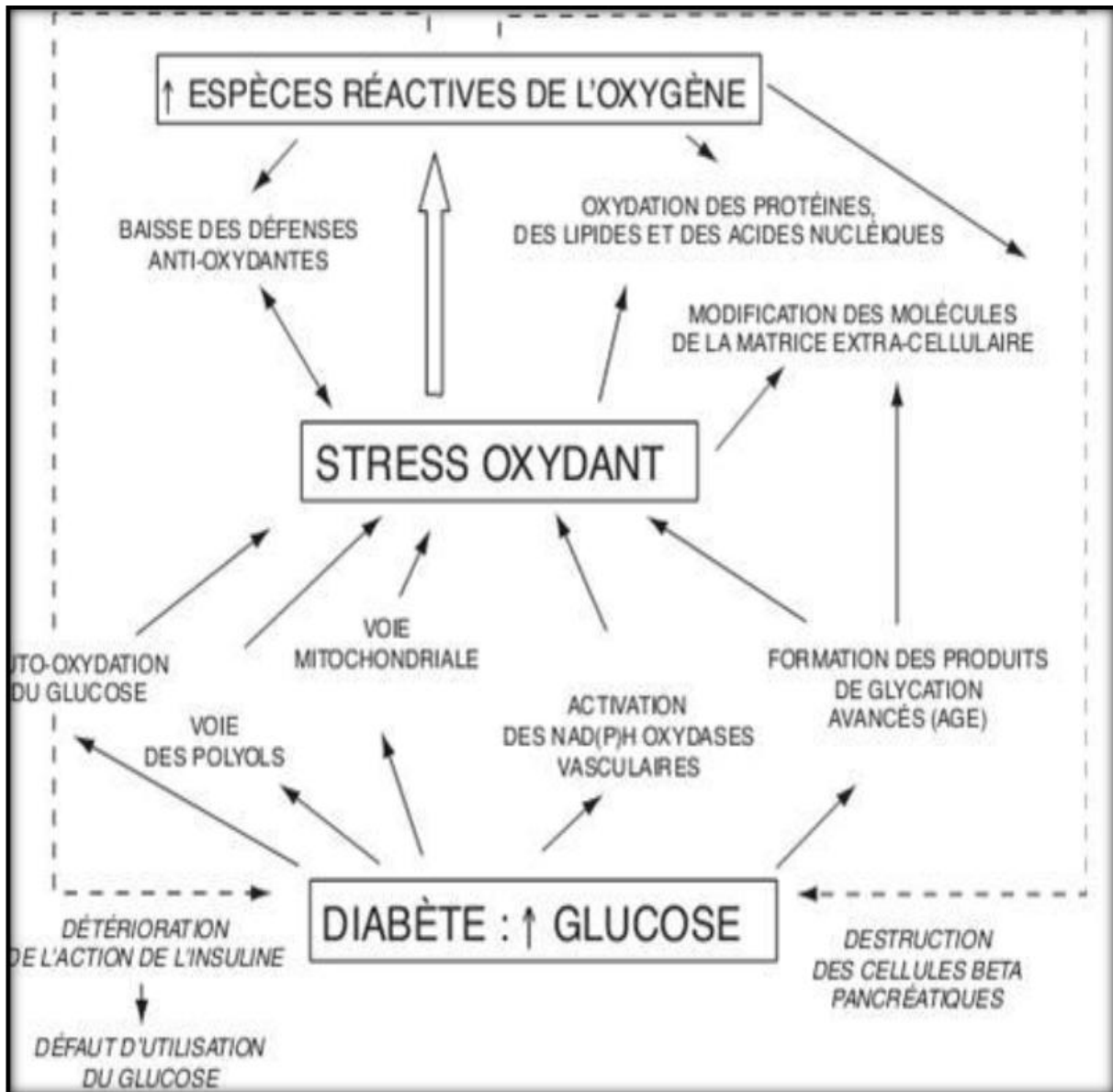
Lorsque la SOD est inhibée par le diéthylthiocarbamate ou par un déficit en cuivre (le cuivre est un co-facteur nécessaire à l'activité de la SOD) NO est beaucoup moins actif. Une autre interaction possible entre NO et la production de radicaux libres, passe par le fait qu'en l'absence d'arginine, son substrat, la Nos pourrait générer de l'anion superoxyde. Le phénomène de glycation des protéines est un phénomène général, passif non enzymatique (de ce fait qu'il s'oppose au terme de glycosylation lié au temps (âge) et à la concentration en glucose (diabète).

Il a été montré que les produits de glycation, en particulier les produits intermédiaires, étaient capables d'inactiver NO et de ce fait d'en limiter la diffusion dans le cas de diabète type 1 auto-immun où les produits de glycation s'accumulent sur les constituants de la matrice extracellulaire.

L'accumulation des produits de glycation a d'autres conséquences comme celle d'augmenter la perméabilité endothéliale aux protéines plasmatiques. Ces phénomènes inactivation de NO, augmentation de la perméabilité endothéliale, pontage et rigidification des protéines fibrillaires de la matrice extracellulaire font probablement le lien entre l'accumulation de produits de glycation et le développement du diabète type 1.

#### **I.3.2. Mécanismes impliqués dans la genèse d'un stress oxydant dans le diabète**

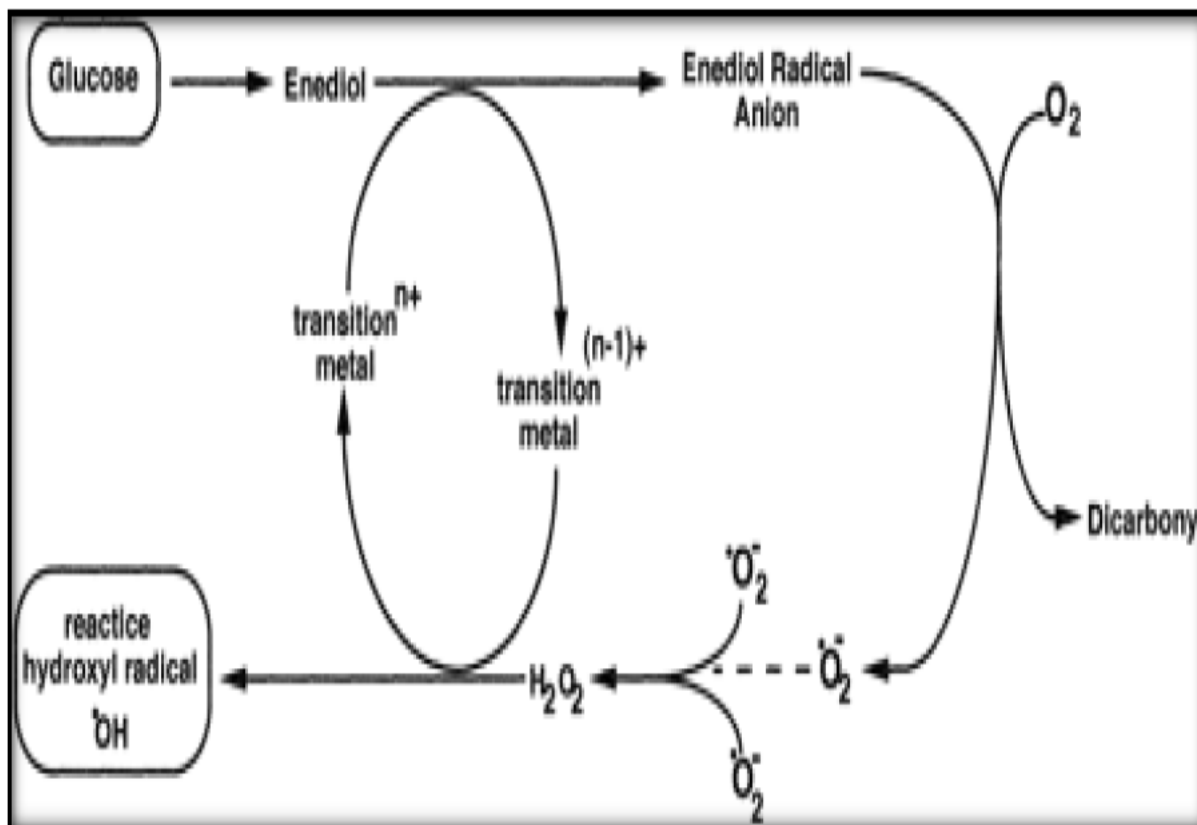
Dans des conditions d'hyperglycémie chronique, plusieurs mécanismes peuvent être responsables de l'augmentation de stress oxydant (figure 6 )



**Figure 6:** Relation entre hyperglycémie et stress oxydant (Bonnefont-Rousselot et al., 2004).

### I.3.2.1 Autoxydation du glucose

Le glucose dans sa forme linéaire (projection de Fischer) possède une fonction aldéhyde et une fonction hydroxyle adjacente en équilibre avec la forme ène-diol. C'est sous cette dernière forme que le glucose est capable de s'oxyder de façon isolée en présence de métaux de transition, aboutissant à la formation d'un radical anionique ène-diol. Ce radical peut ensuite réagir avec l'oxygène pour libérer des anions superoxydes. Au cours de cette réaction, il y a formation d' $\alpha$ -cétaldéhyde, qui peut réagir avec des métaux de transition via la réaction Fenton pour former des radicaux hydroxyles très réactifs (figure7) (Wolff, 1991 ; Hunt and Wolff, 1991).



**Figure 7** : Réactions à l'origine de la production d'ERO par autoxydation du glucose (Ahmed, 2005).

Les produits de l'autoxydation du glucose sont à leur tour, précurseurs d'un autre mécanisme impliqué dans l'élévation du SO en cas d'hyperglycémie : la glycation des protéines et la formation des Produits Terminaux de Glycation (PTG), plus communément appelés AGE (Advanced Glycated End-Product) (Malardé, 2012).

### **I.3.2.2. Glycation des protéines**

Une des conséquences essentielles de l'hyperglycémie est la glycosylation non enzymatique ou glycation des protéines. La glycation des protéines est une réaction covalente qui attache sans l'intervention d'enzyme des résidus glucose aux NH<sub>2</sub> libres des protéines (Racciah, 2004).

L'étape initiale de cette réaction se caractérise par la formation non enzymatique d'une liaison covalente entre le groupement carbonyle d'un sucre réducteur et le groupement amine libre d'un acide aminé. Elle conduit à la formation d'une base de Schiff, qui peut subir des réarrangements intramoléculaires (réarrangements d'Amadori), pour former des composés dicarbonylés. La déshydratation et/ou la condensation de ces composés donnent alors naissance aux produits de fin de glycation AGE (advanced glycation end products) (figure 8) (Guillet,

2010). Ces AGE forment un groupe hétérogène de molécules qui modifient non seulement la fonction de la protéine glyquée mais forment aussi des agents qui se lient à d'autres protéines, tel le collagène et autres protéines de la matrice extracellulaire dont les fonctions se trouvent ainsi altérées avec des conséquences délétères sur les tissus vasculaires, cardiaques et rénaux (Dali-Youcef, 2010). Les AGE sont capables aussi de produire des radicaux libres oxygénés par interaction avec des récepteurs spécifiques (RAGE) et induire un stress oxydant (Bonfont-Rousselot et al., 2004).

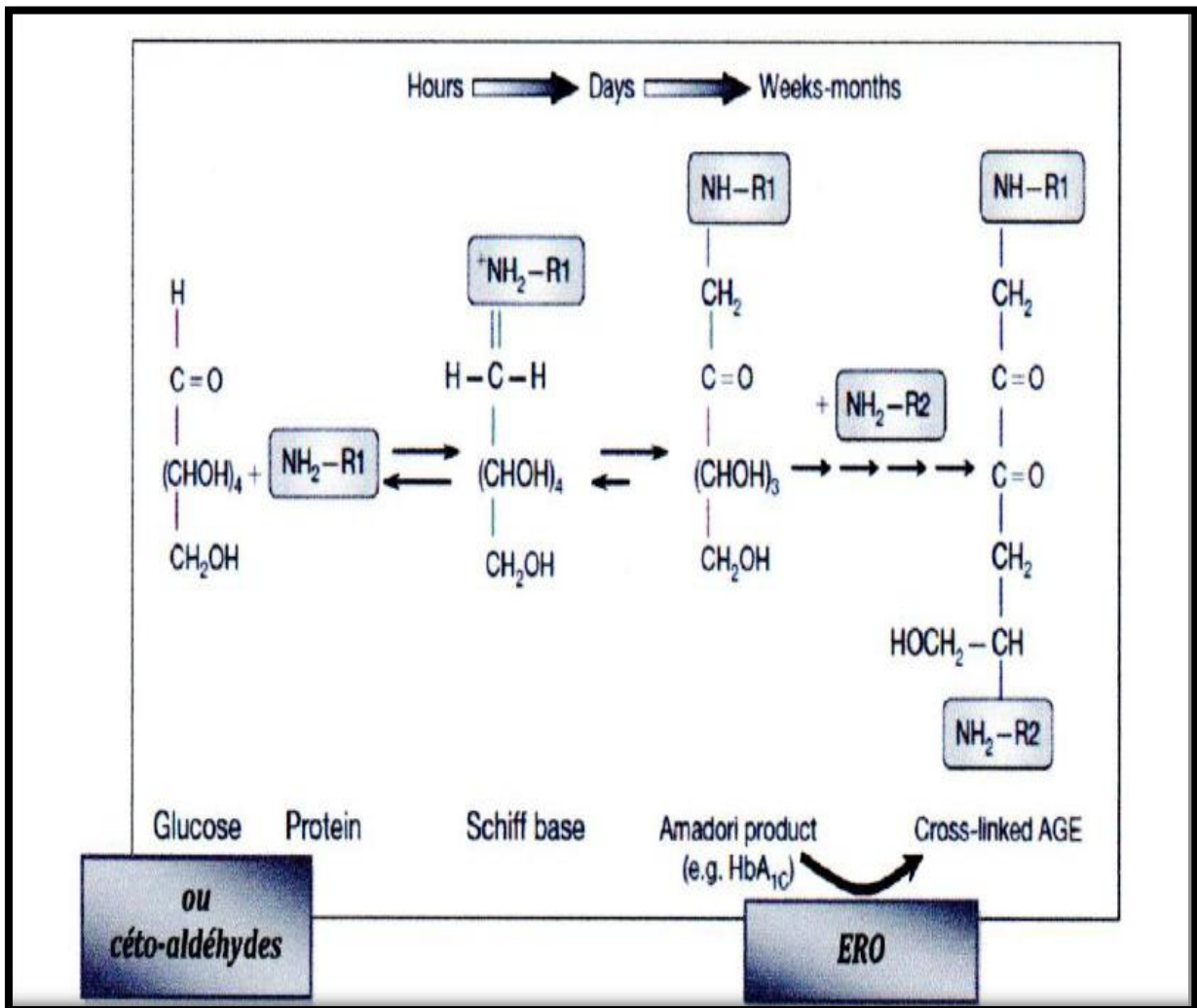
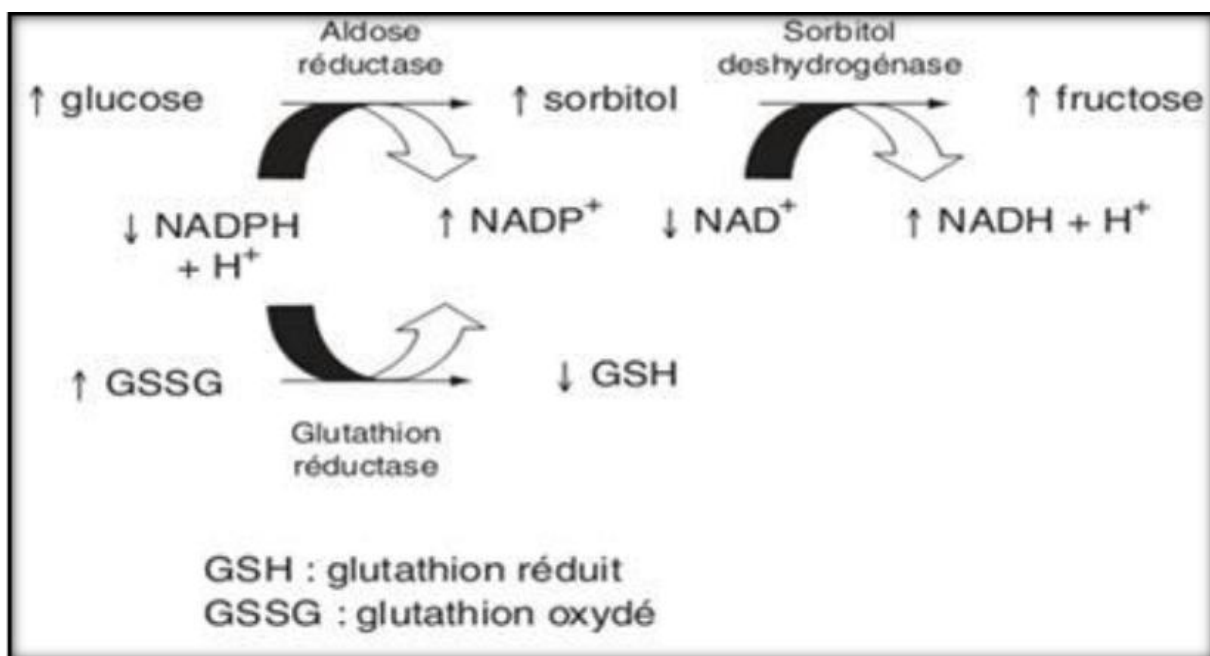


Figure 8: Formation des produits avancés de glycation (Aronson, 2008).

### I.3.2.3. Voie du polyol

Dans des conditions physiologiques normales (normoglycémique), le glucose est

métabolisé en glucose-6-phosphate par l'héxokinase puis dirigé soit dans la voie de la glycolyse, soit dans la voie des pentose-phosphates. Le métabolisme du glucose par la voie des polyols représente un faible pourcentage (3%) de l'utilisation totale du glucose en conditions normoglycémique (**Bouldjadj, 2009**). Dans le diabète, lorsque le taux du glucose augmente, l'héxokinase est alors saturée et le glucose en excès est en partie métabolisé par la voie des polyols dans les tissus insulino-indépendants (à peu près 30% du glucose), comme les reins, le tissu neuronal ou les microvaisseaux rétiniens (Gonzalez et al., 1984). Sous l'effet de l'aldose réductase, le glucose est réduit en sorbitol par le NADPH (figure 9). Le sorbitol est ensuite oxydé en fructose en présence de NAD<sup>+</sup> par la sorbitol-déshydrogénase (**Raccach, 2004**). Cette voie va conduire à une déplétion intracellulaire de NADPH puisque le NADPH est nécessaire à l'activité de l'aldose réductase. Le déficit intracellulaire de NADPH a pour conséquence une faible régénération du glutathion réduit à partir du glutathion oxydé (**Bonnefont-Rousselot et al., 2004**).



**Figure 9** : Déplétion du glutathion par la voie des polyols (**Bonnefont-Rousselot et al., 2004**).

#### **I.3.2.4. Activation des protéines kinases C (PKC)**

Une hyperactivité de la protéine kinase C au cours du diabète dans des nombreux tissus est une des hypothèses avancées (**King and Brownlee, 1996**). L'hyperglycémie induit une synthèse

accrue de diacylglycérol (DAG) à partir des intermédiaires de la glycolyse, qui est un cofacteur activateur des différentes isoformes de la PKC (figure 10 ) (Xia et al., 1994). L'augmentation de l'activité de l'enzyme induit une augmentation de l'expression des gènes néfastes pour la cellule et au contraire, diminue celle des gènes bénéfiques. En effet, elle augmente l'expression des facteurs vasoconstricteurs (endothéline-1) en diminuant ceux vasodilatateurs (NO). Elle induit également l'expression de gènes pro-inflammatoires et augmente la production de ROS par la NADPH oxydase (Brownlee, 2005).

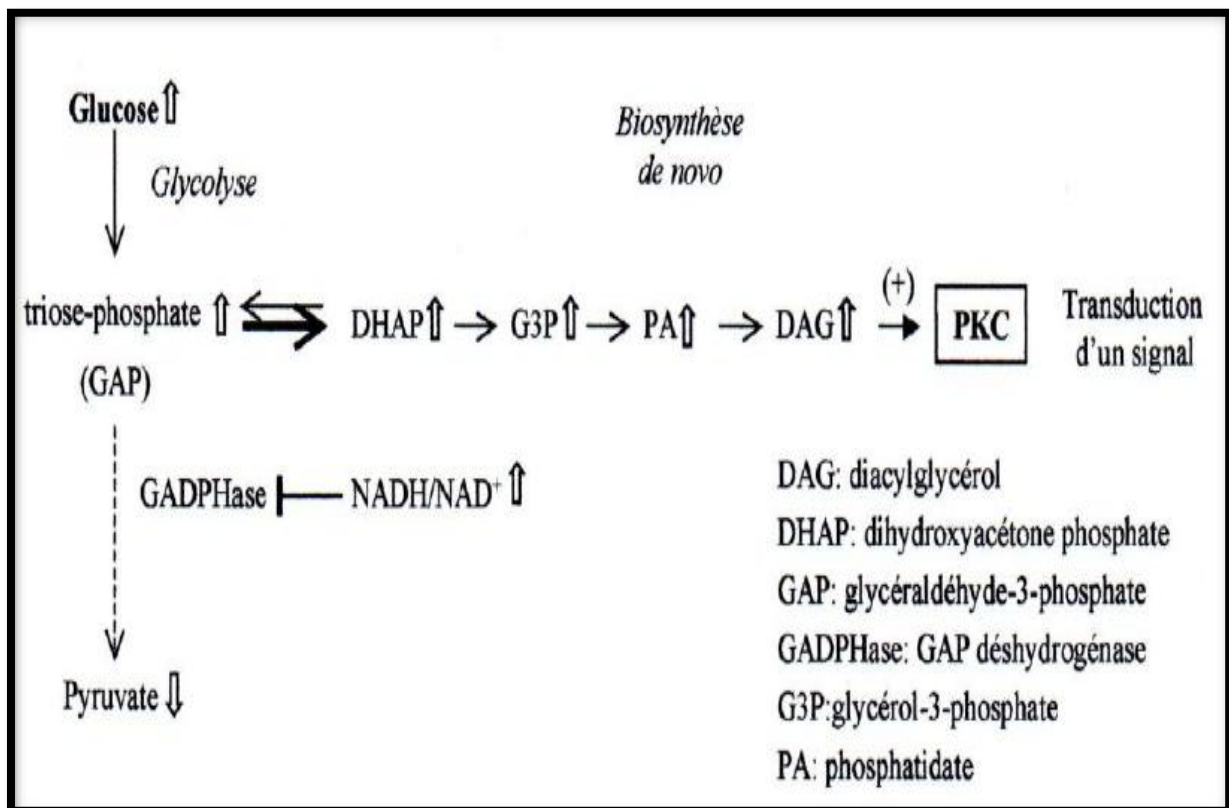


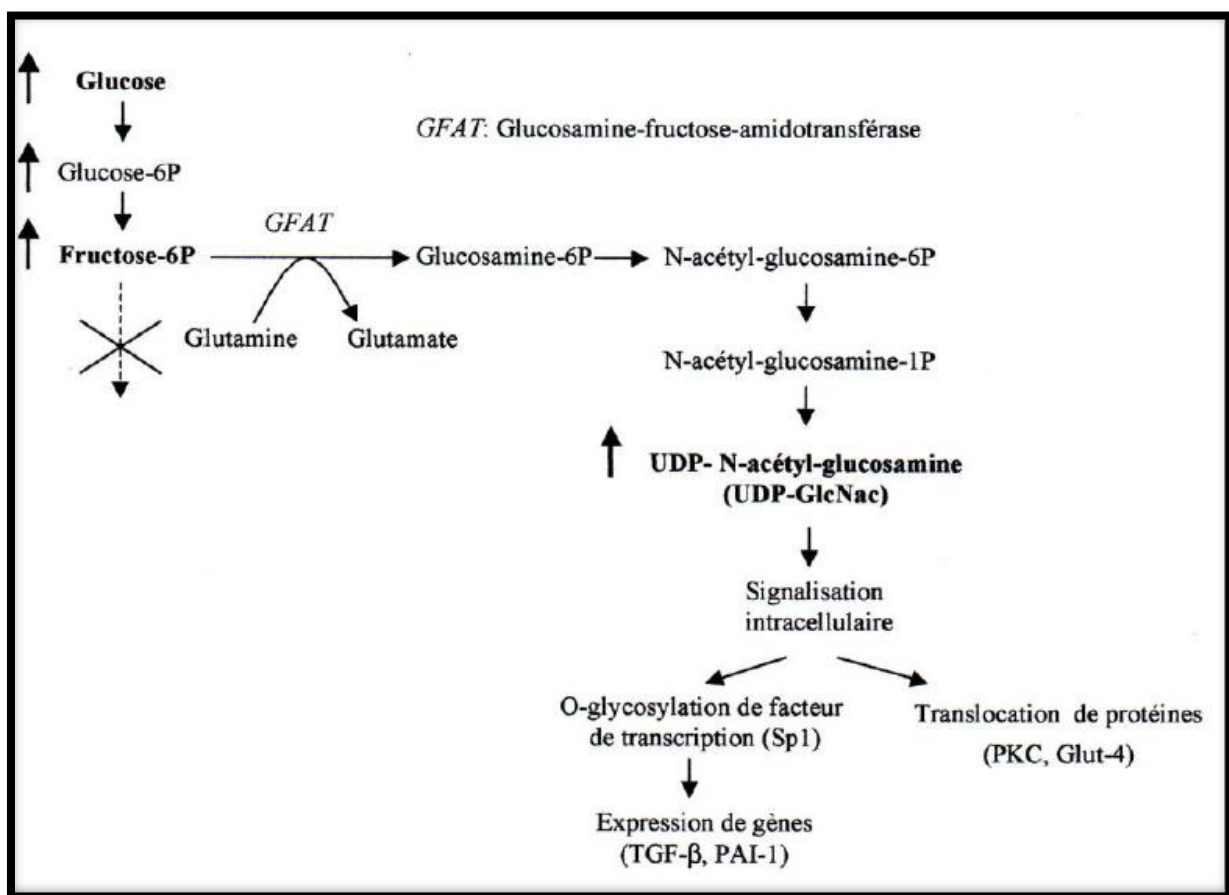
Figure 10 : Activation des PKC (Denis, 2002).

### I.3.2.5. Voie de l'hexosamine

Une autre hypothèse biochimique est formulée pour rendre compte de la glucotoxicité vasculaire dans le développement des complications liées au diabète. L'hyperglycémie génère une augmentation du flux du glucose dans la voie de l'hexosamine en UDP-Nacétylglucosamine.

L'augmentation de la concentration intracellulaire du glucose conduit à la formation accrue de fructose 6-phosphate, qui est métabolisé en glucosamine 6-phosphate en présence de glutamine par le GFAT (glutamine-fructose-6-phosphate amidotransférase) puis transformé en UDP-N-acétylglycosamine (UDP-GlcNac) (figure 11) (Kolm-Litty et al.,1998).

Dans ces conditions, le fructose 6-phosphate est détourné de la glycolyse et utilisé comme substrat de réactions diverses requérant l'intermédiaire UDP-N acétylglycosamine (Schleicher and Weigert, 2000). L'accumulation de l'intermédiaire métabolique, le fructose 6-phosphate résulterait d'une altération de l'activité GAPDHase par une production mitochondriale de ROS (Du, 2000).



**Figure 11 :** Voie des hexosamines et conséquences (Denis, 2002).

### I.3.3. Impact du stress oxydant sur les cellules $\beta$ et sur l'action de l'insuline

Le rôle pathogène des radicaux libres sur les cellules  $\beta$  a souvent été évoqué car ces cellules ont des défenses limitées face au stress oxydant (Rigalleau et al., 2007). En effet les espèces réactives de l'oxygène perturbe la sécrétion de l'insuline stimulée par le glucose par la diminution du rapport ATP/ADP intracytosolique, par l'hyperpolarisation anormale de la



membrane mitochondriale et une surexpression du complexe I de la chaîne respiratoire ce qui conduit à l'apoptose des cellules  $\beta$  et pourrait expliquer la réduction de la masse des cellules  $\beta$  observée dans le DT2 (**Guillausseau et al., 2008**). Et selon certains auteurs (**Bonnefont-Rousselot et al,2004**) ces radicaux libres pourraient être aussi à l'origine du diabète de type1. L'effet de la vitamine C et le sélénium sur le développement de diabète chez les rats alimentés par un régime alimentaire carencé en zinc.

# Materiel et methodes

Pour explorer la relation entre le monoxyde d'azote (NO) et l'équilibre glycémique chez le diabétique de type 1. Nous nous sommes intéressés au dosage des paramètres biochimiques du statut glycémique (glycémie, hémoglobine glyquée, peptide c). Aussi, nous avons évalué d'autres paramètres du stress (MDA, catalase).

Pour ce faire, nous avons sollicité cinq lieux de stages : L'établissement public de santé de proximité (E.P.S.P) d'Ouled Yaïch ainsi que de bouzereah, l'établissement public hospitalier (E.P.H) de BLIDA « TRICHINE IBRAHIME (FABORE) » et celui d'EL-AAFROUN pour le recrutement et les dosages biochimiques, Le laboratoire de PFE pour le dosage du NO, du MDA et la catalase durant une période une durée de 04 mois (du mois de Mars au mois de Juin 2016).

## **II.1. Matériel**

### **II.1.1. Matériel non biologique**

- ⊙ L'appareillage et les réactifs utilisés sont cités en **Annexe**
- ⊙ La composition des réactifs est en **Annexe**

### **II.1.2. Matériel biologique**

Le matériel biologique est constitué par le sang prélevé des patients après 12heurs de jeûne. Ce sang est recueilli dans des tubes Héparinés, tubes EDTA et tubes sec puis centrifugé à 4000 tours/min pendant 15 minutes. Le sang total prélevé sur EDTA est utilisé pour le dosage d'hémoglobine glyquée ; le plasma et le sérum sont utilisés pour le dosage des paramètres biochimique et du stress oxydatif.

## **II.2. Méthode**

### **➤ Critère d'inclusion**

Dans cette étude prospective, nous avons inclus une population constituée :

- ⊙ Un groupe de sujets témoins.
- ⊙ Et un groupe de diabétiques (DT1) d'apparence saines.

Les critères d'inclusion pour la population témoins et diabétique sont :

- ⊙ Etre volontaire.
- ⊙ Homme ou femme.
- ⊙ Agé de 18 à 55 ans.

### ➤ **Recrutement**

Les sujets diabétiques recrutés concernent des patients hospitalisés ainsi que des patients suivis en consultation au niveau des différents établissements de santé cités avant. Ainsi, nous avons inclus 32 sujets non diabétiques, d'apparence saine (aucune pathologie connue) et 32 sujets diabétiques (DT1).

Lors du recrutement un questionnaire (fiche de renseignement) a été utilisé pour répertorier les renseignements concernant le statut clinique des patients diabétiques (**annexe II**)

### ➤ **Prélèvements**

Tous les sujets ont été prélevés dans les mêmes conditions, après 12 heures de jeûne entre 8H30 et 10 heures du matin. Les prélèvements sanguins sont ensuite acheminés au laboratoire où ils sont analysés soit ; directement comme le dosage de l'hémoglobine glyquée A1c(HbA1c), ou après une centrifugation à 4000 tours/minute pendant 15 minutes, afin de récupérer :

- ⊗ Le plasma sur tube d'héparinate de lithium pour le dosage de quelques paramètres biochimiques à savoir : Glycémie, Protéine totaux.
- ⊗ le plasma sur tube EDTA pour le dosage du MDA, NO.
- ⊗ le sérum pour le dosage de la Catalase.

### ➤ **Mesures des paramètres hémodynamiques**

La mesure de la pression artérielle a été effectuée à l'aide d'un tensiomètre électronique, placé sur le bras gauche du patient en position assise après un repos d'au moins 10 minutes. Les valeurs de la pression artérielle sont exprimées en millimètre de mercure (mm Hg).

### ➤ **Paramètre anthropométriques**

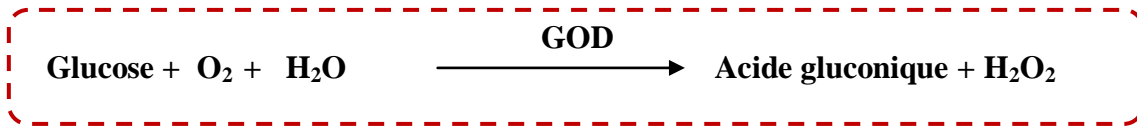
Le poids a été mesuré avec une balance électronique et la taille a été mesurée à l'aide d'une toise fixée. L'indice de masse corporelle (IMC) a été calculé selon la formule de Quételet :  $IMC = \text{poids (kg)}/\text{taille (m}^2\text{)}$ .

## **II.3. Détermination du statut glycémique**

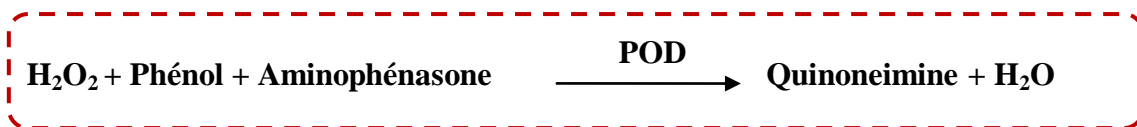
### **II.3.1. Dosage du glucose**

**Principe :** La glycémie est dosée par la méthode enzymatique colorimétrique selon **TRINDER, (1969)**. Qui consiste à un dosage colorimétrique à la suite de deux

réactions enzymatiques couplées. La première, catalysée par la glucose oxydase (GOD) qui utilise le glucose comme substrat et produit de l' $H_2O_2$ .



La seconde réaction catalysée par la peroxydase, utilise le peroxyde d'hydrogène formé comme substrat en présence du phénol et de l' amino-4-antipyrine pour donner le quinonéimine, de coloration rougeâtre. Cette coloration est d'autant plus intense que la quantité de glucose présente dans l'échantillon est élevée.



### Mode opératoire

Afin de doser le glucose sanguin trois tubes ont été préparé pour chaque patient dont un tube blanc, un tube étalon et un dans lequel nous avons déposé le sérum. Ces tubes contiennent :

	Blanc	Standard	Echantillon (plasma)
Standard	-	10 $\mu$ l	-
Echantillon	-	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Réactif de travail	1ml	1ml	1ml

Les tubes sont par la suite agités puis incubés au bain marie à 37°C pendant 10 minutes. Une couleur rose ou rouge stable pendant 30min est obtenue traduisant la production du Quinonéimine. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du glucose sanguin. La lecture de la concentration se fait par spectrophotométrie à 505 nm contre un blanc.

Le calcul de la concentration du glucose (mol /L) dans les échantillons est réalisé selon la formule suivante :

DO Echantillon

$$[\text{Glucose}] = \frac{\text{DO Etalon}}{\text{DO Etalon}} \times n, (n : \text{concentration de l'étalon}, n = 1 \text{ g/L})$$

### II. 3. 2. Dosage de l'hémoglobine glyquée (HbA1c)

**Principe :** Le dosage de l'hémoglobine glyquée a été effectué par chromatographie sur microcolonne échangeuse de cation. L'HbA1c résulte de la fixation irréversible non enzymatique du glucose à l'extrémité N-terminale des chaînes  $\beta$  de l'hémoglobine A (MOTTE *et al.*, 2011). La quantité d'HbA1c dans le sang dépend de la durée de vie du globule rouge (120 jours) et de la glycémie. Elle renseigne donc sur la qualité de l'équilibre glycémique des 120 jours précédant le dosage.

#### Mode opératoire

##### ✓ Préparation de l'hémolysât

L'hémolysât est préparé et éliminé de la fraction labile dans les conditions de température ambiante (21-26°C). Ensuite, 50  $\mu\text{l}$  de sang sont ajoutés à 200 $\mu\text{l}$  de réactif (1) dans un tube à essai, puis agités et laissés à température ambiante pendant 10-15 mn.

##### ✓ Préparation des colonnes

La partie supérieure de la colonne est débouchée et la languette inférieure est ensuite cassée. Ainsi l'éluât est éliminé.

##### ✓ Séparation et lecture de HbA1c

50  $\mu\text{l}$  d'hémolysât sont appliqués avec précaution sur le disque supérieur et l'éluât est éliminé. Quand l'hémolysât a entièrement pénétré, 200 $\mu\text{l}$  du réactif (2) sont ajoutés et l'éluât est éliminé. Après l'éluât, on ajoute 2000  $\mu\text{l}$  du même réactif

La colonne est placée sur un tube à essai et 4ml du réactif (3) sont ajoutés. La fraction HbA1c de l'éluât est ensuite récupérée. Le mélange obtenu est bien agité et l'absorbance de la fraction HbA1c est lu à 415 nm par rapport à l'eau distillée (AHb1c).

Pour la lecture d'Hémoglobine totale, on prend 50  $\mu\text{l}$  de l'hémolysât précédemment préparé de chaque sujet et on le met dans des tubes en verres, puis on lui ajoute 12 ml de réactif 3, on mélange puis on lit son absorbance à 415 nm contre l'eau distillé.

Le calcul de la concentration du HbA1c dans les échantillons est réalisé selon la formule suivante :

$$\text{HbA1c \%} = \frac{\text{DO}_{\text{HbA1c}}}{\text{DO}_{\text{Hb Totale}} \times 3} \times 100$$

**N.B :** l'absorbance est stable pendant au moins une heure.

#### NORMES

Hémoglobine glyquée [4.8-6.2]%

### II.3.3. -Dosage du peptide C

- **Principe :** Le dosage du peptide C est réalisé par la technique de chimiluminescence utilisant des billes de polystyrène sur IMMULITE 2000. C'est une technique de compétition réalisée en 2 temps:

- 1<sup>ère</sup> étape : le peptide C marqué à la phosphatase alcaline entre en compétition avec le peptide C présent dans le sérum à tester vis-à-vis d'un nombre limité de sites d'anticorps (anticorps polyclonal de lapin anti peptide C humain contenu dans l'unité test).
- 2<sup>ème</sup> étape : le substrat chimiluminescent (ester d'adamantyl dioxetane phosphate ou PPD) est hydrolysé par la phosphatase alcaline en un anion instable, ce qui permet une émission de lumière dont l'intensité est inversement proportionnelle à la concentration du peptide C contenu dans le sérum.

### II.4. Dosage des protéines totales (Méthode de Bradford)

**Principe :** La méthode de Bradford est une technique colorimétrique qui permet la détection de micro quantités de protéines en solution. Le réactif de Bradford change de couleur du rouge-brun au bleu, ceci traduit la formation d'un complexe réactif-protéine ayant un système de double liaison conjuguée dont le maximum d'absorption est à 595nm. L'intensité de coloration dosée par spectrophotométrie, est proportionnelle à la quantité de protéines dans le milieu selon la loi de Beer-Lambert. Tableau ci dessous.

<b>SOLUTIONS</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
------------------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	-----------

<b>BSA 0,1% (µl)</b>	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
<b>PBS (µl) 100</b>	100	95	90	85	80	75	70	65	60	55	50
<b>Réactif de Bradford (ml)</b>	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

### Mode opératoire

Les échantillons à tester ont été repris dans le réactif Bradford à raison de 100 µl d'échantillon pour 3ml du réactif de Bradford. La lecture des différents tubes de la gamme étalon ainsi que celle des échantillons est réalisée à 595 nm contre un blanc réactif sans protéines.

## II.5. Paramètre du statut oxydant

### II.5.1. Dosage de la catalase

**Principe :** Le dosage de la catalase sérique de fait par la méthode **AEBI, 1984** et **CLAIBORNE, 1986**. La catalase dégrade le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau et dioxygène suivant la réaction ci-dessous. Ainsi, la disparition du peroxyde d'hydrogène peut être mesurée en spectrophotométrie à 240nm.

#### Mode opératoire

50µl d'échantillon (sérum) sont ajoutés à 950µl de tampon phosphate (50mM, pH=7,4). La réaction est déclenchée avec 500µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30mM=0,3%). La lecture de la densité optique du milieu réactionnel se fait par spectrophotométrie à 240nm à l'obscurité chaque 30 seconde. L'activité de la catalase est calculée par la formule suivante :

$$Catalase\ activity\ (U\ mg\ proteins) = \frac{\Delta\ DO / \min}{0.040\ x\ mg / ml\ proteines}$$

Coefficient de d'extinction molaire = 0,040 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

### II.5.2. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

**Principe :** La mesure du MDA à l'aide du TBA selon la méthode d'**OKHAWA et al. (1979)** permet la quantification de la peroxydation lipidique qui constitue le marqueur majeur du stress oxydant. Le dosage du MDA repose sur la formation, en milieu acide et à chaud (100°C) entre une molécule du MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA), d'un



pigment coloré « rose » absorbant à 532 nm et extractible par les solvants organiques comme le n-butanol.

**Mode opératoire :** 100µl de plasma sont mélangé à une solution constitué de 200 µl acide thiobarbiturique à 20% et 600 µl acide-ortho-phosphorique à 1%. Le mélange est incubé pendant 1h dans un bain marie à 95°C suivit d'un refroidissement dans de la glace pour arrêter la réaction. Ensuite 900 µl de butanol sont ajoutés pour l'extraction du complexe MDA-TBA. L'ensemble est centrifugé à 5000xg pendant 10min. L'absorbance est déterminé sur le surnageant à 532nm. La concentration de TBARS est calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire ( $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). La quantité de MDA est exprimée en µmol/l.

### **II.5.3.Dosage du monoxyde d'azote**

**Principe :** la mesure du monoxyde d'azote se fait par la réaction de Griess (GREEN *et al.*, 1982). Cette methode, permet uniquement la mesure des nitrites (métabolite stable). Les Nitrates devront donc être préalablement réduits en nitrites ( $\text{NO}_2$ ) pour être quantifiés. La Concentration ainsi mesurée représente la somme des nitrites et des nitrates. Il s'agit d'une réaction de diazotation en deux étapes : les nitrites forment un sel de diazonium avec l'acide sulfanilique qui est ensuite couplé avec une amine (N-naphtyléthylène Diamine) (NED) pour donner un composé diazo de couleur rose vif dont l'absorbance est Mesurée à 543 nm.

#### **Mode opératoire**

100 µl de plasma sont mélangés à une solution contenant 50 µl de Griess B ,50 µl de Griess A et 800 µl PBS pH 7,4. Le mélange est centrifugé à 2000 tour par minute puis incubé a température ambiante et à obscurité pendant 15 à 20 min. La lecture de la concentration du NO se fait par spectrophotométrie à 543nm. Les concentrations du NO dans les échantillons sont ensuite déterminées à partir d'une courbe d'étalonnage.

### **II.6. Analyse statistique**

A la fin de notre stage pratique, nous avons enregistré et groupé les données des résultats sur une base de données Excel puis nous les avons traités par le logiciel *STATISTICA version 10 et Graph PAd Prism 6*.

L'analyse statistique des moyennes des différents groupes ont été comparés aux témoins en utilisant le test t appariés de Student. Le test ANOVA à une variable (tukey test) a été utilisé pour comparer les variables deux a deux.

Nos résultats sont exprimés par la moyenne  $\bar{X}$ , affectée de l'erreur standard à la moyenne (SEM), dont les formules sont les suivantes :

La moyenne arithmétique ( $\bar{X}$ ) des valeurs individuelles :

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

$\left\{ \begin{array}{l} X_i = \text{somme des valeurs individuelles} \\ N = \text{nombre de valeur} \end{array} \right.$

Erreur standard de la moyenne (ESM) :

Le degré de signification « p » lu sur la table de Student permet de fixer le degré de signification.

$$ESM = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$s(\text{écart type}) = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

La différence entre deux moyennes  $X_a$  et  $X_b$  est significative si :

0,01 < P < 0,001 ..... \*\*\* hautement significatif

0,05 < P < 0,01 ..... \*\* très significatif

P < 0,05 ..... \* significatif

P > 0,05 ..... non significatif

# Resultats et discussion

Rappelons que dans ce travail, nous nous sommes intéressés à :

- a)-Explorer les taux sériques du monoxyde d'azote (NO) et de quelques marqueurs du stress oxydatif comme le Malondialdéhyde (MDA) et la catalase chez le DT1.
- b)-Rechercher un lien existant entre ce stress physiologique causé par les troubles du métabolisme glucidique chez le DT1 et le monoxyde d'azote.

Cependant nos objectifs étaient de travailler sur une population de diabétique de type1 associée à une hypertension et sans complications. Cependant, pendant notre recrutement nous n'avons pas pu obtenir un échantillon représentatif de DT1 hypertendu. Pour cela, nous n'avons retenu dans notre population que les diabétiques de types1 sans hypertension.

Notre cohorte est représentée par 46 sujets dont 32 patients diabétiques atteints le diabète de type1 et 32 sujets témoins indemnes de toute pathologie.

Pour ce faire, nous allons explorer nos résultats par l'étude de la variation des taux NO en fonction de :

- La durée du diabète type1
- Des taux de l'hémoglobine glyquée
- Des taux du peptide C

Nous avons aussi étudiée la corrélation entre la catalase et les troubles du métabolisme glucidique ainsi que d'autres paramètres du stress oxydatif (Malondialdéhyde, Monoxyde d'azote) qui peuvent être associés au diabète type1 lors d'un stress.

### **III.1.Étude descriptive des caractéristiques cliniques et épidémiologiques de la population.**

L'évaluation clinique et épidémiologique des sujets de l'étude est regroupée dans le tableau suivant :

**Tableau I :** Caractéristiques cliniques et épidémiologique de la population de l'étude

	<b>DT1</b>	<b>Témoins</b>
<b>Total n(%)</b>	23(50%)	23(50%)
<b>Hommes n(%)</b>	11(47,83%)	10(43,47%)
<b>Femmes n(%)</b>	12(52,17%)	13(56,52%)
<b>Sexe- ratio</b>	11/12	10/13
<b>âge (ans)</b>	36,54±1,97	30,6±4,56
<b>Durée du diabète (ans)</b>	8,72±1,23	/
<b>HbA1c(%)</b>	11,05	/
<b>Glycémie (g/l)</b>	3,12±1,05	0,98 ± 0,76
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	27,16±1,24	24,93±0,67

PAS (mmHg)	128,13±2,59	111,53±4,45
PAD (mmHg)	73,40±3,01	72,86±1,84
FC (bat/min)	85,61±1,98	74,86±11,41

L'étude des caractéristiques cliniques et épidémiologiques de notre population, **tableau I** nous a permis de constater une prédominance féminine avec 12 femmes (52,17%) vs 11 hommes (47,83%) pour le groupe des DT1. Nous constatons la même prédominance chez les témoins 43,47% hommes vs 56,52% femmes avec un sexe-ratio de 0,76.

Nous constatons que la moyenne d'âge des diabétiques de type1 est de (36,54±1,97) ans vs (30,6±4,56) ans pour les témoins.

Nos résultats montrent, que la durée du diabète chez nos diabétiques est de (8,72±1,23) ans avec un taux moyen d'hémoglobine glyquée « HbA1c » de 11,05%.

Le statut anthropométrique a fait l'objet d'un seul paramètre qui est l'indice de masse corporelle (IMC). Ainsi, nous constatons un léger surpoids chez nos diabétiques avec un taux moyen d'IMC (27,16±1,24) kg/m<sup>2</sup> vs (24,93±0,67) kg/m<sup>2</sup> pour les témoins.

A partir de notre étude, nous avons constaté que la moyenne d'âge des diabétiques de type 1 est de 36,54±1,97ans. Nous concluons que le diabète de type survient chez l'individu jeune.

Les résultats de la PAD semblent être aussi équilibrés (<85) pour les diabétiques de type 1 avec un taux moyen de (73,40±3,01) mmHg vs (72,86±1,84) mmHg pour les témoins.

Aussi, on constate que la fréquence cardiaque (FC) estimée en battement par minute semble être dans les normes mais légèrement élevée chez les diabétiques de type1 (85,61±1,98) bat/min vs (74,86±11,41) bat/min pour les témoins.

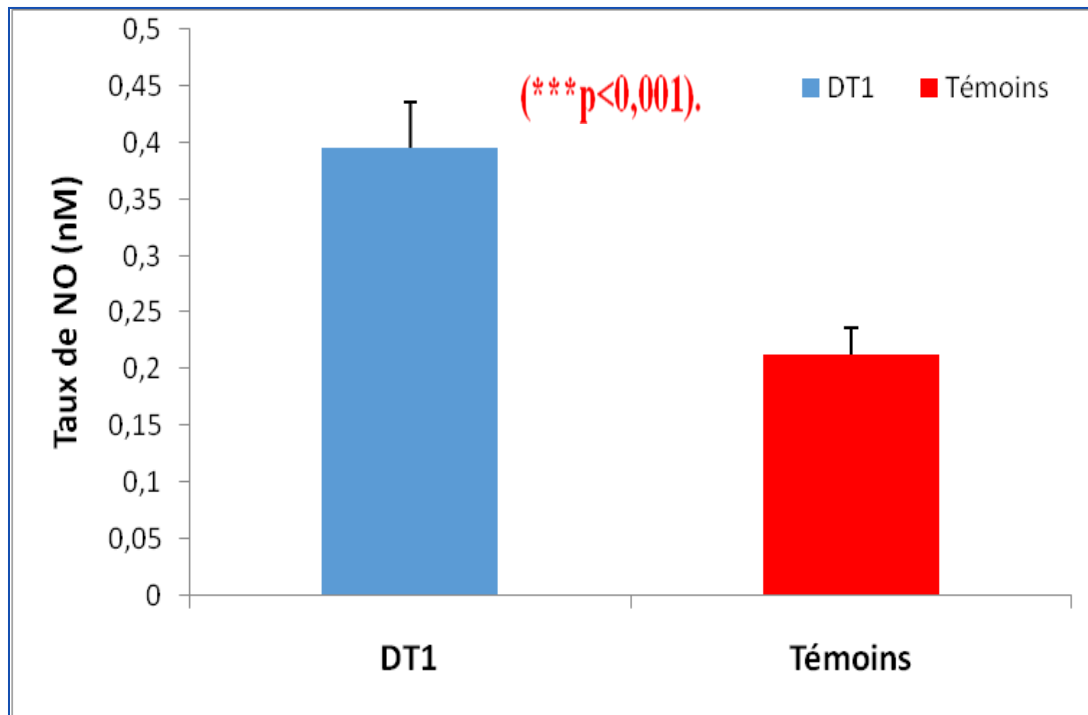
Dans notre étude, nous avons constaté que la moyenne d'âge des diabétiques de type 1 est 36,54±1,97 ans et la durée de diabète est de 8,72±1,23ans, nous concluons que le diabète de type survient chez l'individu jeune.

## **III.2.Exploration du statut oxydatif**

### **III.2.1. Variation des taux du NO**

Le monoxyde d'azote est un gaz dissous et un agent dilatateur. Il joue un rôle essentiel dans la transmission de l'information et la réponse immunitaire. C'est pour cela que nous nous sommes intéressés à évaluer les taux du NO chez le diabétique de type1 (diabète auto-immun). Nos résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau II et représentés par la figure 12.

**Tableau II** : Evaluation de la concentration du monoxyde d'azote chez les diabétiques de type1 et les témoins.



**Figure 12** : Evaluation de la concentration de monoxyde d'azote chez les diabétiques de type1 et les témoins.

Le **tableau II** et la **figure 12** Représentent le taux moyen du NO plasmatique chez les DT1 et les témoins. Ainsi, nous constatons que la concentration moyenne du NO chez les DT1 est élevée par rapport aux témoins avec des valeurs respectives de [0,39 ± 0,04] (mM) vs [0,21 ± 0,02] (mM). La comparaison entre les deux groupes témoins et diabétique par le test de student, montre qu'il existe une différence hautement significative (\*\*\*p<0,001).

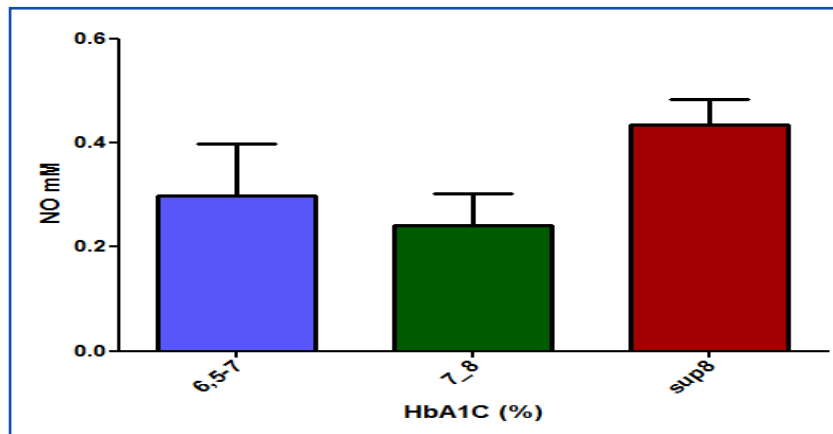
### III.2.2. la relation de l'équilibre glycémique et le NO

#### III.2.2.1. la variation des taux du NO en fonction de l'hémoglobine glyquée

Les troubles du métabolisme glucidique sont estimés par le dosage des taux de l'hémoglobine glyquée. Cette dernière constitue un dosage impératif dans le suivi du diabétique et son taux élevé reflète un état non équilibré et des hyperglycémies chroniques au cours des derniers mois chez le patient diabétique. Vue son importance, nous nous sommes intéressés à étudier

les taux du NO en fonction des différents taux de l'hémoglobine glyquée. Nos résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau III et représentés par la figure 13

**Tableau III :** Variation des taux du NO en fonction de l'hémoglobine glyquée chez les DT1.



**Figure 13 :** Variation des taux du NO en fonction de l'hémoglobine glyquée chez les DT1

Le **tableau III** et la **figure 13** Représentent la variation des taux de l'activité du NO en fonction de l'hémoglobine glyquée. La figure ci-dessus montre que les valeurs moyennes du taux de NO chez les DT1 avec une HbA1c entre [6,5 – 7]% sont plus élevées par rapport aux DT1 qui ont une HbA1c entre [7-8]%. Nous constatons aussi, que les valeurs du NO augmentent quand l'HbA1c est supérieure à 8%.

En revanche, l'étude statistique par l'ANOVA par le test de Tuky, n'a montré aucune différence significative entre les différents groupes de diabétiques classés selon les valeurs de l'hémoglobine glyquée ( $p > 0,05$ ).

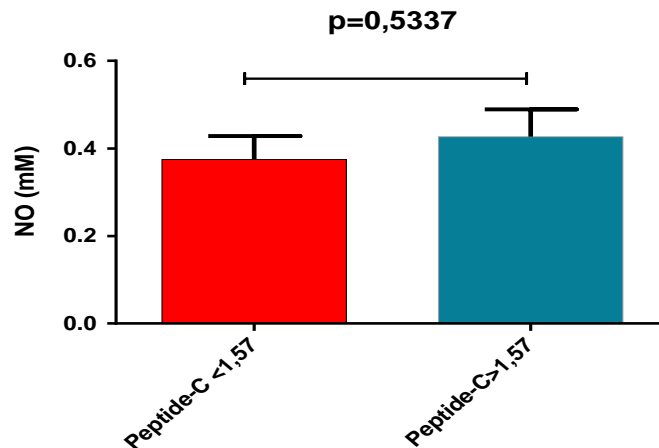
Nos résultats suggèrent qu'un diabète mal équilibré peut contribuer à l'augmentation du taux de NO.

### III.2.2.2. Etude de la variation des taux du NO en fonction des taux du peptide C

Le peptide C est essentiel pendant la biosynthèse de l'insuline, son dosage permet de déterminer l'insulinoréquérence chez le patient diabétique. En effet, c'est un marqueur de la

fonction résiduelle des cellules  $\beta$  pancréatiques chez le diabétique. Pour cela nous nous sommes intéressés à chercher l'influence de la variation des taux du NO en fonction des taux du peptide C. Nos résultats obtenus selon les deux groupes normo-glycémiques et hyperglycémiques sont répertoriés dans le tableau IV et représentés par la figure 14.

**Tableau IV** : Variation des taux du NO en fonction de peptide C chez les DT1.



**Figure 14** : Evaluation du taux du NO en fonction des taux du peptide C chez les DT1.

Le **tableau IV** et la **figure 14** représentent la variation des taux de Le NO en fonction des concentrations du peptide-C. Nos résultats montrent que le groupes des diabétiques ayant des valeurs de peptide-C ( $< 1,57$ ) ont des taux de NO légèrement inférieur [ $0,37 \pm 0,05$ ] (mM) de ceux du groupe peptide- C ( $>1,57$ ) dont le taux du NO est de [ $0,42 \pm 0,06$ ] (mM).

La comparaison des deux groupes par le test de student montre qu'il n'existe pas de différence significative ( $P=0,53$ ) entre les deux groupes.

Sachant que tous nos patients sont sous insuline, le seul paramètre qui nous informe sur les réserves insuliniques est le peptide C. Nos résultats montrent que le peptide c, ne semble pas être influencer par les taux du NO.

### III.3. Autre paramètres du stress

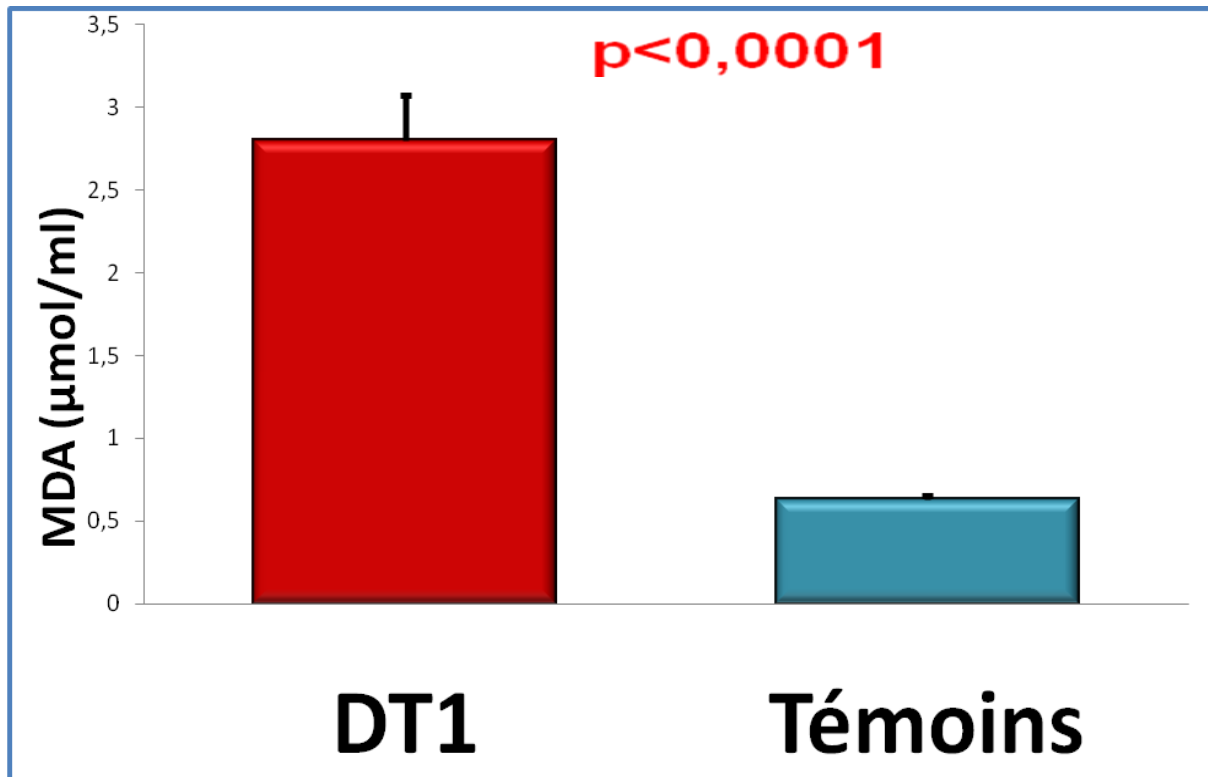
#### III.3.1. Etude de la variation des taux de MDA

La peroxydation lipidique est estimée chez les diabétiques de type1, ainsi que chez les témoins par le dosage du produit d'oxydation : Le malondialdéhyde plasmatique.



Nos résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau V et représentés par la figure 15.

**Tableau V** Evaluation de la concentration du MDA chez les diabétiques de type1 et les témoins.



**Figure 15 :** Evaluation évaluation de la peroxydation lipidique chez les diabétiques de type1 et les témoins. (La différence est hautement significative à (\*\*\*) $p < 0,001$ )

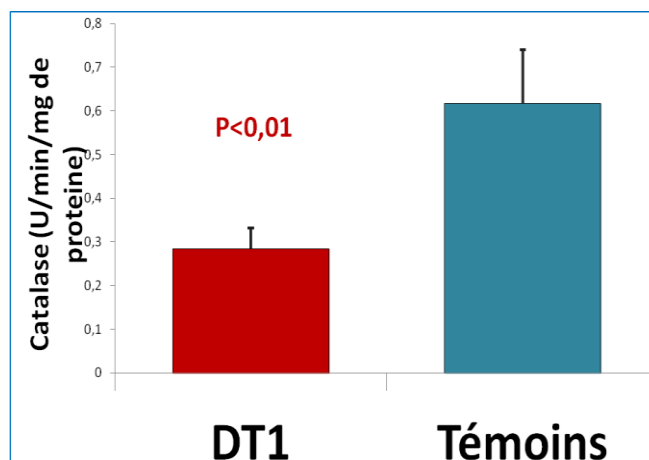
Le **tableau V** et la **figure 13** représentent le taux moyen de MDA plasmatique chez les DT1 et les témoins. Ainsi, nous constatons que la concentration moyenne de MDA chez les DT1 est plus élevée par rapport aux témoins avec des valeurs respectives de  $2,8 \pm 0,27$  (µmol/l) vs  $0,63 \pm 0,02$  (µmol/l). La comparaison entre les deux groupes témoins et diabétique (DT1) par le test de student, montre qu'il existe une différence hautement significative ( $p = 0,00001$ ).

Les taux de MDA chez nos sujets diabétiques confirment la présence d'un stress oxydant. Nos résultats suggèrent que l'hyperglycémie chronique contribue au mécanisme de peroxydation lipidique au niveau membranaire, ce qui est en faveur d'une augmentation des radicaux libres et donc de l'élévation des taux du MDA.

### III.3.2. Etude de la variation des taux de la catalase

La défense oxydative endogène a été recherchée chez les diabétiques de type1 et les témoins par le dosage de l'activité de la catalase. Les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau VI et représentés par la figure 16.

**TableauVI** : Evaluation du taux moyen de la catalase chez les DT1 et les témoins.

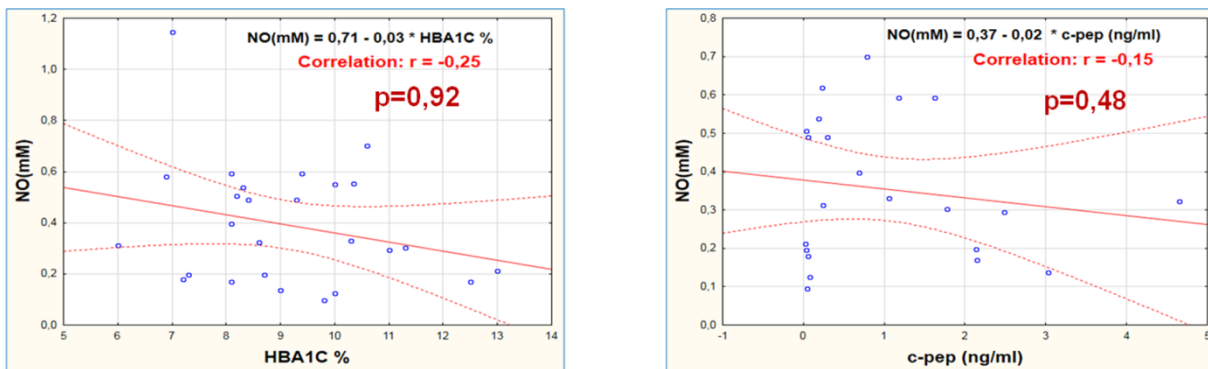


**Figure 16** : Evaluation du taux moyen de la catalase chez les diabétiques de type1 et les témoins. La différence est très significative à (\*\*p<0,01) ; vs témoin.

La **figure 16**, **tableau VI**, représentent le taux moyen de l'activité plasmatique de la catalase chez les DT1 et les témoins. Ainsi, nous constatons que la concentration moyenne de la catalase chez les DT1 est faible par rapport aux témoins avec des valeurs respectives de  $0,28 \pm 0,047$  (U/min/mg de protéine) vs  $0,61 \pm 0,122$  (U/min/mg de protéine). La comparaison entre les deux groupe DT1 et témoins montre qu'il existe une différence très significative ( $p=0,0070$ ) vs les témoins.

L'hyperglycémie chronique chez les diabétiques de notre étude est en faveur d'une augmentation de la production des radicaux libres et donc peut contribuer à diminuer la défense en antioxydant naturelle telle que la catalase. Les taux faibles de la catalase suggèrent l'existence d'un lien entre l'hyperglycémie et le stress oxydatif, ainsi qu'une diminution de capacité en antioxydants endogènes

### III-4. Etude de la corrélation entre l'équilibre glycémique et le NO



NO vs HBA1C

**Figure18:** Corrélation de la NO vs C-peptide

La recherche de l'intensité entre les taux du NO et l'analyse de régression du NO chez les diabétiques a montré une corrélation négative versus peptide C et versus HBA1C avec ( $r = -0,25$  et  $r = -0,15$ ,  $\alpha < 0,05$ ). Cette liaison est non significative (figure 17 et 18)

## **IV. Discussion**

### **IV.1-Étude descriptive des caractéristiques cliniques et épidémiologiques de la population.**

Les résultats obtenus concernant les caractéristiques cliniques et épidémiologiques de la population que la prévalence du syndrome métabolique est de  $34,12 \pm 4,22$  % avec une prédominance féminine chez les diabétiques de diabète type 1.

Selon **ALDDAFARI M en 2011**, le DT1 est décrit, dans la majorité des populations étudiées dans le monde, comme étant le plus fréquent chez les hommes que les femmes. En effet, selon l'OMS, le nombre de patients diabétiques de type 1 est estimé entre 15 et 22 millions de patients dans le monde avec une différence non significative sur la prévalence du diabète de type 1 entre les 2 sexes.

Selon **COLAS (2010)**, le DT 1 peut se manifester à tout âge, mais apparaît le plus souvent durant l'enfance ou au début de l'âge adulte, d'où son appellation ancienne de « diabète juvénile ». Il peut se développer de manière asymptomatique durant une longue période.

### **IV.2 Exploration du statut oxydatif**

Actuellement, il est bien admis que l'hyperglycémie (glucotoxicité) est la source majeure de production d'espèces réactives de l'oxygène au niveau mitochondrial. En effet, il est bien établi, que le diabète et ses conséquences métaboliques altèrent le potentiel insulino-sécréteur indépendamment des anomalies primitives de la cellule  $\beta$ . Cette altération porte à la fois sur la fonction (avec une réversibilité possible) et sur le stock de cellules  $\beta$  (étape de non-retour). Ainsi, l'hyperglycémie chronique crée les conditions d'une « glucotoxicité » et donc en conséquence, la genèse d'un stress oxydatif. Comme le montrent les résultats les patients diabétiques de l'étude dévoilent un stress oxydant.

#### **IV.2.1-Etude de la variation des taux du NO**

Le NO a été considéré jusqu'en 1986 comme un simple gaz toxique, on ne doit finalement pas s'étonner de ses multiples propriétés biologiques, qui sont déterminées par sa réactivité chimique. En effet, NO joue un rôle biologique pourrait étonner. Pourtant, il est impliqué dans deux fonctions biologiques essentielles : la transmission d'informations et la réponse immunitaire, (**Kerwin et al ., 1995**).

Notre étude montre un taux élevé du monoxyde d'azote chez les diabétiques de type 1 par rapport aux témoins cela signifie probablement que la synthèse du monoxyde d'azote est la résultante d'une inflammation dans le diabète auto immun suite à une glucotoxicité.

En effet, l'augmentation des taux de NO chez nos diabétiques suggère la présence d'un état inflammatoire. En effet, cet état peut contribuer à des complications vasculaires chez ces patients diabétiques. En effet, la littérature rapporte que le NO, possède des propriétés physiologiques à la fois bénéfiques et délétères dont une action anti-inflammatoire. Dans les conditions physiologiques, les effets anti-inflammatoires du NO• sont dus, au moins en partie, à l'inhibition de l'activation du facteur de transcription NF-kB. Aussi, le NO• inhibe la cytochrome C oxydase conduisant l'activation des Caspases, phénomène relié à une apoptose des cellules bêta pancréatiques (**Tamion et al., 2003 et Elliott et al., 1993**).

En effet, de par son rôle comme médiateur dans la réponse inflammatoire, le NO a été fortement incriminé dans les mécanismes physiopathologiques des maladies auto-immunitaires (expérimentales et humaines) (**Belguendouz et al., 2008**).

Le NO est produit durant les réponses immunitaires par la iNOS, enzyme exprimée par le système monocyte/macrophage et induite par de nombreux stimuli tels que les lipopolysaccharides et les cytokines dont l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  (**Morris et al., 2003**).

#### **IV.2.1.1-Etude de la relation de l'équilibre glycémique et le NO**

##### **➤ Étude de la variation des taux du NO en fonction de l'hémoglobine glyquée**

Nos résultats montrent une augmentation du NO en fonction de l'augmentation de l'HbA1C > 8%. Ce résultat semble indiquer un retour à l'état inflammatoire suite à un déséquilibre glycémique et des dommages oxydatifs. De plus la prise thérapeutique insulinique semble avoir aucun effet sur l'ajustement de l'équilibre glycémique. On suggère probablement que nos patients diabétiques ne suivent pas un régime diététique équilibré. Cependant, la faible production d'insuline induit un taux élevé de glycémie (concentration de glucose dans le sang) qui augmente par la suite l'hémoglobine glyquée.

En effet, selon **Cosentino et al., en 2002**, le monoxyde d'azote (NO) est un radical libre produit par oxydation de l'arginine sous l'action d'une famille d'enzymes : les NO synthases ou NOS. L'activation de certaines NOS inductibles au cours de l'inflammation génère des quantités importantes de NO.

De plus, le NO possède des propriétés inflammatoires vasodilatatrices, Ainsi, l'inflammation provoque un dérèglement du système immunitaire. Les cellules bêta sont

ensuite attaquées par les propres cellules du système immunitaire (réaction auto-immune) et provoque de ce fait une chute dans la production d'insuline (**Regnault J. P. 1992**).

➤ **Etude de la variation des taux du NO en fonction des taux du peptide C**

Nous avons contrôlé le caractère insulino-prive des patients par la mesure du peptide C. Ce dernier ne semble pas être influencé par l'augmentation du NO. Nous ne pouvons pas confirmer ces résultats car l'échantillonnage n'était pas important.

De plus, chaque sujet de notre population présente un état physiologique particulier et ne possède pas le même potentiel oxydant.

Le rôle du peptide C est essentiel pendant le processus de biosynthèse de l'insuline. Le clivage du peptide C de la molécule de pro-insuline expose l'extrémité C terminale de la chaîne  $\beta$ , permettant ainsi la modification conformationnelle nécessaire pour l'interaction efficace de l'insuline avec son récepteur (**Chevenne et al., 1999**).

En général, les peptides bioactifs exercent leurs fonctions cellulaires lorsqu'une certaine partie de leur molécule se lie de manière spécifique sur un récepteur. Pour le peptide C, les cinq acides aminés de son extrémité C terminale constituent le segment responsable pour son activité (**Ohtomo et al., 1998**).

Cependant, il existe une relation étroite entre le peptide C et la production du NO. En effet, selon **Ohtomo et al en 1998**, le récepteur membranaire auquel se lie le peptide C est couplé aux protéines G activant ensuite des voies de signalisation intracellulaires calcium-dépendantes et stimulant la protéine phosphatase 2B (PP2B). Le résultat final au niveau cellulaire est la potentialisation de l'activité de la pompe sodium-potassium ( $\text{Na}^+-\text{K}^+$ -ATPase). Cette action a été observée dans les tubules rénaux, le nerf sciatique et les nerfs des globules rouges et la branche ascendante épaisse médullaire de l'anse de Henlé. La concentration intracellulaire accrue du calcium stimule aussi l'activité de la synthétase endothéliale (eNOS) du monoxyde d'azote (NO) augmentant ainsi sa production.

### **IV.3. Autres paramètres du stress oxydatif**

➤ **Etude de la variation des taux de MDA**

Nos résultats ne concordent pas avec les travaux de (**Kakkar et al., 1998**). Qui ont constaté lors d'une étude expérimentale chez un groupe de rats rendus diabétiques par rapport au groupe de rats sains témoins, une augmentation significative de la concentration du MDA dans le foie (73.60 %) et les reins (54.98 %).

La peroxydation de lipides fournit ainsi une grande variété de produits, dont certains peuvent réagir avec les protéines et l'ADN. Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malonyldialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE) ont été étudiés comme marqueur de la peroxydation lipidique (**Marnett, 1999**)

L'augmentation du stress oxydant au cours du diabète a donc été principalement démontrée par une augmentation des dommages causés par les radicaux libres sur les protéines et les lipides. Le principal marqueur de l'augmentation des radicaux libres est l'augmentation de la peroxydation lipidique. Plusieurs études cliniques et expérimentales ont mis en évidence l'augmentation du taux des produits de la peroxydation lipidiques (diène conjugués, hydroperoxydes d'acides gras et MDA) dans le plasma et les tissus (foie, reins et cerveau) des sujets diabétiques (**Ceriello et al., 2001 ; Stephens et al., 2006**).

La peroxydation lipidique représente un marqueur clé du stress oxydant et elle est déterminée par la mesure de la TBARS (MDA). Dans le diabète type 1 auto immun, la mesure des produits de la peroxydation lipidique peut refléter le degré du stress oxydant (**Limaye et al., 2003**).

Selon **Battacharya et al en 1997**, l'augmentation de la concentration du MDA suggère une augmentation des espèces réactives de l'oxygène L'augmentation du taux de MDA est le résultat de l'augmentation des ERO qui attaquent les acides gras polyinsaturés de la membrane cellulaire et provoque la peroxydation lipidique.

Cette augmentation de la peroxydation lipidique, dans le plasma, a été également retrouvée dans les membranes érythrocytaires et les membranes des leucocytes des diabétiques (**Vijayalingam, 1996**).

#### ➤ **Etude de la variation des taux de la catalase**

Nos résultats concordent avec les travaux de (**Kakkar et al., 1998**) qui rapportent que la diminution de l'activité de la CAT chez les diabétiques de type 1 par rapport au témoins pourrait être le résultat de l'inactivation de l'enzyme par l'anion superoxyde, par une glycation ou par les deux mécanismes en même temps.

Selon **Delattre et al en 2005**. La catalase est une enzyme tétramérique, où chaque sous unité comporte un groupement ferriprotophyrine dans son site actif avec un atome de fer à l'état  $Fe^3$  et une molécule de NADPH. La fixation du NADPH par la catalase lui confère une protection contre l'attaque de l' $H_2O_2$ .

La catalase est présente dans la plupart des organismes eucaryotes ou procaryotes. L'activité catalase est réduite par certaines conditions notamment lors de stress thermiques ou osmotiques (**Hertwig *et al.*, 1992**). De hauts niveaux de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaires entraînent une activation préférentielle de la catalase tandis que de plus faibles niveaux seraient préférentiellement pris en charge par la GPX. Ces mécanismes redondants deviennent ainsi complémentaires (**Pamplona & Costantini, 2011**) .

La catalase et le glutathion peroxydase ont des rôles protecteurs similaires et leur contribution relative est assez variable. La catalase est surtout active lorsque le niveau de stress oxydatif est élevé ou que la quantité de glutathion peroxydase est limitée. La catalase, joue un rôle significatif en permettant d'éliminer l'excès du peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier (**Cantin, 1999**) .



# Conclusion

# CONCLUSION

Le monoxyde d'azote est un gaz dissous et un agent dilatateur. Il joue un rôle essentiel dans la transmission de l'information et la réponse immunitaire. De plus, plusieurs études ont constaté une augmentation du NO dans le développement des maladies vasculaires liées au diabète.

L'étude de la relation entre le monoxyde d'azote (marqueur du stress oxydant) et l'hyperglycémie chronique chez les diabétiques type 1 (diabète auto-immun) suggèrent les conclusions suivantes :

- Le diabète de type 1 survient chez l'individu dont l'âge moyen est de  $(36,54 \pm 1,97)$  avec une prédominance féminine.
- Les concentrations élevées du NO au cours d'une hyperglycémie chez les DT1 suggèrent son implication dans la réponse immunitaire comme agent cytotoxique avec une surproduction de radicaux libre. Cette situation suggère un état inflammatoire qui peut probablement contribuer à long terme à des complications vasculaires chez ces patients diabétiques
- Les valeurs de l'HbA1C ( $>8\%$ ) semble indiquer un retour à l'état inflammatoire suite à un déséquilibre glycémique et à des dommages oxydatifs. Cette situation de stress physiologique semble diminuer l'effet de la thérapeutique insulinique.
- Les taux élevés du MDA chez les DT1 témoignent d'un déséquilibre confirme l'état d'un stress cellulaire et tissulaire.
- Le taux faible de la catalase suggère qu'il existe chez ces patients diabétiques un déséquilibre dans le système de défense endogène en antioxydant.

Ainsi, nous pouvons conclure que les concentrations élevées du NO au cours d'une hyperglycémie chez les DT1 suggèrent son implication dans la réponse immunitaire comme agent cytotoxique avec une surproduction de radicaux libre. En conséquence, Il semble que le NO soit un bio marqueur préventif de l'état inflammatoire et de la dégénérescence vasculaire chez le diabétique. Cependant nos résultats préliminaires doivent être justifiés par un plus grand échantillonnage.

En effet, chaque sujet de notre population présente un état physiologique particulier et ne possèdent pas le même potentiel oxydant.

En perspectives, il serait intéressant de développer cette recherche de point de vue opérationnel par approfondissement de la connaissance sur :

- l'étude génétique de gènes de susceptibilité pour la NOS
- l'étude des taux du NO chez les diabétiques associées à des complications macro et micro-vasculaire

# References

**ALDDAFARI MOUDJAHID S., 2011-** Etude du Polymorphismes Génétique du Diabète de Type 1 dans la Population de l'Ouest Algérien (INS-VNTR & CTLA-4). Mémoire Magister En GENETIQUE MOLECULAIRE HUMAIN ET SANTE UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAÏD-TLEMCEN ., PP : 1-66.

**Ahmed,N.,(2005)-**Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **67**(1): 3-21.

**Archer,SL., Huang.JM., Hampl V., Nelson .DP., Shultz.,PJ et Weir. EK., (1994)-**. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(16):7583-7.

**Aronson,D.,(2008)-**Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. *Adv. Cardiol.* **45**: 1-16.

**Bonnefont-Rousselot., D., Beaudoux, J.L., Thérond, P., Peynet , J., Legrand, A et Delattre, J., (2004)-** Diabète sucré, stress oxydant et produits de glycation avancée. *Annales Pharmaceutiques Françaises* **62** : 147-157.

**Brownlee, M., (2005).** The pathobiology of diabetic complications. Aunifying mechanism. *Diabetes* **54**: 1615-1625.

**Cai H., (2000),** Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.*, 87(10):8404.

**Chevenne D., Trivin F, et Porquet, D., (1967)-** Insulin assays and reference values *Diabetes Metab* (1999) ; 25 : 459-476.

**Chevenne D et Trivin F., (1999)-** Porquet D. Insulin assays and reference values. *Diabetes Metab* ; 25 : 459-476.

**COLAS R., 2010-** Syndrome métabolique et diabète chez l'Homme. Composition lipidique et oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) plasmatiques en relation avec l'activation des plaquettes sanguines. Université de Lyon- Institut National des Sciences Appliquées de Lyon., France., PP 1- 192.

**Davies MJ., Wang H et Dean RT., (1999)-**Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Rad Biol Med.*, **27**: 1151-163

**Dali-Youcef. N., (2010)-**Les produits de fin de glycation des protéines et leur récepteur en pathologie. *Médecine des maladies Métaboliques* **4** (6): 623–632.

**Du. X.L., (2000)-** Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 12222 - 12226.

**Esterbauer .H, Gebicki .J, Puhl .H et Jurgens .G (1992)**-The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med.*, 13: 341-90.

**Forst .T., De La Tour .D.D., Kunt A., Pfützner .A., Goitom .K et Pohlmann. T., (2000)**- Effects of proinsulin C-peptide on nitric oxide, microvascular blood flow and erythrocyte Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in diabetes mellitus type I *Clin Sci* ; 98 : 283-290.

**Gerzer .R, Bohme E, Hofmann .F et Schultz .G., (1981)**- Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS Lett.*, 132:71-74.

**González, R.G.P., Barnett, J., Aguayo, H.M., Cheng, L.T et Chylack, J., (1984)**- Direct measurement of polyol pathway activity in the ocular lens. *Diabetes* 33:196-199.

**Guillet. C., (2010)**- Implication des produits terminaux de glycation dans les complications liées au diabète. *Nutrition clinique et métabolisme* 24 : 109-114.

**Guillausseau. P.J., Meas. T., Virally. M., Laloi-Michelin., M., Ambonville, C et Kevorkian, J.P., (2008)** - Insulinosécrétion et diabète de type 2, *Médecine des maladies Métaboliques* 1 : s21-s24.

**Green A., Gale E.A. et Patterson C.C., ( 1992)** -Incidence of childhood-onset insulin-dependent diabetes mellitus :the EURODIAB ACE Study. *Lancet.*, 339(8798):905-9.

**Kerwin JF, Lancaster JR et Feldman PL., (1995)**- Nitric oxide : a new paradigm for second messengers. *J Med Chem* ; v38 : 4343-62.

**King.G.L et Brownlee.M., (1996)**- The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 25 (2): 255-270.

**Knip .M. et Siljander .H., (2008)**- Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes.*Autoimmunity Reviews.*, 7: 550–557.

**Laight DW, Carrier MJ et Anggards. E.E., (2000)**- Antioxidants, diabetes and endothelial function. *Cardiovasc Res.*, 47: 457-64.

**Lavigne .C., Marette .A et Jacques .H., (2000)**- Cod and soy proteins compared with casein improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 278: E491-vE500.

**Levine .RL., (2002)**- Carbonyl modified proteins in cellular regulation. Aging and disease. *Free radic. Bio Med.*, 32: 790-96.

**Malardé .L., (2012)**-Activité physique et produits dérivés du soja : intérêts dans la prise en charge du stress oxydant associé au diabète de type 1. Thèse de doctorat, Sciences Humaines et Sociales. *L'Université européenne de Bretagne.*

**Maritim .AC., Sanders.RA et Watkins.JB., (2003)-** Diabetes, oxidative stress and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol.*, **17**: 24-38.

**Mao .GD., (1992)-** Poznansky MJ. Electron spin resonance study on the permeability of superoxide radicals in lipid bilayers and biological membranes. *FEBS Lett.*, **305(3)**:233-6

**Ohkawa. H., Ohishi .N et Yagi K., (1979)-** Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annals of Biochemistry.*, **95**: 351- 358.

**Ohtomo .Y., Aperia .A., Sahlgren .B., Johansson .B.L et Wahren J., (1996)-** C-peptide stimulates rat renal tubular Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in synergism with neuropeptide Y *Diabetologia* ; **39** : 199-205

**Ohtomo .Y, Bergman .T, Johansson .B.L, Jörnvall .H et Wahren .J., (1998)-** Differential effects of proinsulin C-peptide fragments on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity of renal tubule segments *Diabetologia* ; **41** : 287-291.

**Pearl-Yafe .M., Kaminitz A, Yolcu ES, Yaniv I, Stein J et Askenasy N., (2007)-** Pancreatic islets under attack: cellular and molecular effectors. *Curr Pharm Des.*, **13(7)**:749-60

**Perlemuter .L., Collin de l'hortet .G. et Sélam .J-L., (2000)-** Diabète etvmaladies métaboliques. Masson Editeur., 376 p.

**Petersen, K.F., (2003).** Divergent nitric oxide bioavailability in men 58 and women with sickle cell disease. *Circulation* 2003;107:271-278. 59 4.

**Radomski .MW., Palmer .RM et Moncada .S., (1987)-**Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*, , **2(8567)**:1057-8.

**Raccach.D., (2004)-** Épidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. *EMC-Endocrinologie* **1**: 29-42.

**Rigalleau. V., Lang. J et Gin, H., (2007)-** Étiologie et physiopathologie du diabète de type 2. *Endocrinologie-Nutrition* 10-366-D-10.

**Rodier .M., (2001)-** Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique, **25(2)**: 95-101.

**Santini .SA., Marra .G et Giardina B., (1997)-** Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes*; **46** : 1853-8.

**Nourooz-Zadeh J., Tajaddini-Sarmadi .J., McCarthy .S., Betteridge DJ et Wolff SP., (1995)-** Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. *Diabetes*; **44**: 1054-8..

**Schleicher.E.D et Weigert.C., (2000)-** Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int. Suppl.* **77**: S13-S18.

**Steiner .D.F., Clark .J.L., Nolan .C., Rubenstein .A.H., Margoliash .E et Aten B ., (1969)-** Proinsulin and the biosynthesis of insulin *Recent Prog Horm Res .*, 25 : 207-282.

**Steiner .D.F., Cunningham. D., Spigelman .L., (1967)-** Aten B. Insulin biosynthesis: evidence for a precursor *Science* ; 157 : 697-700]

**Sima .A.A., Zhang .W., Sugimoto .K., Henry .D., Li .Z et Wahren .J.,(2001)-** C-peptide prevents and improves chronic type 1 diabetic polyneuropathy in the BB/Wor rat *Diabetologia* ; 44 : 889-897

**Tournant F., Heurtier A. et Bosquet F.,( 1998)-** Classification du diabète sucré. Critères diagnostiques et dépistage. *Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), Endocrinologie-Nutrition*, 10-366-A-10, 13 p

**Trinder .P., (1969)-** Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin Biochem.* 6, 4.

**Törn .C., (2003).** C-peptide and autoimmune markers in diabetes *Clin Lab .*, 49 : 1-10].

**Tsimaratos .M., Roger .R., Chabardès .D., Mordasini .D., Hasler .U et Doucet. A., (2003).** C-peptide stimulates Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity via PKC alpha in rat medullary thick ascending limb *Diabetologia* ; 46 : 124-131.

**Vijayalingam S, Parthiban A, Shanmugasundaram K et Mohan V., (1996)-** Abnormal antioxidant status in impaired glucose tolerance and noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Diab Med* ; 13 : 715-9., Akkus I, Kalak S, Vural H, *et al.* Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamin C

**Wahren .J., Ekberg .K., Johansson .J., Henriksson .M., Pramanik .A et Johansson .B.L., (2000)-** Role of C-peptide in human physiology *Am J Physiol Endocrinol Metab* ; 278 : E759-E768

**Wassmann .S, Wassmann .K et Nickenig. G.,(2004)-** Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hyperten.*, **44**: 381-6

**Wolff. S.P., (1991)-** Is hyperglycemia risky enough to justify the increased risk of hypoglycemia linked with tight diabetes control?. *Biochem. Med. Metab. Biol.* **46** (2):129-139.

# *Annexes*



## ANNEXE I

### ❖ **Matériel utilisé**

- Micropipettes de 1000 µl, 500 µl, 100 µl, 50 µl, 10 µl
- Congélateur à – 80
- Réfrigérateur à + 4
- Balance de précision (RADWAG PS 210/C/2)
- Bain marie (SELECTA)
- Vortex (VWR VV3)
- Centrifugeuse de paillasse (Hettich EBA20)
- Spectrophotométrie (SHIMADZU UV-1601)
- Spectrophotométrie de biochimie (BA-88A)

### ❖ **Réactifs**

- ✓ Kit pour glucose
- ✓ Kit pour l'hémoglobine glyquée A1c
- ✓ Kit cholestérol
- ✓ Kit triglycérides
- ✓ Kit HDL
- ✓ Kit pour l'urée
- ✓ Kit pour la créatinine
- ✓ Kit pour Aspartate Amino-transférase ASAT (GOT)
- ✓ Kit pour Alanine Amino-transférase phosphate de pyridoxal ALAT (GPT)

## ANNEXE II

### • Questionnaire

#### INFORMATIONS PERSONNELLES

Nom Prénom : .....

Sexe : H  ou F

Age : .....

Résidence : .....

Médecin traitant

: .....

Externe :  ou Hospitalisé :

Hôpital : .....

Service : .....

#### INFORMATIONS CLINIQUES :

Type de diabète suspecté : Type 1

Etiologie du diabète : connu  non connu

Age de début du diabète : .....

Durée du diabète : .....

IMC (Kg/m<sup>2</sup>) : ..... Poids = ..... taille = .....

Tension artériel : PAS = ..... PAD = ..... FC = .....

Traitement actuel : .....

Equilibre glycémique : Bon  Moyen :  Mauvais :

#### CRITERES D'INCLUSION :

Début explosif rapide

Acidocétose inaugural<sup>e</sup> ; Autres : .....

Syndrome cardinal (polyurie<sup>e</sup>, polydipsie<sup>e</sup>, amaigrissement<sup>e</sup>)

HbA1c  ..... glycémie   .....

Troubles cardiaques  Trouble de la vision

#### Evolution des valeurs de la glycémie :

1ère mesure : ..... 2ème mesure : ..... 3ème mesure : .....

#### COMPLICATIONS :

• Néphropathie  Neuropathie  Rétinopathie  Microangiopathie  Macroangiopathie

## Composition des réactifs

### ❖ Glucose

#### Réactifs 1 (Tampon)

Tampon tris, PH=7.....	100 mmol/l
Phénol.....	0.3 mmol/l.

#### Réactif 2 (Enzymes)

Glucose oxydase.....	10 000 U/l.
Péroxydase (POD).....	1000 U/l.
Amino-4-antipyrine.....	2.6 mmol/l.

#### Réactif 3 (Standard)

Etalon (glucose).....	100 mg/dl.
Etalon (glucose).....	1 g/ l.
Etalon (glucose).....	5.56 mmol/l.

### Hémoglobine glyqué (HBA1c)

#### Réactif 1

Phosphate de potassium.....	50 mmol/l.
Détergent pH 5.....	5 g/l.
Azoture de sodium .....	0,95 g/l.

#### Réactif 2

Un tampon de phosphate pH6, 5.....	30 mmol/l.
Azoture de sodium .....	0,95 g/l.

#### Réactif 3

Un tampon de phosphate pH6, 5.....	72 mmol/l.
Azoture de sodium.....	0.95 g/l.

### Microcolonne

Contiennent une quantité pré-poids de résine équilibrée avec

Du tampon du phosphate pH 6, 5 .....	72 mmol/l.
Azoture de sodium.....	0,95 g/l.