

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE DE BLIDA -1-

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE



## Mémoire de fin d'étude

*En vue de l'obtention du diplôme de*

*Master: EN SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE*

*Filière : SCIENCES BIOLOGIQUES*

*Option : Génie Biologique*

## THÈME

**INTERET DU DOSAGE DE LA CATALASE CHEZ  
UNE POPULATION DE DIABETIQUE DE TYPE I**

Présenter par :

Soutenu le : 18/06/2015

M<sup>elle</sup> BAKRIME Hanane

M<sup>elle</sup> HALLAK Imene

Devant le jury:

M<sup>me</sup> SAIDI F.

Professeur

UB1

Présidente.

M<sup>me</sup> ROUAKI F.

MAA

UB1

Examinatrice.

M<sup>me</sup> EDDAIKRA A.

MAA

UB1

Promotrice.

*Promotion : 2014 - 2015*

## REMERCIEMENTS

Avant toute chose, nous tenons à remercier **Dieu** le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

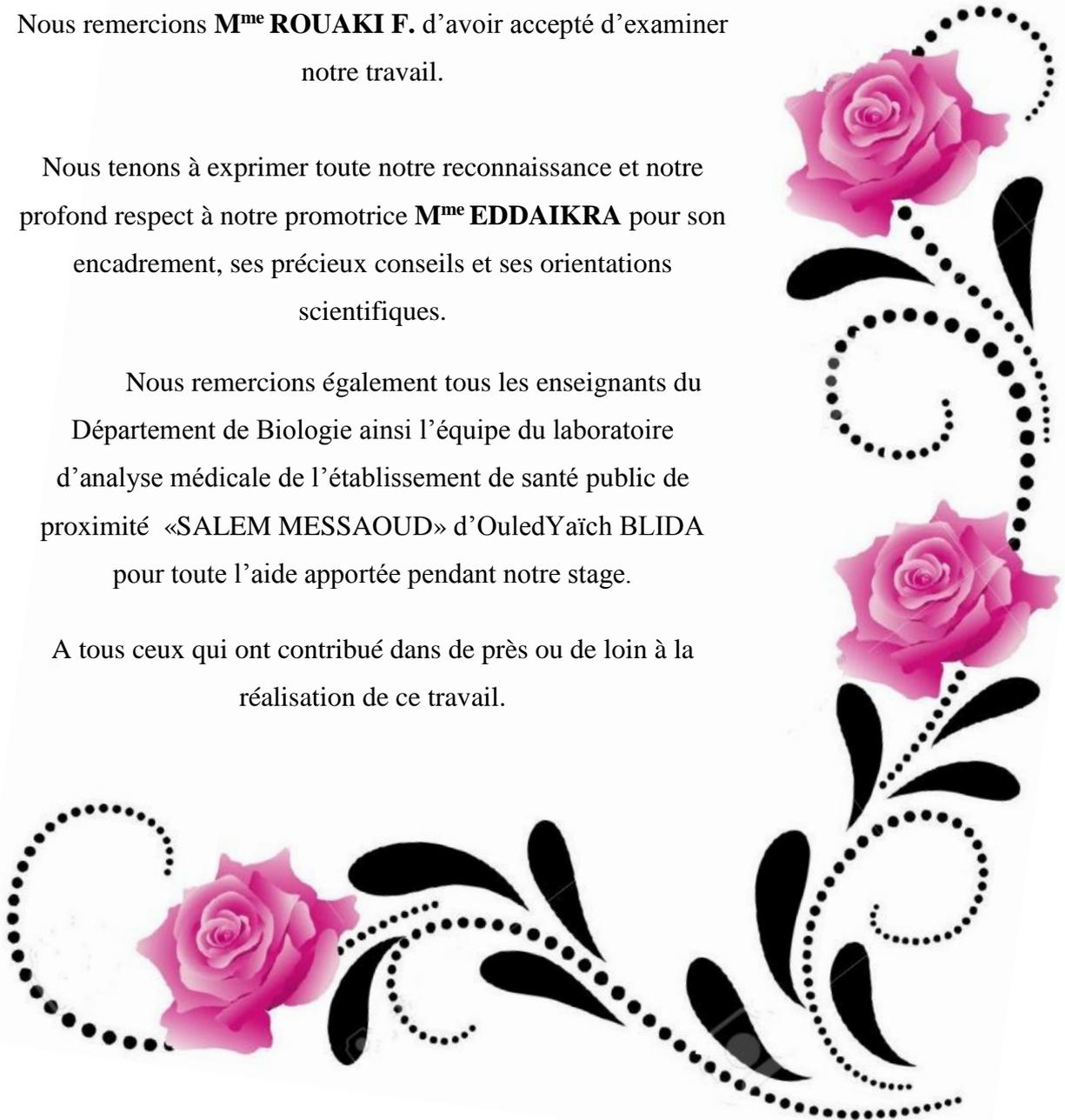
Nous remercions notre chef d'option **M<sup>me</sup> SAIDI F.** d'avoir Accepté de présider le jury de notre soutenance.

Nous remercions **M<sup>me</sup> ROUAKI F.** d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance et notre profond respect à notre promotrice **M<sup>me</sup> EDDAIKRA** pour son encadrement, ses précieux conseils et ses orientations scientifiques.

Nous remercions également tous les enseignants du Département de Biologie ainsi l'équipe du laboratoire d'analyse médicale de l'établissement de santé public de proximité «SALEM MESSAOUD» d'OuledYaïch BLIDA pour toute l'aide apportée pendant notre stage.

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





*DÉDICACE*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes chers parents :*

*Ma mère Ghania et mon père Mohamed*

*Pour leurs patiences, leurs amours, leurs soutiens, leurs encouragements*

*Et leurs sacrifices*

*Mes frères Redhouane et Oussama, Mes sœurs Aicha et Noura*

*Mes amies et mes camarades*

*Sans oublier les enseignants que ce soit du primaire, du moyen, du secondaire*

*ou de l'enseignement supérieur*

*Mention spécial à Mr. TEFFAHI Djamel pour son générosité*

*Et a toutes les personnes que j'aime*

*B. Hanane*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail*

*A mes très chères parents mon père ABDELKADER*

*Et ma mère ZOUBIDA,*

*Pour leur sacrifice, leur patience, leur amour, leur soutien*

*Et leurs encouragements.*

*A mes chères sœurs ISMA, SALIMA*

*Et SIRINE.*

*A mes frères MOHAMED, YUCEF et KHALED.*

*A mes nièces TASNIME, HANIA et mes neveux*

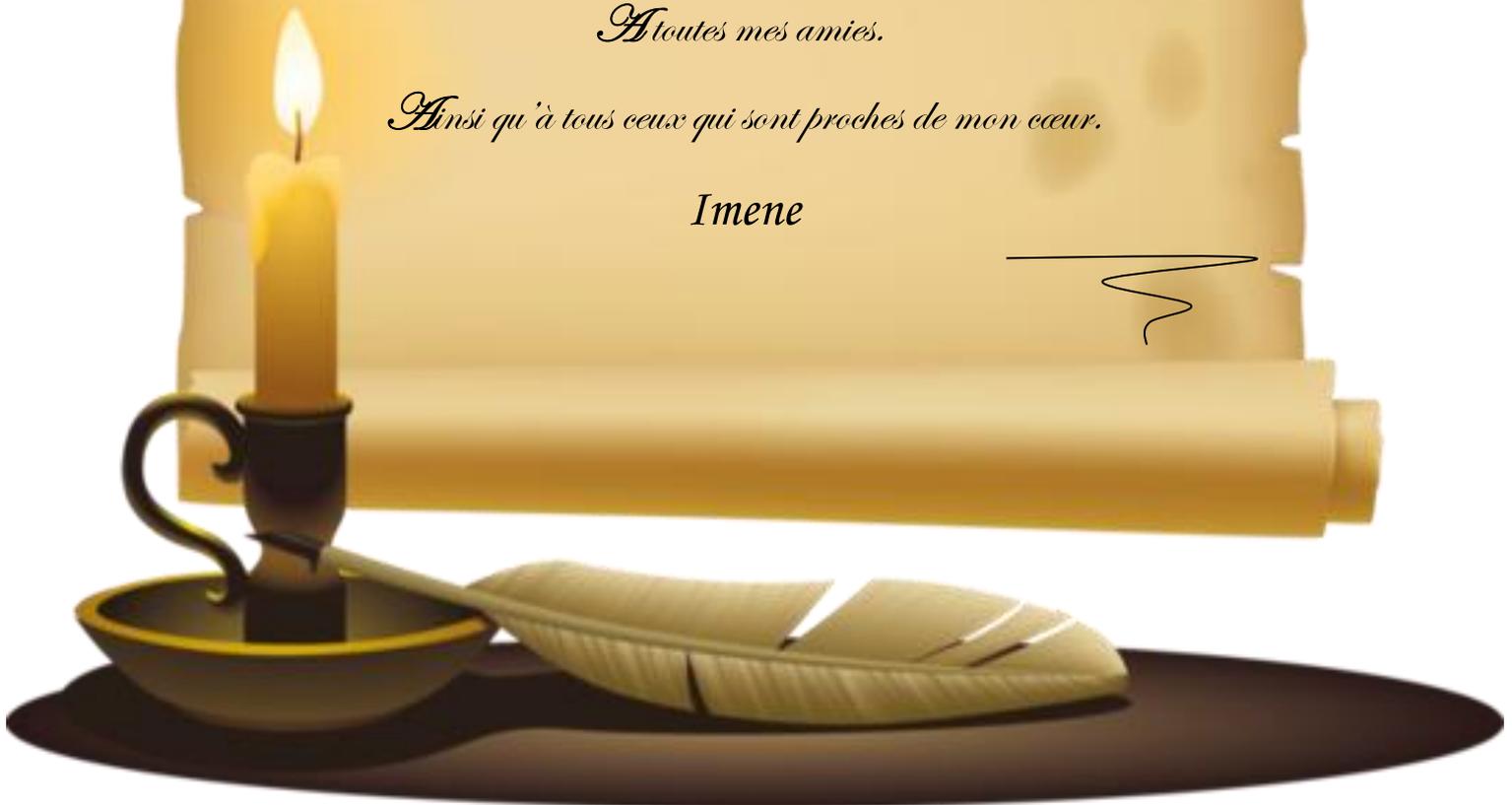
*ABD ESSAMED, MOHAMED et ANES.*

*A toute la promotion de Génie Biologique.*

*A toutes mes amies.*

*Ainsi qu'à tous ceux qui sont proches de mon cœur.*

*Imene*



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b> La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants (FAVIER, 2006) .....	2
<b>Figure 2 :</b> Lésion de l'ADN formées par attaque radicalaires du patrimoine génétique de la cellule (FAVIER, 2003).....	5
<b>Figure 3 :</b> Nature de quelques modifications des chaines latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaires (FAVIER, 2003).....	5
<b>Figure 4 :</b> Mécanisme de la peroxydation des acides gras polinsaturés et natures des produits terminaux (FAVIER, 2003).....	6
<b>Figure 5 :</b> Aperçu des différentes espèces oxygénées activées (EOA) et des antioxydants régulateurs de leur production (HALENG <i>et al.</i> , 2007).....	7
<b>Figure 6 :</b> La structure de la catalase (PUTNAM <i>et al.</i> , 2000).....	8
<b>Figure 7 :</b> Schéma de la molécule d'insuline (WALLBERG et COOK, 2013).....	11
<b>Figure 8 :</b> Voies de signalisation intracellulaires du récepteur à l'insuline (MALARDE, 2012) .....	12
<b>Figure 9 :</b> Mécanisme de destruction des cellules $\beta$ par apoptose induit par le stress oxydant dans le DT 1 (SALTIEL et KAHN, 2001).....	13
<b>Figure 10 :</b> Relation entre l'hyperglycémie et le stress oxydant (PACKER <i>et al.</i> , 2000).....	14

<b>Figure 11</b> : Voies oxydatives de stress dans le diabète sucré ( <b>BONNEFONT-ROUSSELOT <i>et al.</i>, 2004</b> ).....	15
<b>Figure 12</b> : Mécanisme immunitaire de destruction des cellules $\beta$ ( <b>LAZO-DE-LA-VEGA-MONROY et FERNÁNDEZ-MEJÍA, 2013</b> ).....	17
<b>Figure 13</b> : Formation d'adduit-TBA (1:2).....	24
<b>Figure 14</b> : Formation du diazonium.....	25
<b>Figure 15</b> : Evaluation du taux moyen de la catalase chez les diabétiques de type 1 et les témoins.....	28
<b>Figure 16</b> : Variation des taux de la catalase en fonction de la durée du diabète type 1.....	29
<b>Figure 17</b> : Variation des taux de la catalase en fonction de l'hémoglobine glyquée chez les DT1.....	30
<b>Figure 18</b> : Evaluation du taux de la catalase en fonction des taux du peptide C chez les DT1.....	31
<b>Figure 19</b> : Evaluation du taux de la catalase en fonction des taux de la glycémie chez les DT1.....	32
<b>Figure 20</b> : Evaluation évaluation de la peroxydation lipidique chez les diabétiques de type 1 et les témoins.....	33
<b>Figure 21</b> : Evaluation de la concentration de monoxyde d'azote chez les diabétiques de type 1 et les témoins.....	34

## LISTE DES TABLAUX

<b>Tableau I :</b> Les principales espèces réactives d'oxygènes et d'azotes radicalaires et non radicalaires ( <b>BONINI et AUGUSTO, 2001; ADLY, 2010</b> ).....	3
<b>Tableau II :</b> Caractéristiques cliniques et épidémiologique de la population de l'étude.....	27

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>AGE :</b>	Advanced Glycation End-products
<b>DNPH :</b>	Di-nitrophényl-hydrazone
<b>DAG</b>	Di-acyl glycérol
<b>DT1 :</b>	Diabète de type 1
<b>ERN :</b>	Les espèces réactives de l'azote
<b>ERO :</b>	Les espèces réactives de l'oxygène
<b>GAPDH</b>	Glycéraldéhyde-3-phosphate-dehydrogénase
<b>GFAT :</b>	Glucosamine fructose amido-transférase
<b>GLUT4 :</b>	Glucose Transporter 4
<b>GPx</b>	Glutathion peroxydase
<b>Grb2 :</b>	Growth factor ReceptorBound 2
<b>GSH :</b>	Glutathion réduit
<b>4-HNE :</b>	4-Hydroxy-nonénal
<b>HPLC :</b>	High Performance LiquidChromatography
<b>IAA :</b>	Auto-anticorps anti-insuline
<b>IA-2A :</b>	Anticorps anti-IA2
<b>ICA :</b>	Isletcellantibody
<b>IMC :</b>	Indice de masse corporel
<b>IR :</b>	InsulinReceptor
<b>IRS :</b>	InsulinReceptorsubstrates
<b>MAPK :</b>	MitogenActivatedProtein kinase
<b>MDA :</b>	Malondialdéhyde
<b>MGO :</b>	Méthylglyoxal

<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
<b>NADPH :</b>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
<b>NF-KB</b>	Nuclear factor kappa B
<b>NO :</b>	Monoxyde d'azote
<b>PI3K :</b>	Phosphatidylinositol-3-kinase
<b>PIP3 :</b>	Phosphatidylinositol tris-Phosphate
<b>PKB/Akt :</b>	Proteine Kinase B
<b>PKC :</b>	Proteine Kinase C
<b>PTEN :</b>	Phosphatase and tensin homolog
<b>PTP :</b>	Protéines Tyrosine Phosphatases
<b>RAGE :</b>	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
<b>SOD :</b>	Superoxydismutase
<b>TBARS :</b>	ThioBarbituric Acid Reactive Substances
<b>TNF <math>\alpha</math> :</b>	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
<b>UDP-GlcNac :</b>	UDP-N-acétylglucosamine

## RÉSUMÉ

Cette étude a été menée afin d'évaluer chez les patients atteints de diabète type 1 (DT1), l'activité plasmatique de la catalase, une enzyme clé de la défense oxydative.

La mesure de l'activité de la catalase, ainsi que les taux du Malondialdéhyde (MDA) et du monoxyde d'azote (NO) plasmatique ont été réalisés chez 22 sujets diabétiques de type 1 et 23 sujets sains. Cette population a été sélectionnée et recrutée au laboratoire de l'établissement de santé public «SALEM MESSAOUD de OuledYaïch de BLIDA».

Notre étude a démontré que le diabète de type 1 survient chez les individus dont la moyenne d'âge est de  $36,54 \pm 1,97$  ans avec une prédominance féminine. Nos résultats montrent également que les taux de l'activité de la catalase sont plus faibles chez les DT1 par rapport aux témoins. En effet, l'hyperglycémie ( $>1,26\text{g/l}$ ) est marquée par une diminution des valeurs de l'activité de la catalase. En revanche, les concentrations moyennes du NO et de MDA chez les DT1 sont élevées par rapport aux témoins. En outre, l'analyse de régression de la catalase chez les diabétiques a montré une corrélation fortement positive avec le MDA et l'hémoglobine glyquée dont les valeurs respectives sont  $r = 0,99$  ;  $r = +0,72$ ,  $\alpha < 0,05$ . Alors, cette corrélation est faiblement positive avec la glycémie à jeun et l'insuline dont les valeurs respectives sont  $r = +0,31593$  ;  $r = +0,13791$ ,  $\alpha < 0,05$ .

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.

**Mots clés :** Diabète type 1, défense oxydative, catalase, hyperglycémie, NO, MDA, radicaux libres.

## الملخص

أجريت هذه الدراسة لتقييم لدى المرضى الذين يعانون من داء السكري من النوع 1، النشاط البلازمي للكتلاز، إنزيم أساسي للدفاع التأكسدي.

وقد تم قياس نشاط الكتلاز ومستويات المالون ثنائي الألدريد وأكسيد النيتريك في البلازما عند 22 شخص مصابون بداء السكري من النوع 1 و 23 أصحاء. وقد تم استقبال هذه الفئة من الناس على مستوى مختبر المؤسسة العمومية للصحة الجوارية لأولاد يعيش "سالم مسعود بالبيدة".

و قد أظهرت دراستنا أن مرض السكري من النوع 1 منتشر لدى الأشخاص الذين متوسط أعمارهم بين 36.54  $\pm$  1.97 سنة مع ارتفاع نسبته عند الإناث. تظهر نتائجنا أيضا أن مستويات نشاط الكتلاز منخفضة جدا لدى مرضى السكري مقارنة بمجموعة الشهود. في الواقع، تميز ارتفاع نسبة السكر في الدم ( $1.26 < \text{غ} / \text{لتر}$ ) بانخفاض قيم نشاط الكتلاز. في المقابل، فإن التركيزات المتوسطة لأكسيد النيتريك و المالون ثنائي الألدريد لدى المصابين بداء السكري من النوع 1 مرتفع مقارنة بمجموعة الشهود. كما أظهر تحليل الانحدار من الكتلاز عند مرضى السكري وجود علاقة إيجابية قوية مع المالون ثنائي الألدريد والهيموجلوبين السكري مع القيم التالية :  $r = +0.99$  ،  $r = +0.72$  ;  $\alpha > 0.05$ . في حين أنها موجبة على نحو ضعيف مع الجلوكوز والأنسولين مع القيم التالية :  $r = +0.31$  ،  $r = +0.13$  ;  $\alpha > 0.05$ .

ارتفاع السكر في الدم المزمن لدى مرض السكري في دراستنا يزيد من إنتاج الجذور الحرة، ويمكن أن يقوم بالتقليل من الدفاعات الطبيعية المضادة للأكسدة الطبيعية مثل الكتلاز.

**الكلمات المفتاحية :** مرض السكري من النوع 1، الدفاع التأكسدي، الكتلاز، ارتفاع السكر في الدم، أكسيد النيتريك، المالون ثنائي الألدريد، الجذور الحرة.

## ABSTRACT

This study was conducted to evaluate in patients with type 1 diabetes (T1D), plasma catalase activity, a key enzyme of the oxidative defense.

Measurement of catalase activity and the levels of malondialdehyde (MDA) and nitric oxide and (NO) in plasma were made in 22 type 1 diabetic subjects and 23 healthy subjects. This population was selected and collected to the laboratory of public health establishment "of SALEM Messaoud OuledYaïch of BLIDA".

Our study has shown that Type 1 diabetes occurs in individuals whose average age is  $36.54 \pm 1.97$  years with a female predominance. Our results also show that the levels of catalase activity are very lower in type 1 diabetics compared to controls. Indeed, hyperglycemia ( $> 1.26$  g / l) is marked by lower values of catalase activity. In contrast, the average concentrations of NO and MDA in type 1 diabetics are high compared to controls. In addition, regression analysis of catalase in diabetics showed a strong positive correlation between the MDA and the glycated hemoglobin with respective values  $r = 0.99$   $r = + 0.72$ ,  $\alpha < 0.05$ . So the correlation is weakly positive between fasting glucose and insulin with respective values  $r = + 0.31593$   $r = 0.13791$  +,  $\alpha < 0.05$ .

Chronic hyperglycemia in diabetes in our study is in favor of an increased production of free radicals and thus may help reduce natural antioxidant defense such as catalase.

**Keywords:** Type 1 diabetes, antioxidant defense, catalase, hyperglycemia, NO, MDA, free radicals.

# Sommaire

<b>Introduction.....</b>	<b>01</b>
--------------------------	-----------

## **I. Rappel bibliographique**

I.1. Stress oxydant.....	02
I.1.1. Définition.....	02
I.1.2. Radicaux libres.....	02
I.1.2.1. Cibles biologiques des espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	04
I.1.3. Système de défense antioxydant.....	07
I.1.3.1. Définition.....	07
I.1.3.2. Catalase.....	08
I.2. Diabète type 1, l'hyperglycémie et stress oxydant.....	09
I.2.1. Diabète sucré.....	09
I.2.1.1. Diabète type 1.....	10
I.2.1.2. Déroulement de la réaction auto-immune.....	10
I.2.2. Régulation de la glycémie.....	11
I.2.2.1. L'insuline.....	12
I.2.2.2. Voies de signalisation intracellulaire de l'insuline.....	12
I.2.2.3. Rôle des radicaux libres dans la signalisation d'insuline.....	13
I.2.3. Impact du stress oxydant et l'hyperglycémie sur les cellules $\beta$ et l'action de l'insuline.....	14
I.2.4. Mécanismes impliqués dans la genèse d'un stress oxydant dans le diabète.....	15

## **II. Matériel et méthodes**

II.1. Matériel.....	18
II.1.1. Matériel non biologique.....	18
II.1.2. Matériel biologique.....	18
II.2. Méthode de l'étude.....	18
II.2.1. Paramètre biochimique.....	19
II.2.1.1. Dosage du glucose sanguin (la glycémie).....	19
II.2.1.2. Dosage de l'hémoglobine glyquée (HbA1c).....	20

II.2.1.3. Dosage des protéines totales (Méthode de Bradford).....	21
II.2.1.4. Dosage du peptide C et de l'insuline.....	22
II.2.2. Paramètre du stress oxydant .....	23
II.2.2.1. Dosage de la catalase.....	23
II.2.2.2. Dosage du malondialdehyde.....	24
II.2.2.3. Dosage du monoxyde d'azote.....	25
II.3. Analyse statistique.....	25

### **III. Résultats et discussion**

III.1. Résultats.....	27
III.1.1. Étude descriptive des caractéristiques cliniques et épidémiologiques de la population.....	27
III.1.2. Exploration du statut oxydatif.....	28
III.1.2.1. Etude de la variation des taux de la catalase.....	28
III.1.2.2. Evaluation du taux de MDA.....	33
III.1.2.3. Evaluation du taux du monoxyde d'azote.....	33
III.2. Discussion.....	35
III.2.1. Étude descriptive des caractéristiques cliniques et épidémiologiques de la population.....	35
III.2.2. Exploration du statut oxydatif.....	35
III.2.2.1. Estimation des taux de la catalase chez les diabétiques de type1 et les témoins....	35
III.2.2.2. Étude de l'activité de la catalase en fonction de la durée du diabète type1.....	37
III.2.2.3. Étude de l'activité de la catalase en fonction de l'hémoglobine glyquée.....	37
III.2.2.4. Étude de l'activité de la catalase en fonction des taux du peptide C.....	39
III.2.2.5. Étude de la variation des taux de la catalase en fonction des taux de la glycémie.	39
III.2.2.6. Evaluation de la peroxydation lipidique.....	40
III.2.2.7. Evaluation du taux du monoxyde d'azote.....	41
<b>Conclusion.....</b>	<b>43</b>

Référence bibliographique

Annexes

# Introduction

## Introduction

---

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

L'état d'hyperglycémie chronique conduit à un stress oxydant, c'est-à-dire un déséquilibre entre pro-oxydants et antioxydants au profit des premiers. Il est intéressant de souligner que, si l'hyperglycémie chronique est bien à l'origine d'un stress oxydant, ce dernier pourrait être aussi à l'origine du diabète de type 1 par un phénomène d'apoptose des cellules bêta pancréatiques (**BONNEFONT-ROUSSELOT *et al.*, 2004**).

Un stress oxydant a été mis en évidence dans le diabète de type 1 par plusieurs auteurs. Les marqueurs biologiques utilisés montrent une oxydation accrue des cibles cellulaires et/ou une baisse des systèmes de défense antioxydants. (**BONNEFONT-ROUSSELOT *et al.*, 2004**). Parmi les espèces radicalaires oxygénées, on trouve le peroxyde d'oxygène, ou  $H_2O_2$ , qui peut être converti en oxygène  $O_2$  et en eau  $H_2O$  par la catalase.

Le diabète a longtemps été considéré comme une maladie propre aux pays riches ; cependant il touche actuellement largement les pays en voie de développement, et même les couches sociales les plus défavorisées (**ARBOUCH-LEZOUL, 2007**). Il est devenu un problème majeur de santé publique, dans le monde, au cours de ces dernières décennies.

Ainsi, en Algérie, la prévalence de cette maladie est en augmentation dans les populations urbaines et rurales (**ZAOUI *et al.*, 2007**).

Cependant, le mode de vie, sur la base d'un bilan sanguin perturbé, nous pousse à connaître le statut en antioxydants d'un individu. En effet, ceux-ci va nous permettre de prévenir et corriger les déficiences métaboliques et les complications chez le diabétiques.

Dans ce cadre, notre travail vise essentiellement à rechercher l'intérêt de l'évaluation des taux de la catalase chez le diabétique de type 1 et de chercher la corrélation entre le taux de la catalase et de quelques paramètres métaboliques (Glycémie, Hémoglobine glyquée, peptide-C) ainsi que d'autres paramètres du stress oxydatif (Malondialdehyde, Monoxyde d'azote) qui peuvent être associés au diabète type 1 lors d'un stress.

# Rappels bibliographiques

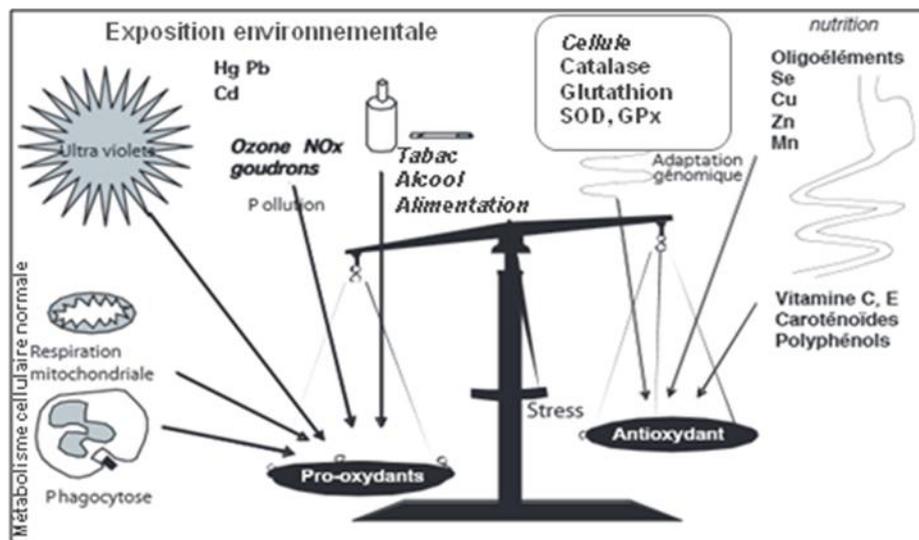
## I.1. Stress oxydant

### I.1.1. Définition

Un stress oxydant se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre antioxydants et pro-oxydants (**Figure 1**) en faveur de ces derniers (**PINCEMAIL *et al.*, 1999 ; HALENG *et al.*, 2007**).

Cette situation peut résulter d'un dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale, d'une activation des systèmes enzymatiques (xanthine oxydase, NADPH oxydase, glucose oxydase...), d'une libération de fer libre à partir des protéines chélatrices (ferritine) ou d'une oxydation de certaines molécules (glucose, hémoglobine, catécholamines, ...) (**PINCEMAIL *et al.*, 2002**).

L'organisme se retrouvera donc dans une situation où il ne peut plus contrôler la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques (**HALENG *et al.*, 2007**).



**Figure 1:** La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants (**FAVIER, 2006**)

### I.1.2. Radicaux libres

Un radical libre est un atome ou molécule chimique capable d'avoir une existence indépendante « libre », en contenant un ou plusieurs électrons célibataires sur leur couche externe, cela lui confère une grande réactivité et une demi-vie très courte. Ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé (**GOUDABLE et FAVIER, 1997**).

## Rappels bibliographiques

Dans les circonstances quotidiennes normales, les radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité (**BAROUKI, 2006**) car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable (**FAVIER, 2003**). L'inflammation est par ailleurs une source importante de ces radicaux qui produits directement par les cellules phagocytaires activées (**FAVIER, 2003**).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN) (**Tableau I**). Celles-ci sont composées en grande partie de radicaux libres, et de molécules non-radicalaires peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mais néanmoins oxydantes (**Tableau I**) (**FAVIER, 2003 ; MALARDE, 2012**).

**Tableau I :** Les principales espèces réactives d'oxygènes et d'azotes radicalaires et non radicalaires

	Radicalaires	Non radicalaires
<b>Espèces réactives d'oxygènes</b>	Anion superoxyde O <sub>2</sub> <sup>°-</sup> Radical hydroxyle °OH Radical peroxyde ROO <sup>°</sup> Alkoxyde RO <sup>°</sup>	Peroxyde d'hydrogène H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Acide hypochloreux HClO Ozone O <sub>3</sub> Oxygène singulet <sup>1</sup> O <sub>2</sub>
<b>Espèces réactives d'azotes</b>	Monoxyde d'azote NO <sup>°</sup> Acide nitreux HNO <sub>2</sub>	Peroxynitrite ONOO <sup>-</sup> Nitrique dioxyde NO <sub>2</sub>
<b>Espèces soufrées actives</b>	Radical thiyl RS <sup>·</sup> Radical sulfanyl RSO <sup>·</sup> Radical sulfonyle RSSO <sup>·</sup> Radical anion disulfure RSSR <sup>-·</sup>	Acide sulfénique RSOH

(**BONINI et AUGUSTO, 2001; ADLY, 2010**)

Dans notre étude nous s'intéressons à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, qui est une molécule de signalisation conduisant à la prolifération cellulaire ou à la mort cellulaire (**PACKER et al., 2000**). L'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est produite en grande partie à partir du radical superoxyde en présence de superoxyde dismutase SOD qui catalyse la réaction (1).



## Rappels bibliographiques

---

Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est un produit plus stable que les radicaux superoxydes, c'est pourquoi il diffuse très facilement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule (**GOUDABLE et FAVIER, 1997**). Sa concentration est régulée par des enzymes telles que la catalase (**GARDÈS-ALBERT *et al.*, 2003**).

D'après **GARDÈS-ALBERT *et al.* (2003)**, la majeure partie de la toxicité de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle en présence de cations métalliques tels que Fe<sup>2+</sup> par une réaction (2), dite de Fenton.



Les radicaux hydroxyles sont les espèces les plus agressives et donc les plus dommageables du stress oxydant (**GARDÈS-ALBERT *et al.*, 2003**) car il peut initier une peroxydation lipidique (**GOUDABLE et FAVIER, 1997**).

Une autre espèce radicalaire, le monoxyde d'azote (NO), est elle aussi produite par les systèmes enzymatiques que sont les différentes NO synthèses (NOS) (**FAVIER, 2003**). En cas d'excès du NO, celui-ci réagit avec le superoxyde pour produire le peroxynitrite ONOO<sup>-</sup> qui est très dommageable (**PACKER *et al.*, 2000 ; BEAUVIEUX *et al.*, 2002 ; HAJ MOUHAMED *et al.*, 2012**).

### I.1.2.1. Cibles biologiques des espèces réactives de l'oxygène (ERO)

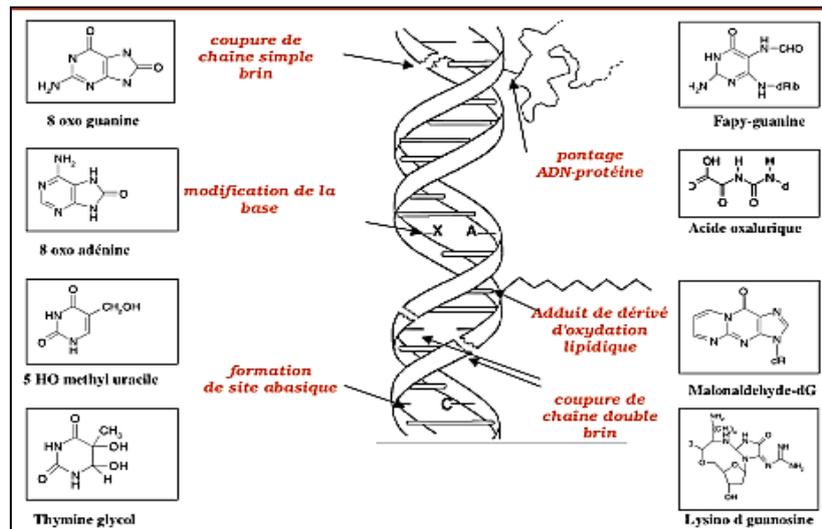
La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation des glucides, de l'ADN, des protéines, et des lipides) (**FAVIER, 2003**) :

#### a) Oxydation du glucose

En présence de métaux de transition comme le fer, le glucose s'oxyde, entraînant la génération d'espèces réactives d'oxygènes, mais aussi la production de la forme aldéhyde du glucose, le glyoxal. Cette molécule se fixe rapidement sur les protéines dans lesquelles apparaît un résidu carboxyméthyllysine (CML). Ce groupement capte facilement le cuivre, ce qui provoque le déclenchement de réactions de type Fenton avec production de radicaux libres : il s'ensuit une augmentation de la peroxydation lipidique. Ce mécanisme pourrait expliquer pourquoi le diabète est souvent associé à des complications cardio-vasculaires (**HALENG, 2007**).

## b) Oxydation des acides nucléiques

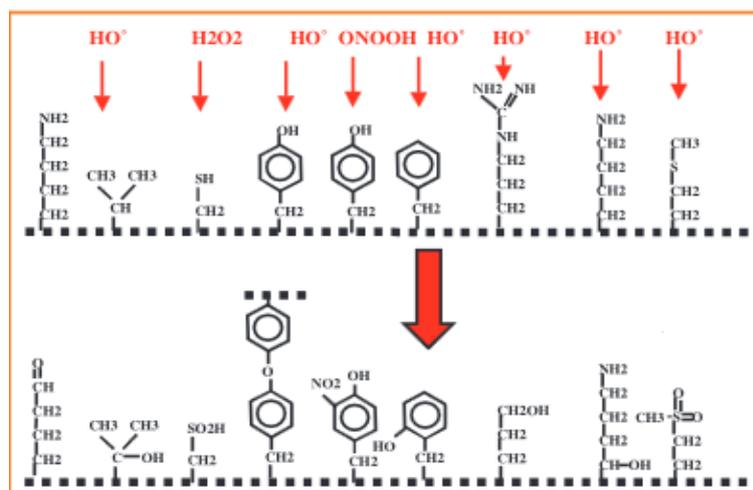
L'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. Au bas mot, cinq classes principales de dommages oxydatifs médie par  $\text{OH}^\bullet$  et  $\text{O}_2^{\bullet-}$  peuvent être générées. Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténares, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines (**Figure 2**) (**FAVIER, 2003**).



**Figure 2** : Lésion de l'ADN formées par attaque radicalaires du patrimoine génétique de la cellule (**FAVIER, 2003**)

## c) Oxydation des protéines

Les modifications des structures primaire, secondaire et tertiaire des protéines par les ERO sont à la base de la formation de dérivés protéiques carbonylés via plusieurs mécanismes incluant la fragmentation et l'oxydation des acides aminés (**BEAUVIEUX *et al.*, 2002** ; **PAINCEMAIL *et al.*, 2009**).



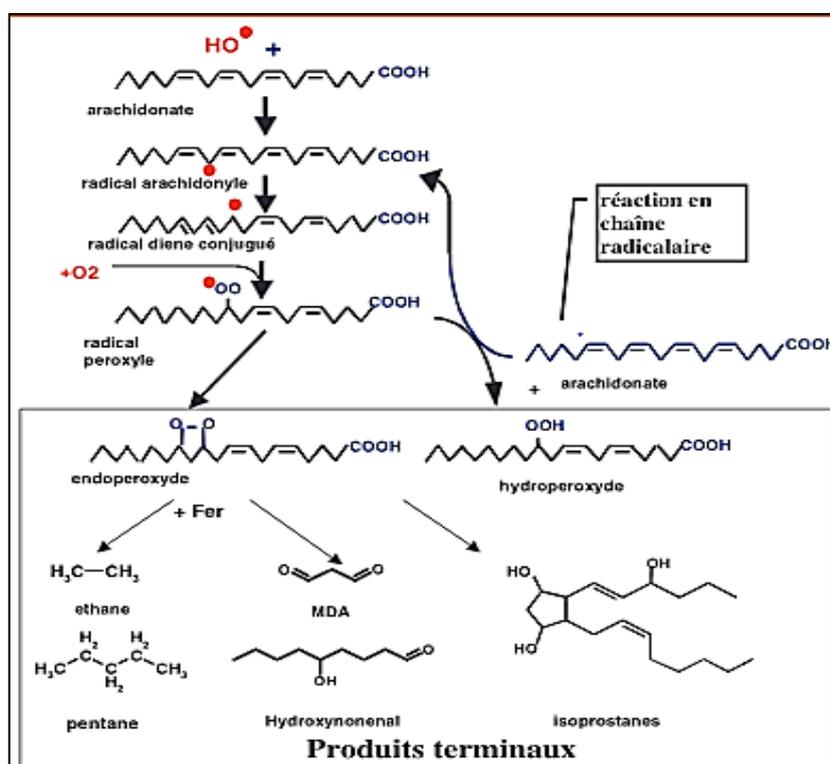
**Figure 3** : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaires (**FAVIER, 2003**)

## Rappels bibliographiques

Ces dérivés carbonylés peuvent être mis en évidence par dinitrophényl-hydrazone (DNPH) dans des échantillons biologiques par spectrophotométrie ou technique HPLC (PAINCEMAIL *et al.*, 2009) (Figure 3).

### d) Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est un phénomène général qui se produit dès la présence de l'oxygène. Cette réaction se déroule en trois étapes (Figure 4) : initiation, propagation, terminaison (CILLARD et CILLARD, 2006). Les acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle (FAVIER, 2003).



**Figure 4 :** Mécanisme de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et natures des produits terminaux (FAVIER, 2003)

Les produits de peroxydation lipidique, comme le dialdéhyde malonique (MDA) et le 4-hydroxynonanal, ou les aldéhydes réactifs comme le méthyl glyoxal (MGO), peuvent se fixer sur les protéines pour amplifier les lésions de glycoxydation (GILLERY, 2006).

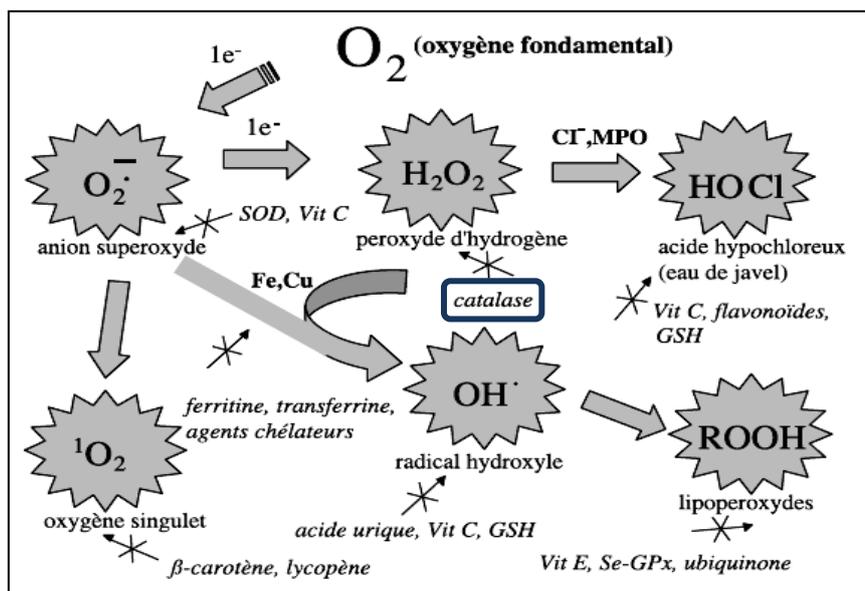
Compte tenu du caractère toxique de des radicaux libres, l'organisme a mis en place des systèmes de défense (cellulaires, membranaires et extracellulaires) pour se protéger de leur attaque : ce sont les antioxydants (RACCAH, 2004 ; HALENG *et al.*, 2007).

### I.1.3. Système de défense antioxydant

#### I.1.3.1. Définition

HALLIWELL et GUTTERIDHE définissent l'antioxydant comme « toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat » (PACKER *et al.*, 2000 ; BONNEFONT-ROUSSELOT, 2007).

Il existe deux sources de défenses antioxydantes (Figure 5) : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque ; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (SOD, GPx, catalase, Glucose-6-phosphate déshydrogénase) et de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine). A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes (HALENG *et al.*, 2007 ; PINCEMAIL *et al.*, 2009).



**Figure 5** : Aperçu des différentes espèces oxygénées activées et des antioxydants régulateurs de leur production (HALENG *et al.*, 2007)

Les antioxydant exogènes et endogènes protègent les tissus biologiques des dommages des radicaux libres (PACKER *et al.*, 2000), mais leur diminution contribue à l'apparition d'un stress oxydant dans ces tissus (BONNEFONT-ROUSSELOT, 2003).

Parmi ces antioxydants nous nous intéressent à la catalase, qui est une enzyme central dans la défense contre les dommages oxydatifs (PUTNAM *et al.*, 2000).

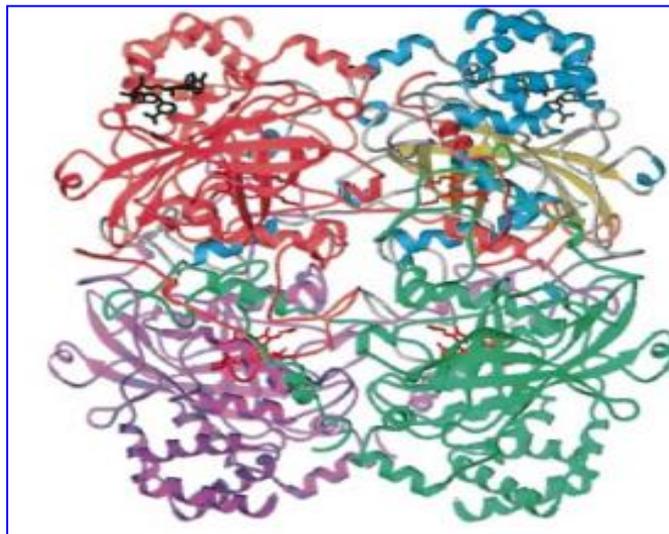
### I.1.3.2. Catalase

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).

#### ➤ Structure de la catalase

La catalase est une enzyme tétramérique (Figure 6) d'environ 60 kDa pour chaque sous-unité ; chacune possède 527 résidus d'acide aminé et un groupe hème avec le fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (GÓTH et NAGY, 2013). La catalase est liée au NADPH qui la protège et améliore son activité (ICHAÏ *et al.*, 2011).



**Figure 6** : La structure de la catalase

(PUTNAM *et al.*, 2000)

#### ➤ Fonction de la catalase

La catalase est responsable de la détoxification du  $\text{H}_2\text{O}_2$  produit dans les conditions physiologiques.

La catalase des globules rouges semble être le principal régulateur des deux concentrations du  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracellulaire et extracellulaire (GÓTH et NAGY, 2013) et peut agir pour protéger l'hémoglobine des érythrocytes humains, qui sont exposées à des concentrations importantes d'oxygène (PUTNAM *et al.*, 2000), et d'autres tissus contre le stress oxydant (GÓTH et NAGY, 2013).

## Rappels bibliographiques

---

Elle a également été impliqué comme un facteur important dans l'inflammation (**PUTNAM *et al.*, 2000**).

La catalase transforme le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en oxygène et eau, diminuant ainsi sa demi-vie et atténuant de ce fait la génération de radicaux hydroxyyles selon la réaction (3) suivante (**ICHAÏ *et al.*, 2011**) :



Elles n'éliminent pas la totalité du peroxyde d'hydrogène, mais leur rôle est très important surtout en présence d'ions ferreux en permettant d'éliminer son excès afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier (**GOUDABLE et FAVIER, 1997**).

En cas de carence de la catalase, qui due à la dépression de la transcription du gène de la catalase (**SATO *et al.*, 1992**), la concentration à l'état stable du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut augmenter conduisant à des dommages oxydatifs au niveau des cellules. Ces dommages oxydant représentent probablement un facteur de risque pour plusieurs maladies, dont le diabète sucré (**PUTNAM *et al.*, 2000 ; GÓTH et NAGY, 2013**).

En outre, le stress oxydatif dû à une carence de la catalase pourrait contribuer à la manifestation du diabète (**GÓTH et NAGY, 2013**).

### **I.2. Diabète type 1, hyperglycémie et stress oxydatif**

#### **I.2.1. Diabète sucré**

Le diabète sucré est un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une hyperglycémie chronique résultant d'un défaut de la sécrétion de l'insuline ou de l'action de l'insuline ou de ces deux anomalies associées (**DROUIN *et al.*, 1999 ; LAZO-DE-LA-VEGA-MONROY et FERNÁNDEZ-MEJÍA, 2013**).

Selon les critères actuels, le diabète sucré est défini par une glycémie plasmatique à jeun supérieure à 1,26 g/L (7 mmol/l) ou glycémie supérieure à 2 g/l (11,1 mmol/l) quelque soit l'heure du prélèvement (**RODIER, 2001 ; BOUHOURS-NOUET et COUTANT, 2005 ; ORBAN et ICHAI, 2008**).

### I.2.1.1. Diabète type 1

Le DT1 est une maladie multifactorielle complexe (MANDRUP-POULSEN, 2003). Dans la plupart des cas, elle est liée à la rencontre d'une susceptibilité génétique et de facteurs d'environnement (RODIER, 2001 ; BUYSSCHAERT, 2006).

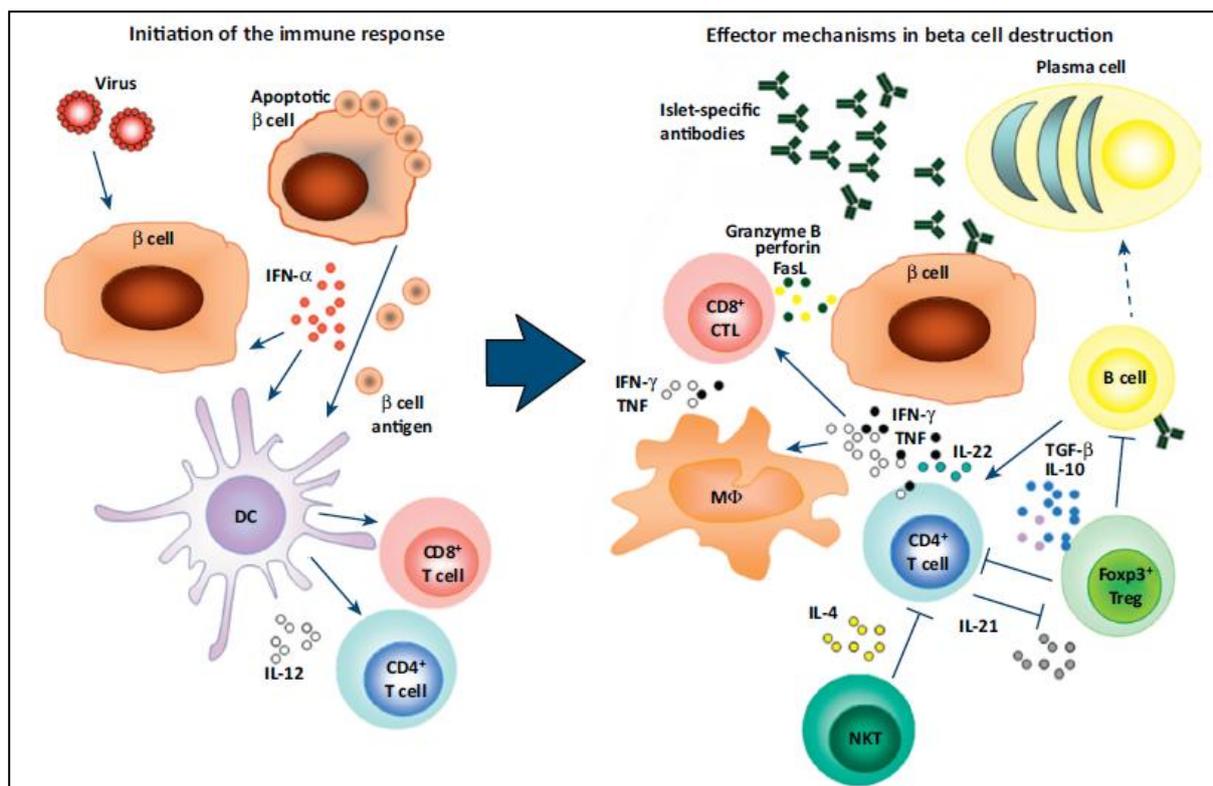
Le DT1 est la conséquence d'une destruction des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans par un processus auto-immun (DUBOIS-LAFORGUE, 2007 ; WALLBERG et COOK, 2013), aboutissant habituellement à une carence absolue en insuline (PERLEMUTER *et al.*, 2000 ; WEILL et BATTEUX, 2003).

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

### I.2.1.2. Déroulement de la réaction auto-immune

La destruction des cellules  $\beta$  résulte d'une combinaison des mécanismes spécifiques de l'antigène (la destruction à médiation de lymphocytes T CD4 et CD8) (MANDRUP-POULSEN, 2003), dans lesquels la cellule présentatrice présente des peptides antigéniques aux lymphocytes TCD4 (**Figure 7**) conduisant ensuite à l'activation de deux types cellulaires, selon les cytokines produites: l'activation de lymphocytes B avec production d'anti-corps et l'activation de lymphocytes CD8 cytotoxiques qui produisent de perforines et de granzymes (DUBOIS-LAFORGUE, 2007).

Et des mécanismes non spécifiques de l'antigène (MANDRUP-POULSEN, 2003), dans lesquels il y a production de cytokines inflammatoires telles le TNF  $\alpha$ , par les macrophages, et des espèces réactives de l'oxygène ainsi que par l'interaction Fas-FasL conduisant à l'apoptose des cellules bêta (MANDRUP-POULSEN, 2003).



**Figure 7** : Mécanisme immunitaire de destruction des cellules  $\beta$   
(WALLBERG et COOK, 2013)

### I.2.2. Régulation de la glycémie

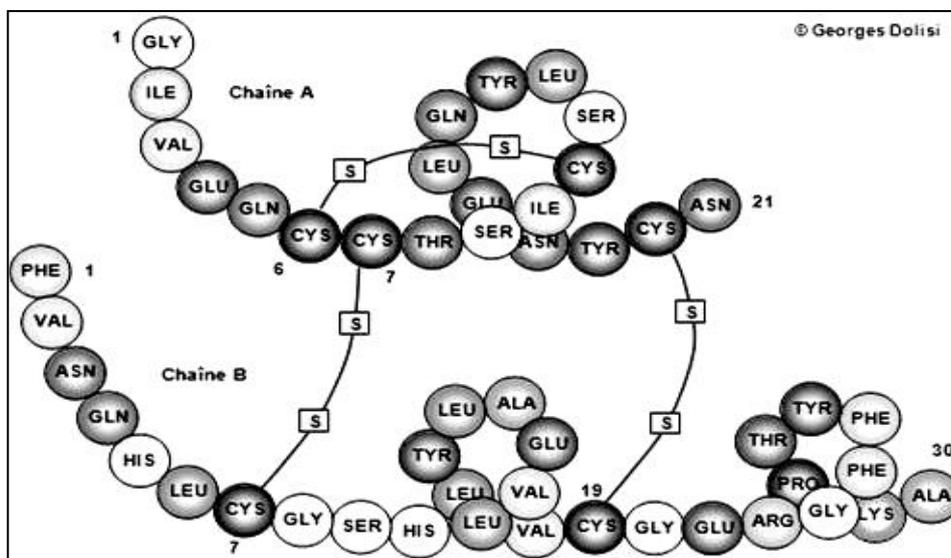
Au centre de tout le métabolisme énergétique comme celle du glucose, la signalisation des radicaux libres représente un élément extrêmement important. Ce signal est modulé par tous les éléments qui touchent le métabolisme énergétique, en particulier l'oxydation des substrats, qu'ils soient glucidiques ou lipidiques (LEVERVE, 2006).

L'équilibre glycémique joue un rôle très important dans la balance pro-oxydants/antioxydants (GARDÈS-ALBERT *et al.*, 2003; PINCEMAIL *et al.*, 2002).

Le métabolisme du glucose est régulé principalement par l'équilibre entre les hormones cataboliques, ou hormones de stress (glucagon, adrénaline, cortisol, hormone de croissance) d'une part et l'insuline d'autre part (SEEMATTER *et al.*, 2009). Ce dernier augmente l'utilisation de glucose et inhibe la synthèse de novo du glucose (BOUGLE et ANNANE, 2009).

### I.2.2.1. L'insuline

L'insuline est la seule hormone hypoglycémisante de l'organisme. Elle est sécrétée par les cellules  $\beta$  du pancréas endocrine et participe au contrôle du métabolisme énergétique, en particulier, du métabolisme du glucose. La molécule d'insuline est un polypeptide d'un poids moléculaire d'environ 6 kDa. C'est un hétéro-dimère (**Figure 8**) constitué de deux chaînes polypeptidiques, la chaîne A (21 acides aminés) avec un pont disulfure intra-caténaire reliant les acides aminés 6 et 11 et la chaîne B (30 acides aminés), reliées entre elles par deux ponts disulfures. Le gène de l'insuline humaine est situé sur le bras court du chromosome 11 (**MAGNAN et KTORZA, 2005**).



**Figure 8** : Schéma de la molécule d'insuline  
(**MALARDE, 2012**)

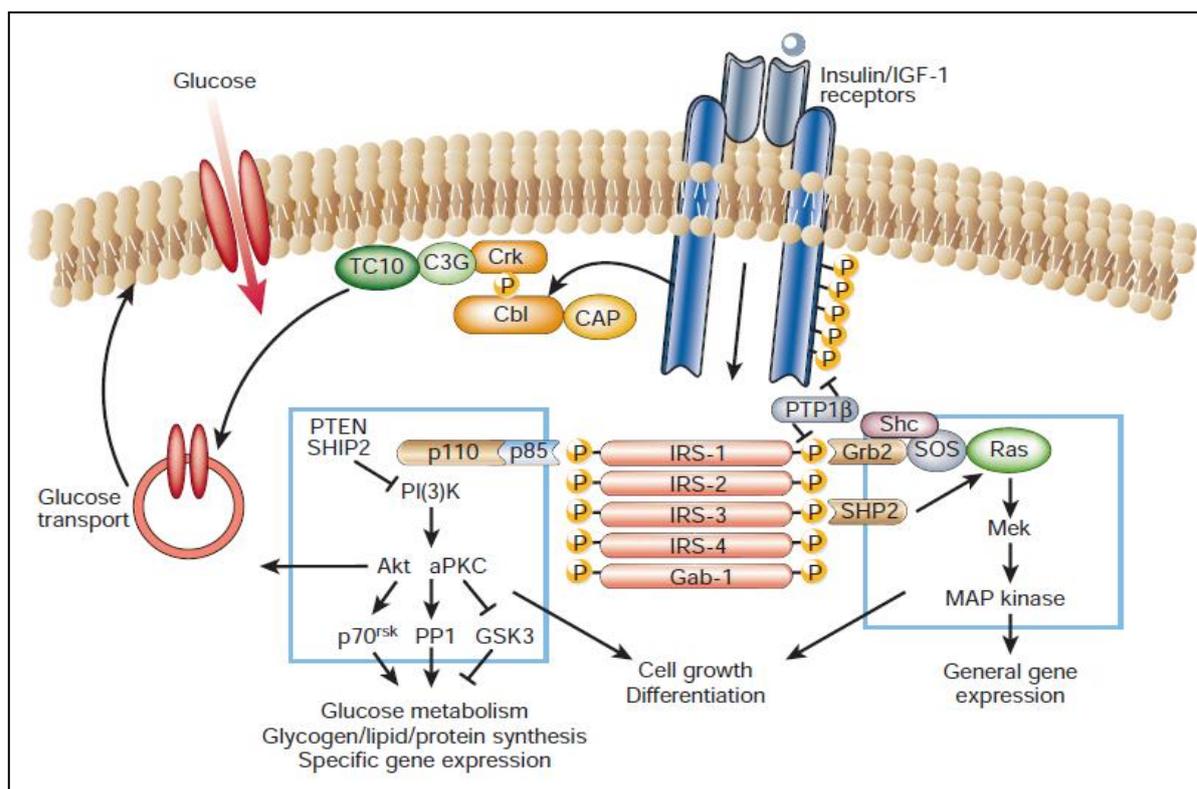
### I.2.2.2. Voies de signalisation intracellulaire de l'insuline

La liaison de l'insuline à son récepteur, qui appartient à la superfamille des récepteurs à tyrosine kinase (RTKs) (**RIANT, 2009**), induit des changements morphologiques de celui-ci, déclenchant l'activité tyrosine kinase intrinsèque (**BOUGLE et ANNANE, 2009**), ce qui permet l'autophosphorylation de la sous-unité  $\beta$  sur des résidus tyrosine (Tyr-P) (**ANDREELLI et al., 2006**) et l'activation de deux grandes voies d'activation intracellulaire (**Figure 9**).

La première voie est celle de la cascade MAP kinase appelée la voie du signal de croissance (growth signal). Dans cette voie, l'association du IR avec les protéines SHC et Grb2 aboutit à l'activation des molécules impliquées dans la prolifération cellulaire et l'apoptose.

## Rappels bibliographiques

La seconde voie est celle liée à l'IRS. Les IR trans-phosphorylent plusieurs substrats dont IRS1 à 4, Gab 1, Cbl. Cette première série d'évènements aboutit à l'activation en aval d'autres molécules de signalisation comme la PI3-kinase (BOUGLE et ANNANE, 2009) qui joue un rôle essentiel dans le transport du glucose via l'activation de la kinase Akt/PKB, laquelle stimule la translocation membranaire des transporteurs de glucose GLUT4 (DE MEYTS, 2005).



**Figure 9 :** Voies de signalisation intracellulaires du récepteur à l'insuline

(SALTIEL et KAHN, 2001)

### I.2.2.3. Rôle des radicaux libres dans la signalisation d'insuline

Bien qu'une production excessive des ERO soit associée au développement de diverses pathologies, des concentrations physiologiques faibles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont nécessaires pour le fonctionnement cellulaire normal et la signalisation intracellulaire.

Les facteurs de croissance et les hormones peuvent ainsi favoriser la génération transitoire de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ce qui est essentiel pour une phosphorylation optimale sur résidu tyrosine des voies de signalisation. Les cibles principales de ces ERO sont les protéines tyrosine phosphatases (PTP), telles que la PTP1B qui dephosphoryle les IRS, et la PTEN qui dephosphoryle le PIP3. Ces enzymes qui régulent la sensibilité à l'insuline et l'homéostasie

du glucose, sont transitoirement oxydées par  $H_2O_2$  en réponse à l'insuline ce qui favorise l'activation de l'IR et de la PI3K (**PILLON, 2010**).

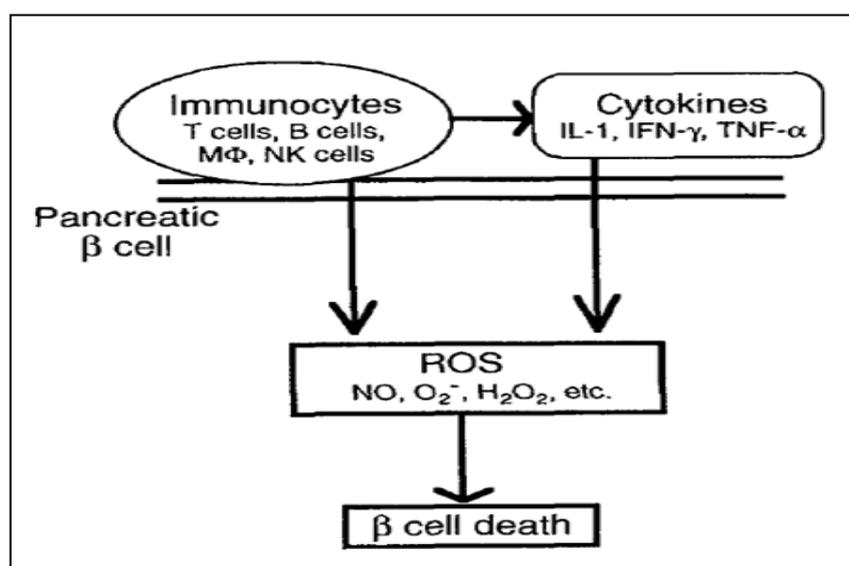
### I.2.3. Impact du stress oxydant et l'hyperglycémie sur les cellules $\beta$ et l'action de l'insuline

Chez les sujets dont la tolérance au glucose est normale ou peu altérée, jusqu'à une valeur de 1,30 g/l, l'insulinémie croît avec la glycémie. Au-delà de cette valeur, l'insulino-sécrétion diminue, même si la glycémie augmente. Ce seuil de transition marque l'incapacité de la cellule  $\beta$  à s'adapter à l'hyperglycémie, ce qui est le cas dans le diabète (**PILLON, 2010**).

Et d'après **LEVERVE (2006)** l'hyperglycémie est l'un des liens directs avec la production de radicaux libres et la gestion du stress oxydant mitochondrial.

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**).

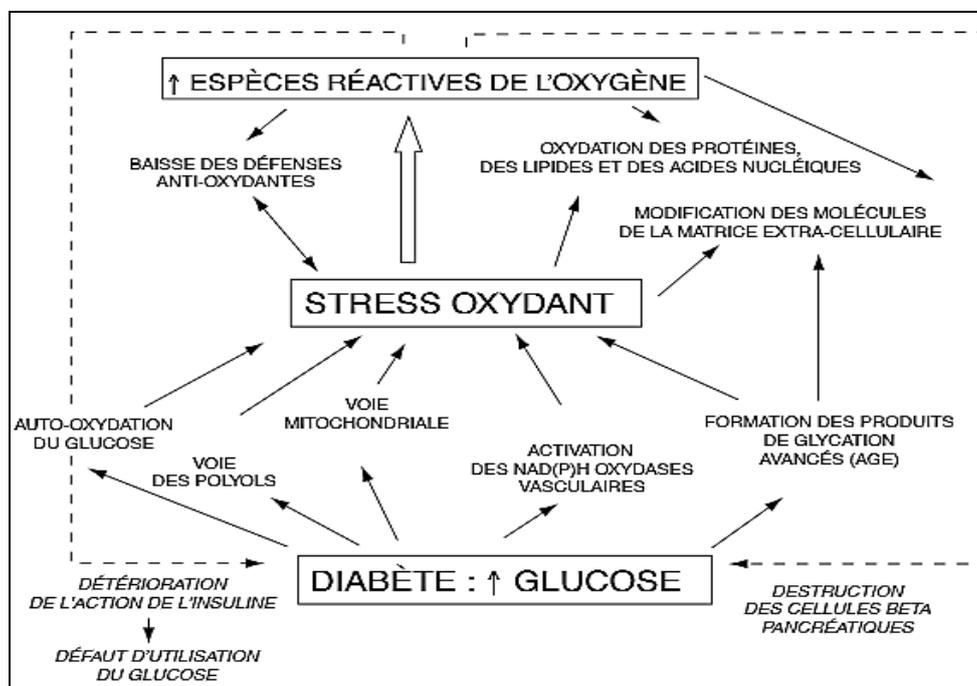
Les cellules bêta pancréatiques sont particulièrement sensibles aux ERO et ERN, qui jouent un rôle essentiel dans la stimulation des réponses inflammatoires et la destruction des cellules bêta par apoptose (**Figure 10**), parce que leurs défenses antioxydantes naturelles sont plus faibles par rapport à d'autres tissus, qui augmente encore le stress oxydatif (**LAZO-DE-LA-VEGA-MONROY et FERNÁNDEZ-MEJÍA, 2013**).



**Figure 10** : Mécanisme de destruction des cellules  $\beta$  par apoptose induit par le stress oxydant dans le DT 1

(**PACKER et al., 2000**)

Il est intéressant de souligner que, si l'hyperglycémie chronique est bien à l'origine d'un stress oxydant, ce dernier pourrait être aussi à l'origine du diabète de type 1 par le phénomène d'apoptose des cellules bêta pancréatiques (**Figure11**) (**BONNEFONT-ROUSSELOT *et al.*, 2004**).



**Figure 11** : Relation entre l'hyperglycémie et le stress oxydant

(**BONNEFONT-ROUSSELOT *et al.*, 2004**)

### I.2.4. Mécanismes impliqués dans la genèse d'un stress oxydant dans le diabète

En termes simples, le niveau élevé de la glycémie a comme traduction immédiate la production de radicaux libres qui d'une part réduisent l'activité d'une des enzymes de la voie de glycolyse, la glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH), et d'autre part inhibait la première étape de la voie des pentoses qui est caractérisé par la production de NADPH, qui a un rôle majeur dans la lutte contre le stress oxydant (**LEVERVE, 2006**). Ces deux voies de métabolisme du glucose ne suffisent pas à réduire leur concentration intracellulaire (**DENIS, 2002**), et donc le flux de glucose va, de ce fait, être dévié vers une autre voie métabolique (**LEVERVE, 2006**).

D'après **DELATTRE *et al.* (1999)** ; **BONNEFONT-ROUSSELOT *et al.* (2004)** plusieurs mécanismes biochimiques semblent impliqués dans le développement d'un stress oxydant en présence de concentrations élevées en glucose (**Figure 12**) :

### a) Voie des polyols

En présence d'un excès de glucose, une fraction non oxydée de ce substrat est dirigée vers la voie des polyols. Sous l'effet de l'aldose réductase, le glucose est réduit en sorbitol en présence du NADPH. Le sorbitol est ensuite oxydé en fructose en présence de NAD<sup>+</sup> par la sorbitol-déshydrogénase (**RACCAH, 2004**).

En outre, les taux cellulaires de NADPH, coenzyme nécessaire à l'activité de la glutathion réductase (régénération du GSH) ainsi qu'à l'activité de la NO-synthase, diminuent, avec pour conséquence une diminution des capacités antioxydantes (**HALENG *et al.*, 2007**).

### b) Voie des hexosamines

La voie de la hexosamine induit la formation de UDP-N-acétylglucosamine (UDP-GlcNac) par l'enzyme glucosamine fructose amido-transférase (GFAT) à partir du fructose-6-phosphate (**DENIS, 2002 ; LOSSER *et al.*, 2009**).

La voie de l'hexosamine conduit à une partie des effets transcriptionnels (activation de l'expression de gènes) qui contribuent au développement des complications diabétiques (**LEVERVE, 2006**).

### c) L'activation de la protéine kinase C (PKC)

L'hyperglycémie intracellulaire augmente la synthèse de DAG qui active différentes isoformes de la PKC. L'activation de la PKC a des effets sur l'expression de nombreux gènes et altère le fonctionnement de plusieurs réponses physiologiques (**COLAS, 2010**).

De plus, de fortes concentrations de glucose peuvent stimuler la production d'ERO en activant la NAD(P)H oxydase par une voie dépendante de la PKC (**BONNEFONT-ROUSSELOT *et al.*, 2004**).

### d) Glycation des protéines

L'hyperglycémie augmente l'intensité des réactions dites de glycation non enzymatique des protéines, (**GILLERY, 2006**). Elle intéresse évidemment toutes les protéines de l'organisme (**PERLEMUTER *et al.*, 2000**).

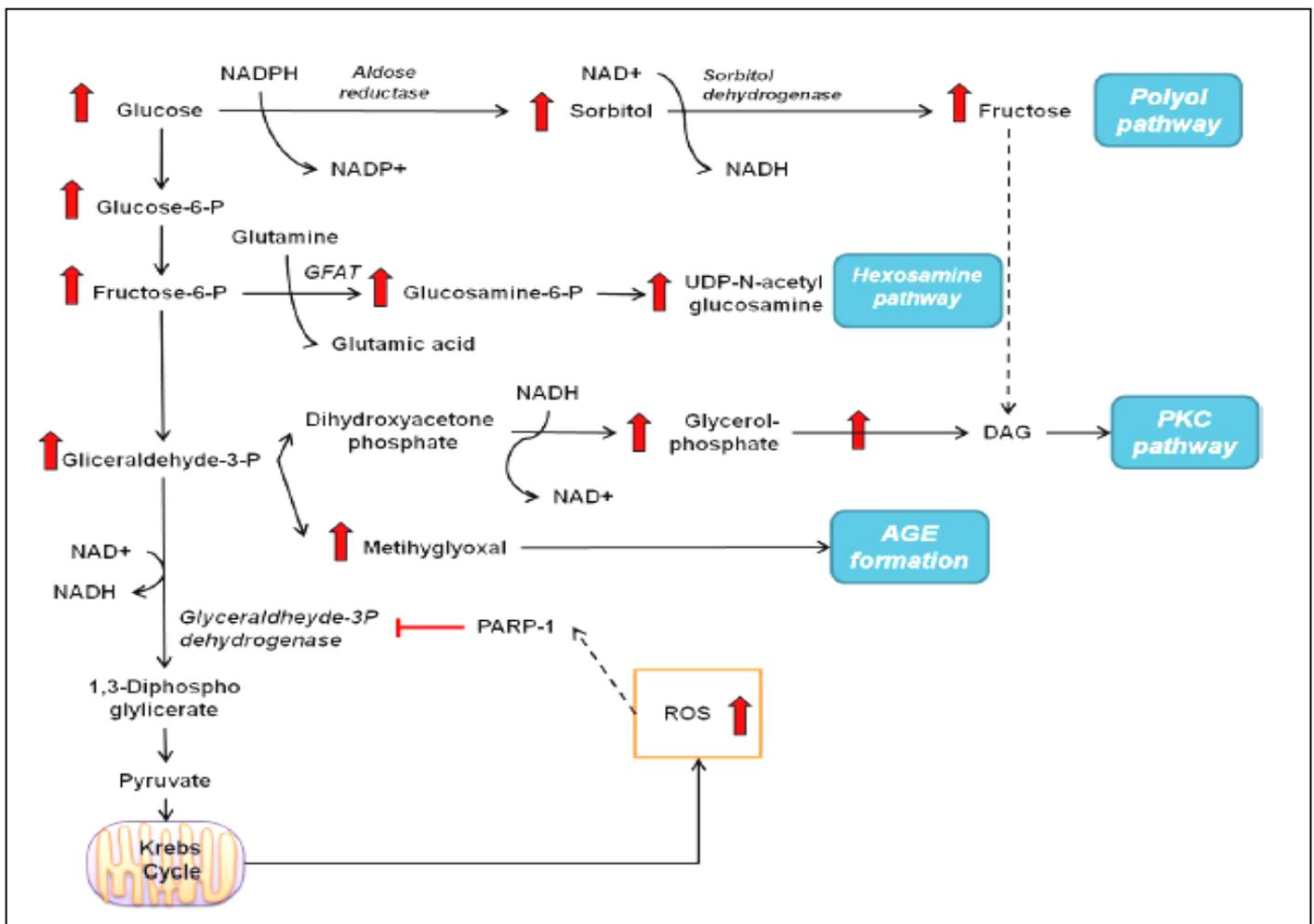
Cette réaction résulte de la formation d'une liaison covalente entre la fonction aldéhydique du glucose et les groupements amines libres des protéines. Elle comporte plusieurs étapes, avec une formation précoce de produits appelés produits d'Amadori, suivie de la production d'intermédiaires réactifs aboutissant à des composés complexes, dénommés

## Rappels bibliographiques

produits de glycation avancée (AGE) ou produits de Maillard (**BONNEFONT-ROUSSELOT *et al.*, 2004**).

Les AGE peuvent modifier le fonctionnement de certaines cellules (macrophages, cellules endothéliales) soit par le biais des modifications matricielles, soit directement en activant des récepteurs cellulaires aux AGE, appelé receptor for advanced glycation end products (RAGE).

La fixation des AGE sur RAGE déclenche une signalisation entraînant un stress oxydant intracellulaire (**GILLERY, 2006**). Même ils induisent aussi un état inflammatoire en activant le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, la production de TNF $\alpha$ , ou via les molécules pro-inflammatoires de type S100 (calgranulines et amphoterin) (**LOSSER *et al.*, 2009**).



**Figure 12 :** Voies oxydatives de stress dans le diabète sucré  
(LAZO-DE-LA-VEGA-MONROY et FERNÁNDEZ-MEJÍA, 2013)

Matériel  
et  
Méthodes

## Matériel et méthodes

---

Pour explorer la variation de l'activité sérique de la défense oxydative par la catalase et d'étudier son intérêt et sa relation avec les troubles du métabolisme glycémique chez le diabétique de type 1. Nous nous sommes intéressés au dosage des paramètres biochimiques du statut glycémique (glycémie, hémoglobine glyquée, peptide-C, insuline). Aussi, nous avons évalué d'autres paramètres du stress comme le NO et la peroxydation lipidique.

Pour ce faire, nous avons sollicité trois lieux de stages : Le laboratoire de l'établissement de santé public « **SALEM MESSAOUD** » de proximité d'Ouled Yaïch BLIDA pour le recrutement des diabétiques et des témoins ainsi que pour les dosages biochimiques. Le laboratoire de PFE de l'USTHB pour le dosage du catalase, MDA et NO. L'institut Pasteur « **DALI BRAHIM** » pour le dosage du peptide C et l'insuline. Cette étude a été effectuée durant une période de 2 mois (du mois de Mars au mois de Mai de l'année 2015).

### II.1. Matériel

#### II.1.1. Matériel non biologique

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

#### II.1.2. Matériel biologique

Le matériel biologique est constitué par le sang prélevé, par ponction veineuse à partir de la veine du pli du coude, des patients après 12 heures de jeûne. Ce sang est recueilli dans des tubes EDTA et tubes sec puis centrifugé à 4000 tours/min pendant 10 minutes. Le sang total prélevé sur EDTA est utilisé pour le dosage d'hémoglobine glyquée, pour le dosage des paramètres biochimiques ; le plasma et sérums est utilisés pour le dosage des paramètres du stress oxydatif.

### II.2. Méthode de l'étude

#### ❖ Critère d'inclusion

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

- ↳ Un groupe de sujets témoins.
- ↳ Et un groupe de diabétiques (DT1).

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

- ↳ Etre volontaire
- ↳ Homme ou femme

↳ Agé de 18 à 55 ans

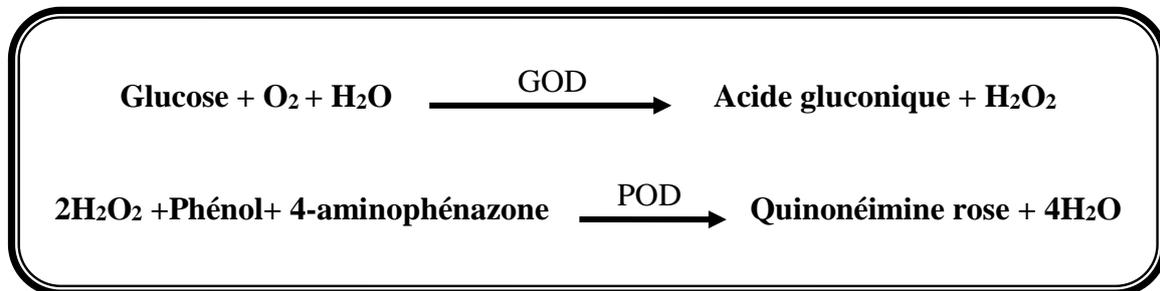
### ❖ Recrutement

Les sujets diabétiques et témoins, ont été recrutés en consultations au niveau l'établissement public de santé public « SALEM MESSAOUD » de proximité d'Ouled Yaïch BLIDA. Ainsi, nous avons inclus 23 sujets non diabétiques, d'apparence saine (aucune pathologie connue) et 22 sujets diabétiques (DT1).

### II.2.1. Paramètre biochimique

#### II.2.1.1. Dosage du glucose sanguin (la glycémie)

**Principe :** La concentration du glucose dans le sang est dosée par la méthode enzymatique colorimétrique de **TRINDER (1969)**. Cette méthode est basée sur la détection d'une couleur rose ou rouge suite à la transformation du glucose en Quinonémine. La réaction se déroule en deux étapes où dans un premier temps le glucose est transformé en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) sous l'action du glucose oxydase (GOD). Dans un deuxième temps le peroxyde d'hydrogène est transformé en présence du phénol et de 4-aminophénazone en Quinonémine sous l'action de la peroxydase (POD) selon les réactions suivantes (**TRINDER, 1969**) :



### 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
Standard	--	10 µl	--
Echantillon	--	--	10 µl
Réactif de travail	1 ml	1 ml	1 ml

## Matériel et méthodes

---

Les tubes sont par la suite agités puis incubés au bain marie à 37°C pendant 10 minutes. Une couleur rose ou rouge est obtenue traduisant la production du Quinonémine. 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 dans les échantillons est réalisé selon la formule suivante :

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

### II.2.1.2. 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'hémolysat 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'hémolysat sont appliqués avec précaution sur le disque supérieur et l'éluât est éliminé. Quand l'hémolysat a entièrement pénétré, 200 $\mu\text{l}$  du réactif (2) sont ajoutés et l'éluât est éliminé. Après l'élution, on ajoute 2000  $\mu\text{l}$  du même réactif.

## Matériel et méthodes

- 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 µl 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 :

$$\text{HbA1 c \%} = \frac{\text{DO}_{\text{HbA1c}}}{\text{DO}_{\text{Hb Totale}} \times 3} \times 100$$

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

### II.2.1.3. 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, ce-ci 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>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<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.2.1.4.dosage du peptide C et de l'insuline

#### Principe

##### ✓ Dosage du peptide C

Le dosage du peptide C se fait par la technique ELISA compétitive réalisée en 2 temps :

- *1ère 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).
- *2ème 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.

##### ✓ Dosage de l'insuline

Le dosage de l'insuline se fait par la technique ELISA sandwich réalisée en 2 temps :

- *1ère étape* : L'anticorps monoclonal murin anti-insuline humaine contenu dans l'unité test se lie à l'antigène contenu dans le sérum.
- *2ème étape* : Le complexe antigène-anticorps est mis en évidence par un anticorps polyclonal de poulet anti-insuline humaine marqué à la phosphatase alcaline.
- Le PPD est hydrolysé par l'enzyme (la phosphatase alcaline) en un anion intermédiaire instable, ce qui permet une émission de lumière dont l'intensité est directement proportionnelle à la concentration de l'insuline contenue dans le sérum.

#### Mode opératoire

Le système **IMMULITE** réalise automatiquement le prélèvement successif d'une solution à base de matrice sérique non humaine pour la saturation des sites non spécifiques et les sérums (100 µl pour le dosage de l'insuline et 50 µl pour le peptide C). Le mélange est injecté dans les unités test contenant des billes de polystyrène revêtues d'un anticorps monoclonal murin anti-insuline humaine ou d'un anticorps polyclonal de lapin anti-peptide C humain ; après une incubation de 30 min à 37°C, sous agitation continue, suivie d'un lavage avec une solution de lavage diluée au 1/10 par centrifugation axiale, les anticorps polyclonaux

## Matériel et méthodes

---

respectifs de poulet anti-insuline humaine ou de l'intestin de veau anti-peptide C marqués à la phosphatase alcaline sont ajoutés.

Après incubation de 30 min à 37°C suivie d'un lavage par centrifugation axiale, 200 µl du substrat chimiluminescent l'ester d'adamantyl dioxétane phosphate (PPD) est ajouté dans l'unité test, suivie d'une incubation de 10 mn à température ambiante.

### Lecture

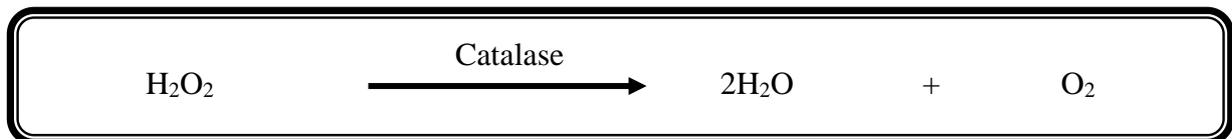
Le substrat chimiluminescent, un ester d'adomentyl dioxétane phosphate (PPD) est hydrolysé par la phosphatase alcaline en un anion intermédiaire instable. La concentration de complexe Ag-Ac formée est proportionnelle à la concentration de l'insuline est inversement proportionnelle à la concentration du peptide C, contenus dans le sérum.

Les résultats des deux paramètres sont exprimés en coups par seconde (CPS) et sont convertis en µ unités internationales pour l'insuline (µUI/ml) et en (ng/ml) pour le peptide C grâce à un courbe étalon qui est intégrée dans le logiciel de l'appareil.

### II.2.2. Paramètre du stress oxydant

#### II.2.2.1. 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''.

## Matériel et méthodes

L'activité de la catalase est calculée par la formule suivante :

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

0,040 : Coefficient de distinction moléculaire

### II.2.2.2. Dosage du malondialdéhyde

La quantité des TBARS est exprimée en terme d'un équivalent biochimique qui est le Malonyl di aldéhyde « MDA», un des produits terminaux formés lors de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (PUFA) méditée par les radicaux libres. 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.

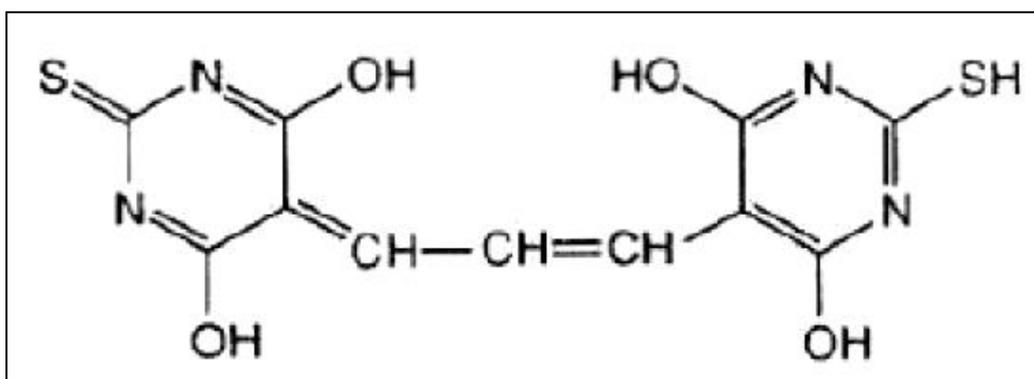


Figure 13 : Formation d'adduit-TBA (1 :2)

**Principe :** 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 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

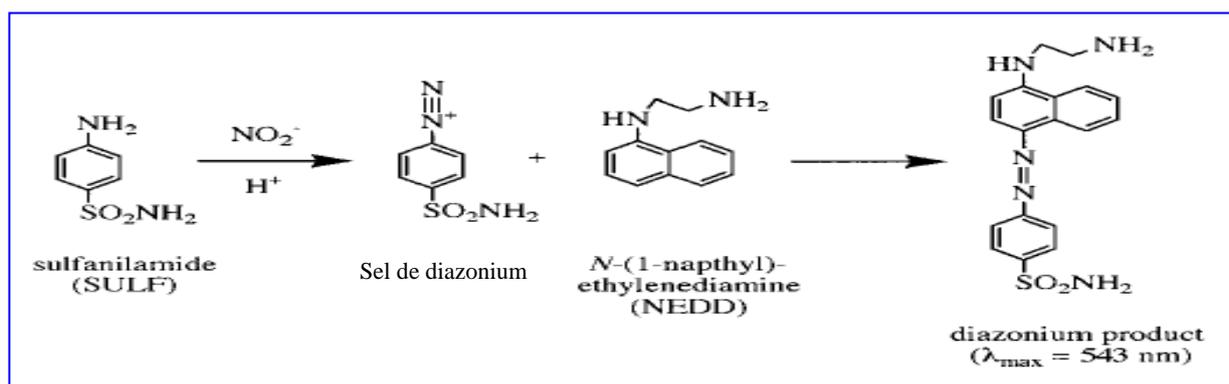
## Matériel et méthodes

sur le surnageant à 532nm. La concentration de TBARS est calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire ( $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Elle est exprimée en  $\mu\text{mol/l}$ .

### II.2.2.3. Dosage du monoxyde d'azote

**Principe :** la mesure du monoxyde d'azote se fait par la réaction de Griess (**GREEN *et al.*, 1982**). Cette dernière, 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.



**Figure 14 :** Formation du diazonium

### Mode opératoire

100  $\mu\text{l}$  de plasma sont mélangés à une solution contenant 50  $\mu\text{l}$  de Griess B, 50  $\mu\text{l}$  de Griess A et 800  $\mu\text{l}$  PBS pH 7,4. Le mélange est centrifugé à 2000 tour par minute puis incubé à 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.3. 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 8.0*.

## Matériel et méthodes

---

L'analyse statistique des moyennes des différents groupes pour tous les paramètres ont été comparés aux témoins en utilisant le test t appariés de Student. 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 :

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

$X_i$ =somme des valeurs individuelles  
 $N$ =nombre de valeurs

Erreur standard de la moyenne (ESM) :

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

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

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

La différence entre deux moyennes  $\bar{X}_a$  et  $\bar{X}_b$  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

Résultats  
et  
Discussion

## Résultats

Rappelons que dans ce travail, nous nous sommes intéressés à rechercher l'intérêt de l'évaluation des taux de la catalase chez le diabétique de type 1. Notre étude est portée sur 45 sujets dont 22 patients diabétiques atteints le diabète de type1 et 23 sujets témoins indemnes de toute pathologie.

Pour ce faire, nous allons explorer nos résultats par l'étude de la variation des taux de la catalase en fonction de :

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

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.1.1. 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 II** : Caractéristiques cliniques et épidémiologique de la population de l'étude.

	DT1	Témoins
<b>Total n(%)</b>	22(48,88%)	23(51,11%)
<b>Hommes n(%)</b>	10(45,45%)	10(43,47%)
<b>Femmes n(%)</b>	12(54,54%)	13(56,52%)
<b>Sexe- ratio</b>	0,83	0,76
<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±1,96	/

L'étude des caractéristiques cliniques et épidémiologiques de notre population, **tableau II, figure (annexe IV)**, nous a permis de constaté une prédominance féminine avec 12 femmes (54,54%) vs 10 hommes (45,45%) pour le groupe des DT1. Nous constatons la

## Résultats

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. La durée du diabète étant de (8,72±1,23) ans chez nos diabétiques de type1 avec un taux moyen d'hémoglobine glyquée « HbA1c » de (11,05±1,96)%. A partir de notre étude, nous avons constaté que la moyenne d'âge des diabétiques de type 1 est 36,54±1,97ans et la durée de diabète est de 8,72±1,23ans.

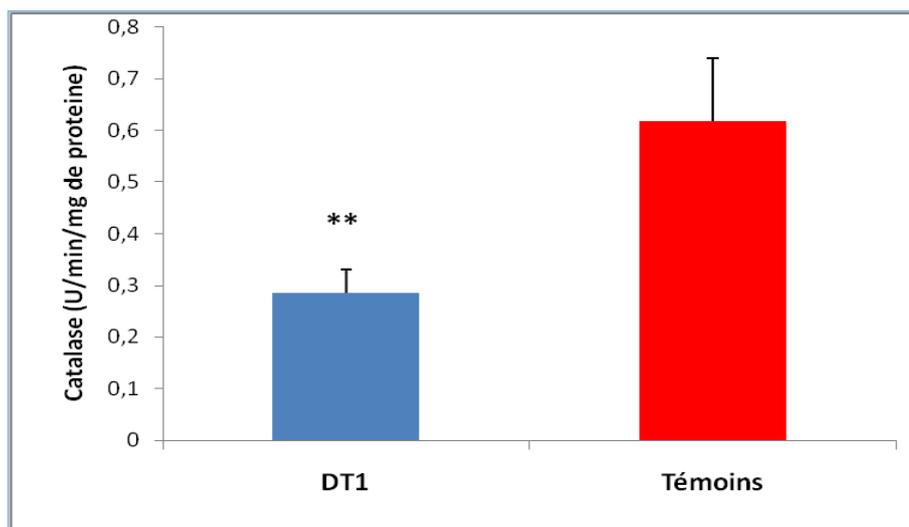
### III.1.2. Exploration du statut oxydatif

Nous nous sommes intéressés à rechercher l'intérêt de l'évaluation des taux de la catalase chez le diabétique de type 1. Ce dernier, a été corrélé par une étude statistique aux autres paramètres métaboliques du statut glycémique et du stress oxydant chez notre population diabétiques et chez les témoins.

#### III.1.2.1. Etude de la variation des taux de la catalase

##### ➤ Estimation des taux de la catalase chez les diabétiques de type1 et les témoins

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 représentés par la **figure15**.



**Figure 15** : 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.

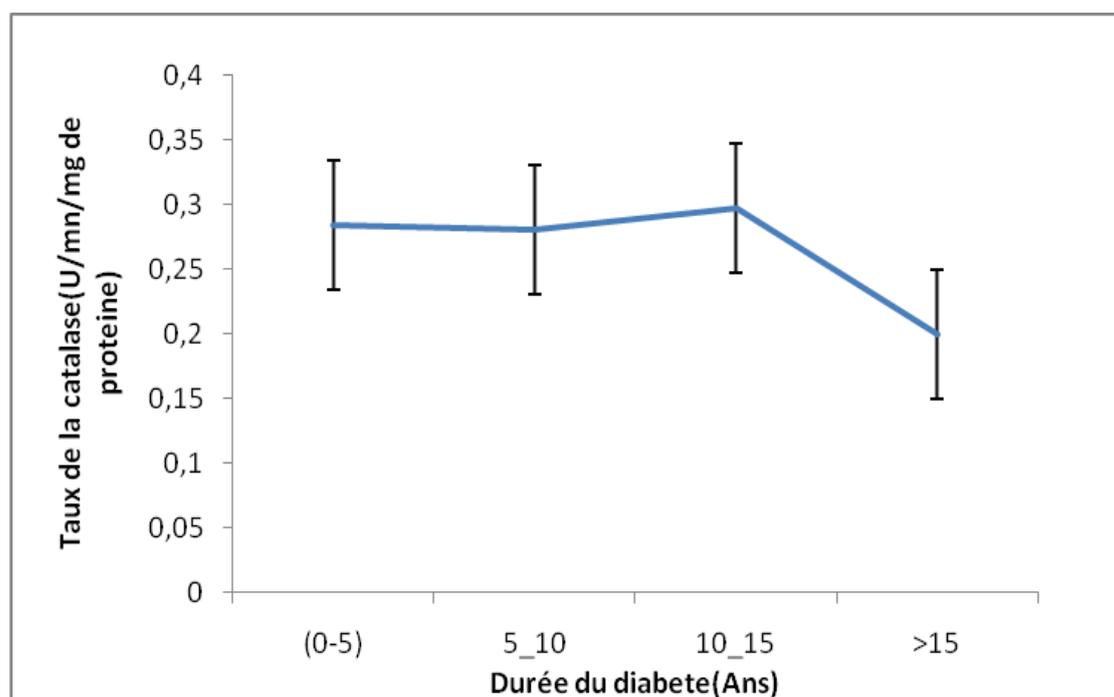
## Résultats

La **figure 15**, représente 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'analyse de régression de la catalase chez les diabétiques (**annexe IV**) a montré une corrélation fortement positive avec le MDA ( $r = 0,99989$ ,  $\alpha < 0,05$ ) et l'hémoglobine glyquée ( $r = +0,72093$ ,  $\alpha < 0,05$ ), alors qu'elle se trouve faiblement positive avec la glycémie à jeun ( $r = +0,31593$ ,  $\alpha < 0,05$ ) et l'insuline ( $r = +0,13791$ ,  $\alpha < 0,05$ ). Nous avons aussi constaté une corrélation faiblement négative avec le monoxyde d'azote ( $r = -0,0882$ ,  $\alpha < 0,05$ ) et le peptide-C ( $r = -0,1990$ ,  $\alpha < 0,05$ ).

### ➤ Étude de la variation des taux de la catalase en fonction de la durée du diabète type1

Etant donnée l'impacte de la durée du diabète sur les complications métaboliques chez les diabétiques, nous avons étudié l'influence de la durée du diabète sur la variation de l'activité de la catalase. Nos résultats obtenus sont représentés par la **figure16**.



**Figure 16** : Variation des taux de la catalase en fonction de la durée du diabète type1.

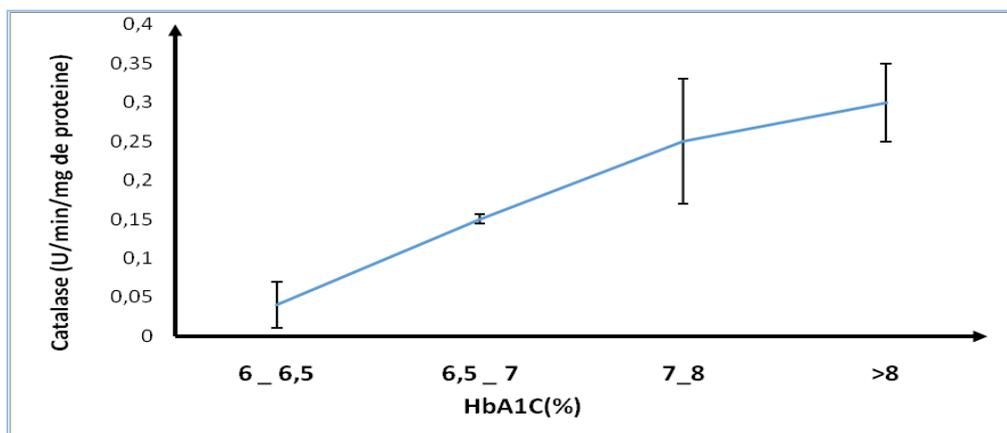
## Résultats

La **figure 16** représente la variation des taux de la catalase en fonction de la durée du diabète type1. L'étude statistique réalisée par le test de Dunet, nous a permis de constater chez les diabétiques de type 1 de notre étude, qu'il existe une différence très significative entre la variation de l'activité des taux de la catalase et la durée de diabète ( $P=0,0001$ ).

Nos résultats montrent aussi que le taux de la catalase est diminué dans le groupe de diabétique dont la durée est  $>15$ ans. L'étude statistique par l'ANOVA puis le test de Tuky, n'a montré aucune différence significative entre les différents groupes de diabétiques classés selon la durée du diabète ( $p>0,05$ ).

### ➤ Étude de la variation des taux de la catalase 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 l'activité de la catalase en fonction des différents taux de l'hémoglobine glyquée. Nos résultats obtenus sont répertoriés représentés par la **figure17**.



**Figure 17** : Variation des taux de la catalase en fonction de l'hémoglobine glyquée chez les DT1.

La **figure 17** représente la variation des taux de l'activité de la catalase en fonction de l'hémoglobine glyquée. La figure ci-dessus montre que les pourcentages de l'hémoglobine glyquée augmentent en synergie avec l'augmentation de l'activité de la catalase. Le groupe de sujets diabetiques de type1 ayant une HbA1C dans les normes (6-6,5) ont un taux de catalase bas alors ceux qui ont une HbA1C  $>8$  se retrouve avec un taux de catalase élevé malgré leur

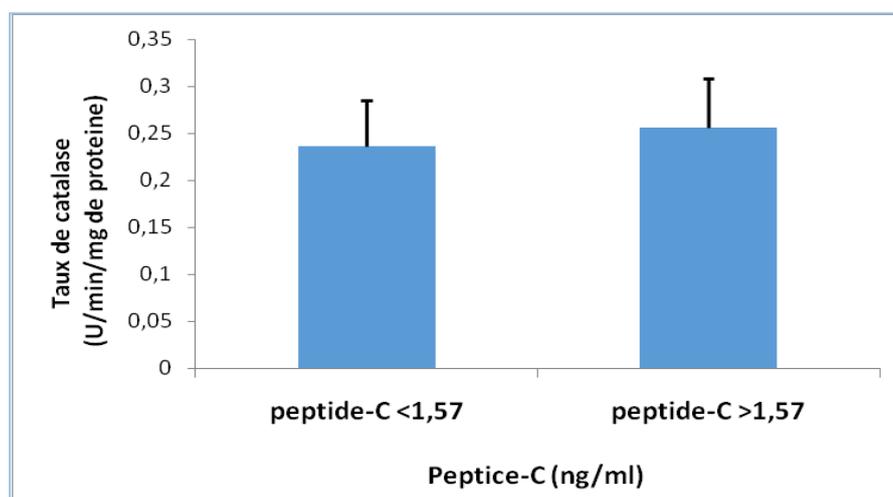
## Résultats

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

Cependant, nous constatons aussi que les groupes de diabétiques non équilibrés ayant une HbA1C avec des valeurs comprises entre (7 – 8) et  $>8$  présentent une variabilité. Cette variabilité est probablement due au fait qu'il existe une fluctuation dans les différentes réponses thérapeutiques chez chaque diabétique au niveau de ces groupes.

### ➤ Étude de la variation des taux de la catalase en fonction des taux du peptide C

Le peptide C est essentiel pendant la biosynthèse de l'insuline. son dosage permet de déterminer l'insulinoréquérance chez le patient diabétique. En effet, c'est un marqueur de la fonction résiduelle des cellules  $\beta$  pancréatiques chez le diabétique. Pour cela nous sommes intéressés à chercher l'influence de la variation des taux de l'activité de la catalase en fonction des taux du peptide C. Nos résultats obtenus selon les deux groupes normo-glycémiques et hyper-glycémiques sont représentés par la **figure 18**.



**Figure 18** : Evaluation du taux de la catalase en fonction des taux du peptide C chez les DT1.

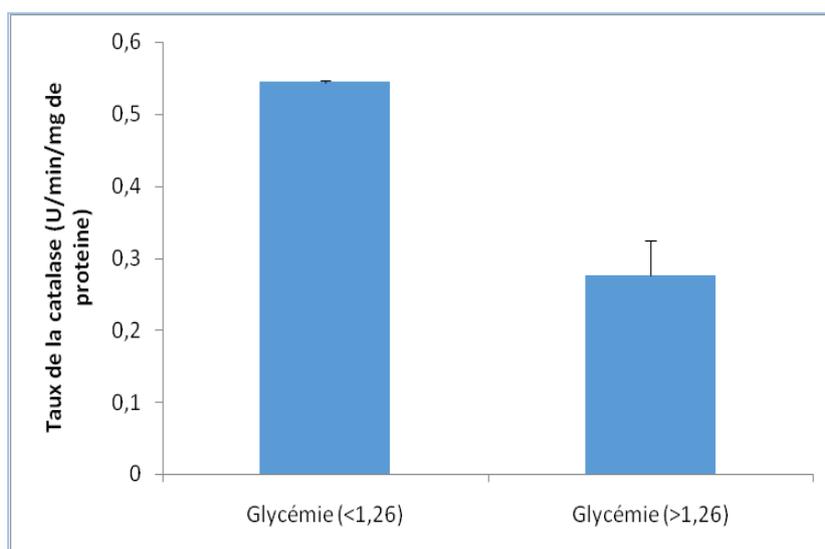
La **figure 18** représente la variation des taux de la catalase en fonction des concentrations du peptide-C. Nos résultats montrent que le groupes des diabétiques ayant des valeurs de peptide-C ( $< 1,57$ ) ont des taux de catalase légèrement inférieur ( $0,23 \pm 0,048$  U/min/mg de protéine) de ceux du groupe peptide- C ( $> 1,57$ ) dont les valeurs de l'activité de

## Résultats

la catalase est de  $(0,25 \pm 0,0530 \text{ U/min/mg de protéine})$ . La comparaison des deux groupes par le test de student montre qu'il n'existe pas de différence significative ( $P=0,81$ ) entre les deux groupes.

### ➤ Étude de la variation des taux de la catalase en fonction des taux de la glycémie

Le contrôle de la glycémie est un paramètre clé du suivi du sujet diabétique. Nos résultats obtenus selon les deux groupes normo-glycémiques et hyper-glycémiques sont représentés par la **figure19**.

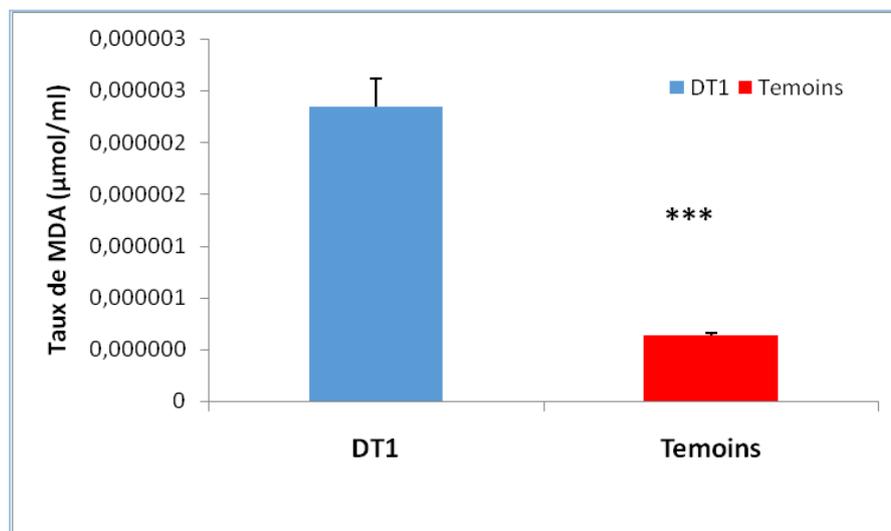


**Figure 19** : Evaluation de la variation des taux de la catalase en fonction des taux de glycémie chez les DT1.

La **figure 19** représente la variation des taux de la catalase plasmatique chez les DT1 en fonction des taux de la glycémie. Ainsi, nous constatons que les taux de l'activité de la catalase sont plus élevés chez les diabétiques dont les valeurs de la glycémie sont inférieures à 1,26 par rapport aux diabétiques en situation d'hyperglycémie ( $>1,26$ ) avec des valeurs respectives de  $0,54 \pm 0,002 \text{ (U/min/mg de protéine)}$  vs  $0,27 \pm 0,05 \text{ (U/min/mg de protéine)}$ . En effet, l'étude statistique par le test de student montre une différence hautement significative à ( $P=0,000002$ ).

### III.1.2.2. Evaluation du 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 malondialdehyde plasmatique. Nos résultats obtenus sont représentés par la **figure 20**.



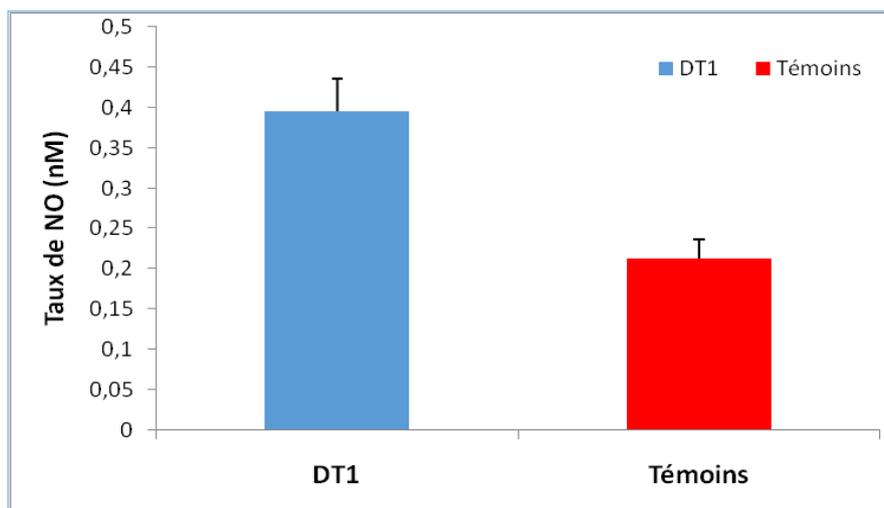
**Figure 20** : Evaluation de la peroxydation lipidique chez les diabétiques de type1 et les témoins. (La différence est hautement significative à (\*\*\*) $p < 0,001$ )

La **figure 20** représente 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 élevée par rapport aux témoins avec des valeurs respectives de  $2,8 \pm 0,27$  ( $\mu\text{mol/l}$ ) vs  $0,63 \pm 0,02$  ( $\mu\text{mol/l}$ ). La comparaison entre les deux groupes témoins et diabétique (DT1) par le test de student, montre qu'il existe une différence hautement significative ( $p = 0,00001$ ).

### III.1.2.3. Evaluation du taux du monoxyde d'azote

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 représentés par la **figure 21**.

## Résultats



**Figure 21 :** Evaluation de la concentration de monoxyde d'azote chez les diabétiques de type1 et les témoins.

La **figure 21** représente 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  $0,3955 \pm 0,04031$  (nM) vs  $0,2130 \pm 0,02413$  (nM). 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.2.1. Étude descriptive des caractéristiques cliniques et épidémiologiques de la population

Les résultats obtenus de l'étude des caractéristiques cliniques et épidémiologique de la population de concernant l'âge moyen de notre population nous a permis de constater une concordance avec une autre étude réalisé par **LOSADA et ALIO en 1997**, qui ont trouvé que sur 60 patients diabétiques de type 1, avec 32 atteint de la rétinopathie diabétique et 28 sans rétinopathie diabétique que l'âge moyen respectif était de  $35,81 \pm 13,23$  ans et de  $26,92 \pm 14,07$ .

En effet, selon **COLAS (2010)**, le DT1 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.

Selon **ALDDAFARI MOUDJAHED 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.

### III.2.2. Exploration du statut oxydatif

#### III.2.2.1. Estimation des taux de la catalase chez les diabétiques de type1 et les témoins

Ces taux bas de l'activité de la catalase suggèrent une baisse de la défense en antioxydant endogène et une baisse de la protection contre les ERO (radicaux libres oxygénés) et de ce fait l'organisme ne peut plus contrôler la présence excessive des radicaux libres oxygénés toxiques. Cette état physiologique va conduire alors à un déséquilibre de la balance anti-oxydants/ pro-oxydants. Cette hypothèse à été déjà confirmé par la littérature (**HALENG et collaborateurs en 2007**). En effet, selon **PINCEMAIL et collaborateurs en, 2002**, La production physiologique d'ERO est régulée par des systèmes de défenses composés d'enzymes, qui parmi elles se retrouvent : la catalase, la superoxyde dismutase (SODs), glutathion peroxydases (GPx's), oxygénase, la peroxyrédoxine...). A ces enzymes, se rajoutent les molécules antioxydants de petites tailles (caroténoïdes, vitamines C et E, glutathion, acide urique...).

## Discussion

---

D'après **PINCEMAIL et collaborateurs en, 2002**, l'accumulation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> favorise la réaction de Fenton qui en présence du Fe<sup>2+</sup>, un puissant donneur d'électrons réagit avec l'eau oxygénée pour générer des radicaux hydroxyles hautement réactifs. Cette accumulation de peroxyde d'hydrogène peut être empêché par les métaux de transition comme le fer ou le cuivre afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier (**HUET et al., 2006**).

Le mécanisme de régulation de la catalase est encore peu connu chez les eucaryotes. Il est seulement décrit lorsque la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est faible (**SATO et al., 1992**).

Nos résultats ne concordent pas avec les travaux de **KAJI et al. (1985)** qui ont rapporté, par une étude sur soixante femmes atteintes le diabète de type 2 âgés de 34 à 78 ans et soixante témoins de sexe féminin, qu'il n'y avait pas de différence significative dans l'activité de la catalase érythrocytaire entre les sujets diabétiques et les contrôles. Les mêmes résultats ont été trouvés par **HÄGGLÖF et collaborateurs en 1983** qui ont rapporté que les activités de la catalase érythrocytaire ont été normales chez les enfants diabétiques de type 1. Également l'étude réalisée par **MICHELSON (1982)** a signalé des activités normales de la catalase érythrocytaire chez les patients diabétiques.

Aussi, l'étude de **MERZOUK et collaborateurs en 2003**, ont montré que l'activité de la catalase était plus faible chez les deux types de diabète (DT1 et DT2) par rapport aux témoins. Par ailleurs, **BONNEFONT-ROUSSELOT et collaborateurs en 2004**, décrit que la mesure globale du pouvoir antioxydant total du plasma met en évidence une diminution de ce pouvoir chez les sujets diabétiques, surtout en cas de complications.

Cependant, selon **GÖTH et collaborateurs en 2001**, l'augmentation de la fréquence du diabète est associée à une carence en catalase chez les patients diabétiques.

En effet nos résultats, ainsi que ceux des autres auteurs corroborent avec ceux de **PILLON en 2010** qui décrit que chez des sujets intolérants au glucose, l'activité des enzymes antioxydants (catalase et SOD) est plus faible que chez des sujets sains.

Des travaux réalisés par **TING HSU et collaborateurs en 2006** montrent par une étude chez une population d'enfants que certains paramètres du stress oxydatif sont influencés par la durée du diabète et de l'efficacité du contrôle de la glycémie. Ces observations suggèrent que la thérapie de soutien de contrôle des paramètres du stress oxydatif peut aider à prévenir les complications cliniques chez les enfants atteints de diabète de type 1.

## Discussion

---

Il y a aussi plusieurs études récentes qui montrent une diminution significative de la capacité en antioxydant dans le plasma avec une diminution du statut antioxydant total chez les diabétiques. Cette situation se traduit par le dépassement des capacités de neutralisation des ERO (MEJRBI *et al.*, 2012).

### III.2.2.2. Étude de l'activité de la catalase en fonction de la durée du diabète type1

Sachant que la durée de la pathologie (DT1) est en synergie avec l'avancement dans l'âge des patients, la diminution de l'activité de la catalase en fonction de l'augmentation de la durée du diabète suggère une diminution de capacité en antioxydants endogènes. Cette dernière nous informe que cette enzyme « la catalase » est un facteur de risque de rechute de la défense oxydative après une longue durée de diabète. Cette rechute de la défense oxydative peut être due aux hyperglycémies chroniques qui sont souvent enregistrées chez les patients diabétiques et ceux-ci malgré le suivi thérapeutique. Ces résultats suggèrent aussi, que ces patients ont une alimentation non équilibrée pauvre en antioxydants qui contribuera aussi à l'apparition du stress oxydant.

INGELS *et al.* (2006) ont souvent pensé à l'existence d'un lien entre l'hyperglycémie et l'aggravation du stress oxydatif. Et qu'il semble de plus en plus évident qu'il existe un lien entre le degré d'hyperglycémie à l'admission et la durée d'hyperglycémie.

Aussi, BAROUKI en 2006, rapporte que l'association des deux enzymes SOD et catalase était nécessaire pour la détoxification de l'anion superoxyde.

### III.2.2.3. Étude de l'activité de la catalase en fonction de l'hémoglobine glyquée

Nos résultats montrent des valeurs basses de la catalase chez le groupe de diabétique DT1 ayant une glycémie équilibrée et confirmée par le dosage de l'HbA1C. nous pensons que cet état d'équilibre chez ces diabétiques s'explique probablement par le fait que ces sujets ne sont pas en situation de stress physiologique et répondent bien au suivi thérapeutique avec une bonne hygiène de vie.

La littérature rapporte que l'HbA1c est le produit d'Amadori le plus connu car son taux est utilisé comme indice de contrôle métabolique du glucose chez le diabétique (CARRERAS, 2005). En effet, Le taux normal de HbA1c est d'environ 4 à 5 % de la totalité de l'hémoglobine. Il peut atteindre 12 à 15 % dans les hyperglycémies du diabète déséquilibré

## Discussion

---

pendant quelques semaines (**PERLEMUTER, 2000**). Dans notre étude le taux de HbA1c dépasse les valeurs normales ceux-ci reflète une déséquilibre métabolisme glucidique.

Selon **BONNEFONT-ROUSSELOT *et al.* (2004)**, l'état d'hyperglycémie chronique favorise également les réactions de glycation, en donnant les produits de glycation avancée (AGE). La plupart des réactions de glycation s'accompagnent d'ailleurs de réactions d'oxydation, ce qui est à l'origine du terme de « glyco-oxydation ». Selon **BROWNLEE *et al.* (1984)**, la formation excessive des produits de glycosylation non enzymatique semble être le lien biochimique commun entre l'hyperglycémie chronique et un certain nombre de processus physiopathologiques potentiellement impliqués dans le développement des complications du diabète à long terme.

Par ailleurs, **GILLERY (2006)** suggère que l'hyperglycémie, génère une augmentation de l'intensité des réactions dites de glycation non enzymatique, qui s'accompagne d'un stress oxydant, bien décrit chez les patients diabétiques. De plus, de nombreuses études sur des patients diabétiques de type 1 et 2 ont montré une diminution significative de la capacité antioxydant dans le plasma. Selon **ARAI *et al.* (1987)** cette diminution pourrait s'expliquer par la glycation de leur site actif, comme cela a été décrit pour la SOD érythrocytaire. Des expériences de glycation *in vitro* ont également montré une altération des activités enzymatiques de la catalase (**YAN et HARDING, 1997**) la GSH réductase (**BLAKYTTY et HARDING, 1992**) ou de la GPx (**BALDWIN *et al.*, 1995**), suggérant une modification de ces enzymes au cours du diabète.

Néanmoins, les résultats de notre étude montrent qu'il n'y a pas une diminution dans le taux de notre antioxydant « la catalase » mais plutôt une faible modification.

Certaines études ont rapporté non pas une diminution mais une augmentation des défenses antioxydantes enzymatiques, suggérant un mécanisme compensatoire à une production de ROS (**DENIS, 2002**). Une autre étude réalisée par **REMA *et collaborateurs en 1995***, a montré qu'il y avait une augmentation paradoxale des activités GPx et catalase érythrocytaires chez des patients diabétiques. De plus, **SECHI *et collaborateurs en 1997***, ont mis en évidence une augmentation des niveaux d'ARNm de la SOD et de la catalase dans le rein de rats diabétiques.

## Discussion

---

### III.2.2.4. Étude de l'activité de la catalase en fonction des taux du peptide C

Le dosage du peptide C est de grand intérêt, chez les diabétiques insulinotraités, pour mesurer la capacité sécrétoire de la cellule  $\beta$  (**PERLEMUTER, 2000**).

Ainsi, les patients diabétiques de type 1 deviennent rapidement C-peptide négatifs, dépendent exclusivement de l'insuline exogène pour assurer un bon contrôle métabolique, sont exposés à une instabilité glycémique importante et sont à haut risque de développer à terme des complications vasculaires, en particulier de microangiopathie (**PHILIPS *et al.*, 2002**).

Les diabètes de type 1 instables ont des taux plasmatiques de peptide C très bas ou presque nuls, alors que le taux est légèrement plus élevé chez les diabétiques stables (**PERLEMUTER, 2000**).

Dans une étude faite par **NDAHIMANA *et al.* (1996)**, dont la sécrétion résiduelle d'insuline a été mesurée par le peptide C sur 119 enfants, adolescents et jeunes adultes diabétiques, il n'y avait pas de différence significative des paramètres anti-oxydants en fonction de la sécrétion résiduelle d'insuline endogène.

### III.2.2.5. Étude de la variation des taux de la catalase en fonction des taux de la glycémie

Une étude décrit en 2004 qu'il est intéressant de souligner que, si l'hyperglycémie chronique est bien à l'origine d'un stress oxydant, ce dernier pourrait être aussi à l'origine du diabète de type 1 par un phénomène d'apoptose des cellules bêta pancréatiques dans le diabète de type 1 ou à l'origine de l'insulino-résistance du diabète de type 2. Il note aussi que l'état d'hyperglycémie chronique du diabète sucré conduit à un stress oxydant, c'est-à-dire un déséquilibre entre pro-oxydants et antioxydants au profit des premiers. Donc l'équilibre glycémique joue un rôle très important dans la balance prooxydant/antioxydant (**BONNEFONT-ROUSSELOT *et al.*, 2000, 2004**).

L'insulinopénie absolue ou relative associée à l'augmentation des hormones de contre-régulation (glucagon, catécholamines, cortisol et hormone de croissance) est responsable d'une hyperglycémie par l'intermédiaire de trois mécanismes : une accélération de la glycolyse ; une diminution de l'utilisation tissulaire du glucose ; une augmentation de la néoglucogénèse (**ORBAN et ICHAI, 2008**).

## Discussion

---

**DELATTRE et collaborateurs en 1999**, définissent que des concentrations élevées de glucose dans les milieux extra et intracellulaires induisent un stress oxydant. Et d'après **COSNAY et al. (2004)** le stress oxydatif est corrélé au degré d'hyperglycémie par augmentation de la production des radicaux libres. Et selon **RODIER (2001)** l'hyperglycémie s'aggrave aussi avec l'âge.

### III.2.2.6. Evaluation de la peroxydation lipidique

Le MDA est connu pour être un biomarqueur potentiel du stress oxydatif (**SENDUR et al, 2009**). Selon **BEAUVIEUX et collaborateurs en 2002**, le MDA est un catabolite de réaction radicalaire formé lors de la coupure par les ERO des acides gras polyinsaturés possédant au moins deux doubles liaisons. L'utilisation de la réactivité du MDA avec l'acide Thiobarbiturique (TBA) reste un test « classique » de dépistage de peroxydation lipidique encore très utilisé actuellement.

Le MDA est un composé très toxique, produit au cours de l'oxydation des lipides et physiologiquement lors de la synthèse des prostaglandines et thromboxanes (**GILLERY, 2006**).

Nos résultats concordent avec les travaux de **TURKINA et collaborateurs en 1991** qui ont rapporté une augmentation des taux de MDA chez les enfants diabétiques par rapport à ceux des enfants sains. Aussi, les travaux de **BALASHOVA et collaborateurs en 1993**, ont montré, chez une population constitué de 16 patients atteints le diabète de type 1 et 15 témoins sains, que le taux de MDA de globules rouge a été hautement élevé chez diabétiques de type 1 que chez les témoins.

Ces résultats ont aussi été obtenus par l'étude de **WIERUSZ-WYSOCKA et collaborateurs en 1995** où effectivement les niveaux de MDA étaient significativement plus élevés chez les patients atteints le diabète de type 1 et de type 2 que chez les témoins. Ces résultats ont également été décrits par **RUIZ et et collaborateurs en 1999** dans le diabète de type 1.

Une autre étude menée par **DIERCKX et collaborateurs en 2003** montre que les concentrations plasmatiques de MDA ont également été trouvés à être plus élevé chez les sujets diabétique de type 2 que chez les témoins sains.

## Discussion

---

Selon **DEL RIO *et collaborateurs en 2005***, le MDA est capable d'altérer plusieurs mécanismes physiologiques de l'organisme humain par sa capacité à réagir avec des molécules telles que l'ADN et les protéines.

**GALLOU *et al., 1993*** ont mesuré le taux de MDA par TBARS chez 117 patients diabétiques qui ont été divisés en groupes et sous-groupes selon le type de diabète (Type 1 et type 2) et de l'existence ou non de complication vasculaire et 53 contrôles. Les résultats de cette étude ont montré que les concentrations TBARS étaient significativement plus élevées chez les patients diabétiques le type 1 ( $P < 0,0001$ ) et de type 2 ( $P < 0,001$ ) que chez le groupe de contrôle, et que ces concentrations ne diffèrent pas de manière significative entre les patients diabétiques de type 1 et 2.

Selon **JADOT en 1994**, il existe des résultats qui montrent que, dans le diabète, la peroxydation lipidique plasmatique est significativement plus élevée que chez les témoins. Il décrit aussi que l'excès de peroxydation lipidique sur les cellules des îlots de Langerhans, les lymphocytes et l'endothélium vasculaire, accélère les complications rencontrées dans les diabètes débutants ou mal équilibrés. **MEMİSOĞULLARI *et collaborateurs en 2003***, ont montré par une étude que le taux MDA a augmenté pour les patients diabétiques par rapport aux témoins.

Mais malgré ça, **PINCEMAIL *et collaborateurs en 1999*** décrit que l'estimation de Malon dialdéhyde reste un indice peu représentatif de la présence d'une peroxydation lipidique puisqu'elle ne représente qu'un pourcent des produits de décomposition des peroxydes lipidiques.

Alors **BONNEFONT-ROUSSELOT *et collaborateurs en 2004***, décrit aussi qu'au cours du diabète, il y a une production accrue de radicaux libres, en particulier provenant des processus de glycation ou de peroxydation lipidique, et une diminution des systèmes de défense antioxydants.

### III.2.2.7. Évaluation du taux du monoxyde d'azote

Le NO est responsable d'une grande diversité d'effets sur l'organisme, tant bénéfiques que potentiellement délétères (**MASSION *et al., 2002***).

## Discussion

---

**TRAUB et VAN BIBBER en 1995**, ont examiné le rôle du NO dans le développement des maladies vasculaires liées au diabète, alors ils ont trouvé des résultats suggérant que le métabolisme du NO et leur réactivité vasculaire sont modifiées dans le diabète.

L'insuline active la NOSe et cause la vasodilatation, et les anomalies de la production de NO et de la fonction endothéliale sont des manifestations précoces de l'athérosclérose observée dans le diabète. La phosphorylation de ce même résidu *ser* de la NOSe est stimulée par l'insuline, entraînant son activation (**FANTUS, 2002**).

Le NO• est une molécule gazeuse hautement diffusible présente dans tous les types de cellules (**MASSION *et al.*, 2002**), il 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 via une expression accrue de IκB (**TAMION *et al.*, 2003**).

D'après **TAMION *et collaborateurs en 2003***, le NO• peut avoir des effets cytotoxiques, notamment sous la forme d'acide peroxynitriteux (ONOO<sup>-</sup>) qui résulte de la réaction du NO• avec l'anion superoxyde. Cette toxicité apparaît d'autant plus qu'il existe de grande quantité de NO• produite. Selon **DETAILLE *et collaborateurs en 2002***, le NO• inhibe la cytochrome C oxydase conduisant l'activation des caspases, phénomène relié à la mort de la cellule bêta.

# Conclusion

## CONCLUSION

Il est bien établi que le risque accru de diabète a été enregistrée chez les patients présentant un déficit en catalase. La déficience de cette enzyme entraîne, dans la cellule-  $\beta$ , à une augmentation du stress oxydatif et finalement à une défaillance de ce type de cellule. Les cellules  $\beta$ - sont riches en mitochondries qui pourraient être une source de ROS.

L'étude réalisée avait pour but d'estimer l'activité de la catalase chez le diabétique de type1 et d'étudier sa relation avec les troubles du métabolisme glycémique.

Les résultats de notre étude 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 taux faible de la catalase chez les diabétiques suggèrent un déséquilibre profond entre pro-oxydant et antioxydant.
- L'hyperglycémie élevée et le taux remarquable de l'hémoglobine glyquée ( $> 6\%$ ) reflète le déséquilibre du métabolisme glycémique en faveur d'une production importante de radicaux libres.
- Les taux élevés du MDA chez les atteints patients de diabète auto immun témoignent d'un désordre métabolique qui reflète un état de stress cellulaire et tissulaire.
- Les concentrations moyennes élevées du NO chez les DT1 suggèrent son implication dans la réponse immunitaire comme agent cytotoxique avec une surproduction de radicaux libre.
- la diminution de l'activité de la catalase en fonction de la durée du diabète suggère une diminution de capacité en antioxydants endogènes. Aussi ces résultats montrent, que ces patients ont probablement une alimentation non équilibrée pauvres en antioxydants qui contribuera aussi à l'apparition du stress oxydant.

En effet, chaque sujet de notre population présente un état physiologique particulier et ne possèdent pas le même potentiel antioxydant .Ainsi, souvent la thérapeutique est adapté en fonction de cette état.

En perspective, nous pouvons proposer :

D'élargir l'échantillonnage de la population témoin pour avoir une norme de taux de l'activité de la catalase chez la population algérienne.

D'explorer les valeurs des taux de la catalase chez les diabétiques associées des complications macro-antipathique et micro-antipathique.

Cette étude pourrait aussi être renforcée par le dosage des autres paramètres du stress oxydant notamment les produits de l'oxydation avancée des protéines « AOPP ».

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

---

**ADLY A., 2010-** Oxidative stress and disease: An Updated Review. *Res. J. Immunol.*, 3(2): 129-145.

**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-TLEMCEM ., PP : 1-66.

**ANDREELLI F., JACQUIER D. et KEUFER F., 2006-** Propriétés anti-inflammatoires de l'insuline chez les patients en réanimation Anti-inflammatory effect of insulin in critically ill patients Société de réanimation de langue française. Elsevier Masson SAS., 15: 467–473.

**ARAI K., IIZUKA S., TADA Y., OIKAWA K. et TANIGUCHI N., 1987-** Increase in the glycosylated form of erythrocyte Cu-Zn-superoxide dismutase in diabetes and close association of the nonenzymatic glycosylation with the enzyme activity. *Biochim. Biophys. Act.*, 924 : 292-296.

**ARROUDJA F., 2014-** Détermination de quelques paramètres du statut oxydant antioxydant et des lipides au niveau des placentas lors des grossesses à risque (Diabète de type 1, Diabète gestationnel), MÉMOIRE DE MASTER, Université ABOU BEKR BELKAÏD Tlemcen., pp 77.

**ASHOVA T.S., GOLEGA E.N., RUD'KO I.A., BALABOLKIN M.I. et KUBATIEV A.A., 1993-** Lipid peroxidation and the antioxidant protection of the erythrocytes in diabetes mellitus patients. *TerArkn.*, 65: 23-7.

**BALDWIN J.S., LEE L., LEUNG T.K., MURUGANANDAM A. et MUTUS B., 1995-** Identification of the site of non-enzymatic glycation of glutathione peroxidase: rationalization of the glycation-related catalytic alterations on the basis of three-dimensional protein structure. *Biochim. Biophys. Act.*, 1247: 60-64.

**BAROUKI R., 2006-** Stress oxydant et vieillissement. *Médecine/Sciences.*, 22 : 266-72.

**BAUDIN B., 2006-** Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *mtcardio.*, 2(1) : 43-52.

**BEAUVIEUX M.C., GIN H. et PEUCHANT É., 2002-** LE STRESS OXYDANT ET SES MARQUEURS BIOLOGIQUES. *Cah. Nutr. Diét.*, 37, (1) :45-51.

## Références bibliographiques

---

**BLAKYTTY R. ET HARDING J.J., 1992-** Glycation (non-enzymic glycosylation) inactivates glutathione reductase. *Biochem. J.*, 15: 303-307.

**BONINI M-G.et AUGUSTO O., 2001-** Carbon Dioxide Stimulates the Production of Thiyl, Sulfinyl, and Disulfide Radical Anion from Thiol Oxidation by Peroxynitrite. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.*, Vol. 276, No. 13, Issue of March 30, pp. 9749–9754.

**BONNEFONT-ROUSSELOT D., 2007-** Stress oxydant et vieillissement. *SPECTRA BIOLOGIE* n° 157.

**BONNEFONT-ROUSSETOT D., BEAUDEUX J.L., THEROND P., PEYNET J., LEGRAND A. et DELATTRE J., 2004-**Diabète sucré, stress oxydant et produits de glycation avancée. *Ann Pharm Fr.*, 62 : 147-157.

**BOUGLE A. et ANNANE D., 2009-** Les effets de l'insuline : de la cellule à l'organisme entier Effect of insulin: From the cell to the total body.*Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 28., e193–e199.

**BOUHOURS-NOUET N. et COUTANT R., 2005-** Clinique et diagnostic du diabète de l'enfant. *Maladies infectieuses.*,4-059-K-10.

**BROWNLEE M., VLASSARA H. et CERAMI A., 1984-** Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann. Intern. Med.*, vol. 101: 527-537.

**BUYSSCHAERT M., 2006-** Diabétologie clinique.Éditeur : De Boeck Supérieur., pp 180.

**CARRERAS M., 2004-** état pro/antioxydant en relation avec le métabolisme lipidique dans les plaquettes sanguines lors du diabète. Thèse de l'école pratique des hautes études., pp41.

**CILLARD J. et CILLARD P., 2006-** Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations.*OCL.*, 13 (1) : 24-29.

**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. Thèse de doctorat, Université de Lyon, France., pp 191.

## Références bibliographiques

---

**COSNAY P., BARTHÉLÉMY B., MARCHAL C. et CASSET-SENON D., 2004-** Coeur et diabète, *La revue de médecine interne.*, 25 : S334-S336.

**DE MEYTS P., 2005-** LE RÉCEPTEUR À L'INSULINE : Structure et fonction. *Rev Med Liege.*, 60 : 5-6 : 286-290.

**DEL RIO D., STEWART A.J., PELLEGRININ., 2005-** A review of recent studies on alondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress, *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases .*, 15: 316-328.

**DELATTRE J., BONNEFONT-ROUSSELOT D., BORDAS-FONFRÈDRE M. et JAUDON M-C., 1999-** Diabète sucré et stress oxydant. *Annales de Biologie Clinique .*, 57 (4) : 437-44.

**DENIS U., 2002-** Etude pharmacologique de la voie de signalisation impliquée dans l'apoptose des péricytes rétiens induite par les produits avancés de glycation (albumine bovine modifiée par le méthylglyoxal). Thèse de doctorat, L'institut National des Sciences Appliquées, Lyon., pp 142.

**DIERCKX N., HORVATH G., VAN GILS C., VERTOMMEN J., VAN DE VLIET J, DE LEEUW I. et MANUEL-Y-KEENOY B., 2003-** Oxidative stress status in patients with diabetes mellitus: relationship to diet. *Eur J Clin Nutr.*, 57 : 999-1008.

**DROUIN P., BLICKLE J.F., CHARBONNEL B., ESCHWEGE E., GUILLAUSSEAU P.J., PLOUIN P.F., DANINOS J.M., BALARAC N. et SAUVANET J.P., 1999-** Diagnostic et classification du diabète sucré les nouveaux critères. *Diabetes & metabolism.*, 25 (1), pp 72.

**DUBOIS-LAFORGUE D., 2007-** Étiologie et physiopathologie du diabète de type 1. *EMC-Endocrinologie- Nutrition.*, 10-366-C-10.

**FAVIER A., 2003-** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques.*, 108-115.

**FAVIER A., 2006-** Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann Pharm Fr.*, 64 : 390-396.

## Références bibliographiques

---

**GALLOUG., RUELLANDA., LEGRASB., MAUGENDRED., ALLANNICH. et CLOAREC L., 1993-** Plasma malondialdehyde in type 1 and type 2 diabetic patients. *ClinicaChimica Acta.*, 214 (2) : 227–234.

**GARDÈS-ALBERT M., BONNEFONT-ROUSSETOT D., ABEDINZADEH Z. et JORE D., 2003-** Espèces réactives de l’oxygène : Comment l’oxygène peut-il devenir toxique?. *Mécanismes biochimiques.*, 91-96.

**GILLERY P., 2006-** Stress oxydant et glycation des protéines au cours du diabète sucré *Oxidative stress and proteinglycation in diabetesmellitus. Ann. Biol. Clin.*, 64 (4) : 309-14.

**GÓTH L., LENKEY A. et BIGLER W-N., 2001-** Blood Catalase Deficiency and Diabetes in Hungary. *DIABETES CARE.*, 24 (10) : 1839-1840.

**GÓTH L. et NAGY T., 2013-** Inherited catalase deficiency: Is it benign or a factor in various age related disorders?. *Mutation Research.*, 753 : 147–154.

**GOUDABLE J. et FAVIER A., 1997-**Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *NutrClinMdtabol.*, 11:115-120.

**HÄGGLÖF B., MARKLUND S.L., HOLMGREN G., 1983-**CuZn superoxidedismutase, Mn superoxidedismutase, catalase and glutathioneperoxidase in lymphocytes and rythrocytes in insulin-dependentdiabeticchildren, *ActaEndocrinol (Copenh).*, 102 : 235-239.

**HAJ MOUHAMED D., EZZAHER A., NEFFATI F., DOUKI W., GAHA L. et NAJJAR M.F., 2012-** Étude d’un marqueur du stress oxydant chez les fumeurs : le malondialdéhyde. *Immuno-analyse et biologie spécialisée.*, 27 : 153-158.

**HALENG J., PINCEMAIL J., DEFRAIGNE J.O., CHARLIER C. et CHAPELLE J.P., 2007-** Le stress oxydant. *Rev Med Liege.*, 62(10) : 628-638.

**HUET O., NGUYEN-KHOA T., DURANTEAU T. et DURANTEAU J., 2006-** Méthodes d’évaluation du stress oxydatif. *Actualités en réanimation et urgences* : 120-127.

**ICHAÏ C., QUINTARD H. et ORBAN J-C., 2011-** Désordresmétaboliques et réanimation: Du la physiopathologie au traitement. *Springer Science& Business Media.*,p520.

**INGELS C., VANHOREBEEK I., LANGOUCHE L. et VAN DEN BERGHE G., 2006-** Rôle de l’insuline et du contrôle de la glycémie en réanimation. *Réanimation.*, 15 : p474–480.

## Références bibliographiques

---

**JADOT G., 199-**Antioxydants et vieillissement, John LibbeyEurotext., P 300.

**KAJI H., KURASAKI M., ITO K., SAITO T., SAITO K., NIIOKA T., KOJIMA Y., OHSAKI Y., IDE H., TSUJI M., KONDO T. et KAWAKAMI Y., 1985-** IncreasedLipoperoxide Value andGlutathione Peroxidase Activity in Blood Plasma of Type 2 (Non-Insulin-Dependent) DiabeticWomen, *KlinWochenschr.*, 63 : 765-768.

**KNIP M. et SILJANDER H., 2008-** Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes.*Autoimmunity Reviews.*, 7: 550–557.

**LAZO-DE-LA-VEGA-MONROY M.L. et FERNÁNDEZ-MEJÍA C., 2013-** Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and the Role Of Vitamins with Antioxidant Actions.*INTECH.*, 209-232.

**LEVERVE X., 2006-** Stress oxydant et régulation de la glycémie : implications pour le syndrome métabolique., *Obes1* : 11–15.

**LOSADA M. et ALIOL., 1997-**Malondialdehyde serum concentration in type 1 diabetic with and without retinopathy, *DocumentaOphthalmologica.*, 93 : 223-229.

**LOSSER M-R., DAMOISEL C. et PAYEN D., 2009-** Métabolisme du glucose en situation pathologique aigue. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation.*, 28 : 181–192.

**MAGNAN C. et KTORZA A., 2005-** Production et sécrétion de l'insuline par la cellule  $\beta$  pancréatique Production and secretion of insulin by the pancreatic  $\beta$ -cell. *EMC-Endocrinologie.*, 2 : 241–264.

**MALARDE 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, Université Rennes 2, France., pp 211.

**MANDRUP-POULSEN T., 2003-** Beta CellDeath and Protection.*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1005: 32-42.

**MASSION P., PREISER J.C. et BALLIGAND J.L., 2002-** Les espèces réactives de l'azote : bénéfiques ou délétères ?. *Nutrition clinique et métabolisme.*, 16 : 248-252.

## Références bibliographiques

---

**MEJRBI S., LAKHDAR R., CHAIEB L., BEN CHIBANI J., MILED A. et KASSAB A., 2012-** L'impact de l'équilibre glycémique sur le statut Oxydant-antioxydant dans un échantillon de diabétiques de type 2 tunisiens, *Immuno-analyse et biologie spécialisée.*, 27, 352-356.

**MEMISOGULLARI R., TAYSI S, BAKAN E. et CAPOGLU I., 2003-** Antioxidant status and lipid peroxidation in type II.diabetes mellitus. *Cell BiochemFunct.*, 21: 291–296.

**MICHELSON A.M., 1982-** Clinical use of superoxide dismutase and possible pharmacological approaches, In: Autor AP (ed) *Pathology of oxygen.* AcademicPress, New York., p 277-302.

**NDAHIMANA J., DORCHY H. etVERTONGEN F., 1996-** Activité anti-oxydante érythrocytaire et plasmatique dans le diabète de type I, *La Presse médicale.*, vol. 25, n°5 : pp. 188-192.

**ORBAN J.C., et ICHAI C., 2008-** Complications métaboliques aiguës du diabète Acute metabolic complications of diabetesmellitus.*Réanimation médicochirurgicale.*, 17 : 761-767.

**PACKER L., RÖSEN P., TRITSCHLER H.J. et KING G.L. et AZZI A., 2000-** Antioxydants in Diabetes Management. *Global Network of Molecular&CellBiology.*, pp 371.

**PERLEMUTER L., COLLIN DE L'HORTET G. et SÉLAM J-L., 2000-** Diabète et maladies métaboliques. *Masson Editeur.*, 376 p.

**PHILIPS J.C., A.J. SCHEEN A.J. et LE REGISTRE BELGE DU DIABÈTE, 2002 -** Essais de préservation des cellules B à la phase initiale du diabète de type 1 : résultats négatifs avec l'insuline retard, mais prometteurs avec un anticorps monoclonal anti-CD3.*Rev Med Liege*2002., 57 (6): 413-417.

**PILLON N., 2010-** Rôle des hydroxy-alkénals, dérivés de peroxydation lipidique, dans la physiopathologie de l'insulino-résistance.Thèse de doctorat de l'institut national des sciences appliquées de Lyon., pp 134.

**PINCEMAIL J., MEURISSE M., LIMET R. et DEFRAIGNE J.O., 1999-** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons* .,4 (5) : 1-7.

## Références bibliographiques

---

**PINCEMAIL J., BONJEAN K., CAYEUX K. et DEFRAIGNE J-O., 2002-** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydant.Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS, Nutrition clinique et métabolisme 16., 233–239.

**PINCEMAIL J., LE GOFF C., CHARLIER C., GILLION P., CHERAMY-BIEN JP., VAN HONACKER E., CHAPELLE J-P. et DEFRAIGNE JO., 2009-** Evaluation biologique du stress oxydant. Nutritions&Endocrinologie :16-31

**PUTNAM C.D., ARVAI A.S., BOURNE Y. et TAINER J.A., 2000-** Active and Inhibited Human Catalase Structures: Ligand and NADPH Binding and Catalytic Mechanism.J. Mol. Biol.. 296 : 295-309.

**RACCAH D., 2004-** Épidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré Epidemiology and physiopathology of degenerative complications of diabetes. EMC-Endocrinologie., 1 : 29–42.

**RIANT E.-2009,**effets protecteurs des oestrogènes sur l'insulino-résistance et le diabète de type 2, Thèse de doctorat, Université Toulouse III, France, pp : 172.

**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-** Définition et classification du diabète. Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique., 25(2) : 91-93.

**ROUSSEL A.M. ET FERRY M., 2002-** Stress oxydant et vieillissement.Volume, Pages 285–291.

**RUIZ C., ALEGRÍA A., BARBERÁ R., FARRÉ R. et LAGARDA M.J.,1999-** Lipidperoxidation and antioxidant enzyme activities in patients with type 1 diabetesmellitus. Scand J Clin Lab Invest., 59: 99-106.

**SALTIEL A.R.,et KAHN C.R.,2001-** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature.414: 799-806.

**SATO K., ITO K., KOHARA H., YAMAGUCHI Y., ADACHI K. et ENDO H., 1992-** Negative Regulation of Catalase Gene Expression in Hepatoma Cells. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Vol. 12, No. 6 : 2525-2533.

## Références bibliographiques

---

**SECHI L.A., CERIELLO A., GRIFFIN C.A., CATENA C., AMSTADP., SCHAMBELAN M. et BARTOLI E., 1997-** Renal antioxidant enzyme mRNA levels are increased in rats with experimental diabetes mellitus. *Diabetologia.*, 40: 23–29.

**SEEMATTER G., CHIOLERO R. et TAPPY L., 2009-** Métabolisme du glucose en situation physiologique. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 28., e175-e180.

**SENDUR F.O., TURAN Y., TASTABAN E., et SERTER M., 2009-** Statut antioxydant chez des patientes ostéoporotiques : une étude contrôlée., *Revue du Rhumatisme* 76 : 887–891.

**TAMION F., CLABAULT K., BONMARCHAND G., 2003-** Ischémie-reperfusion mésentérique lors des états de choc : principaux aspects physiopathologiques. *Réanimation* ., 12 : 441-448.

**TING HSU W., YU TSAI L., KAI LIN S., KUEI HSIAO J. et HSIUN CHEN B., 1987-** Effects of Diabetes Duration and Glycemic Control on Free Radicals in Children with Type 1 Diabetes Mellitus. *Annals of Clinical & Laboratory Science.*,36 (2) : 174-178.

**TRAUB O. et VAN BIBBER R., 1995-** Role of nitric oxide in insulin-dependent diabetes mellitus-related vascular complications. *West J Med.*, 162(5): 439–445.

**TURKINAT.I., MARCHENKO L.F., ZEZEROV A.E. et POZNIAK T.I., 1991-** The indices of the lipid peroxidation and desaturation of the blood serum in diabetes mellitus in children. *ProbEndokrinolMosk.*, 37: 13-5.

**WALLBERG M. et COOK A., 2013-** Immune mechanisms in type 1 diabetes. *Trends in Immunology.*,34 (12): 583-591.

**WEILL B. et BATTEUX F., 2003-** Immunopathologie et réactions inflammatoires. éditeur : De Boeck Supérieur ., pp 312.

**WIERUSZ-WYSOCKA B., WYSOCKI H., BYKS H., ZOZULINSKA D., WYKRETOWICZ A. et KAZMIERCZAK M., 1995-** Metabolic control quality and free radical activity in diabetic patients. *Diabetes Res ClinPract.*, 27: 193-7.

**YAN H. et HARDING J.J., 1997-** Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochem. J.*, vol. 328: 599-605.

# Annexes

# ANNEXE I

---

## **Matériel non biologique**

- ❖ Micropipettes
- ❖ Congélateur à – 80
- ❖ Réfrigérateur à + 4
- ❖ Centrifugeuse de paillasse (Humax4K Human)
- ❖ Spectrophotométrie (SHIMADZU UV-1601)
- ❖ Spectrophotométrie de biochimie (WP 21B)
- ❖ Bain marie (MEMMERT)
- ❖ Vortex (MS1 Minishaker)
- ❖ Tubes héparinés, EDTA et secs
- ❖ Tube à essais en plastique
- ❖ Tubes à vis
- ❖ Cuve en quartz
- ❖ Portoir en plastique
- ❖ Embouts jaune et bleu

## **Réactifs**

- ❖ Kit pour glycémie
- ❖ Kit pour l'hémoglobine glyquée A1c
- ❖ Kit pour les protéines totales

## ANNEXE II

### FICHE DE RENSEIGNEMENT

#### **INFORMATIONS PERSONNELS**

Nom Prénom : .....

Sexe : H |\_\_| ou F |\_\_| Age : .....

Résidence : .....

Profession : .....

Médecin traitant : .....

Externe : |\_\_| ou Hospitalisé : |\_\_|

Hôpital : .....

#### **INFORMATIONS CLINIQUES :**

- Type de diabète suspecté : Type1  LADA
- 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 : ..... comprimés ? ..... insuline ? .....
- Equilibre glycémique : Bon  Moyen  Mauvais

#### **CRITERES D'INCLUSION :**

- Début explosif rapide
- Acidocétose inaugurale  ; Autres : .....
- syndrome cardinal (polyurie  , polydipsie  , amaigrissement  )
- HbA1c ↑  ..... glycémie ↑  .....

#### **Evolution des valeurs de la glycémie :**

1<sup>ère</sup> mesure : ..... 2<sup>ème</sup> mesure : ..... 3<sup>ème</sup> mesure : .....

#### **COMPLICATIONS :**

- Néphropathie  Neuropathie  Rétinopathie  Microangiopathie  Macroangiopathie

**PATHOLOGIE AUTO-IMMUNE ASSOCIEES** : .....

#### **FACTEURS DE RISQUES :**

Tabac :  ; Autres : .....

## ANNEXE II

---

### **Antécédents familiaux** : Type DT1 ou DT2

**Parents diabétiques ?** : Père : oui , non  ; type..... Mère : oui ; non ; type.....

Combien de frères :..... ? Combien sont Diabétique :.....quel type.....

Combien de sœurs :..... ? Combien sont Diabétique :.....quel type.....

### **Coté maternel :**

**Grand père diabétiques ?** : Oui , non  . Si oui quel type .....

**Grand-mère diabétiques ?** : Oui , non . Si oui quel type .....

## ANNEXE III

---

### Composition des réactifs

#### ❖ Glucose

##### Réactif de travail (Enzymes)

Tampon de phosphate (pH 7,5).....	100 mmol/l
4-aminophénazone.....	0,25 mmol/l
Phénol.....	0,75 mmol/l
Glucose oxydase (GOD).....	15 KU/l
Peroxydase (POD).....	1,5 KU/l
Mutarotase.....	2,0 KU/l
Azide de sodium.....	0,095 %
Stabilisants	

##### Standard

Étalon Glucose.....	100 mg/dl ou 5,55 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

## ANNEXE III

---

### 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

## Annexe IV

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

Moyenne $\pm$ SEM	DT1 N=22	Témoin N=23	P value	Significativité
Catalase (U/min/mg de protéine)	0,28 $\pm$ 0,047	0,61 $\pm$ 0,122	0,0070	(**)

**Tableau IV :** Evaluation de la variation des taux de la catalase en fonction de la durée du diabète type1.

Durée (moyenne)	0_5 N=9	5_10 N=6	10_15 N=4	>15 N=3	P value	Significativité
Catalase (U/min/mg de protéine)	0,28 $\pm$ 0,067	0,34 $\pm$ 0,090	0,29 $\pm$ 0,101	0,19 $\pm$ 0,12	P=0,0001	***

**Tableau V :** Variation des taux de la catalase en fonction de l'hémoglobine glyquée chez les DT1.

HBA1C %	6_6,5 N=2	6,5_7 N=3	7_8 N=4	>8 N= 13	P value	Significativité
Catalase (U/min/mg de protéine)	0,04 $\pm$ 0,03	0,15 $\pm$ 0,006	0,25 $\pm$ 0,08	0,3 $\pm$ 0,05	p>0.05	NS

56

**Tableau VI:** Variation des taux de la catalase en fonction de peptide C chez les DT1.

	Peptide-C <1,57 (n=15)	Peptide-C >1,57 (n=7)	P value	Significativité
Catalase (U/min/mg de protéine)	0,23 $\pm$ 0,048	0,25 $\pm$ 0,0530	P=0,81	NS

## Annexe IV

**Tableau VII :** Evaluation de la variation des taux de la catalase en fonction des taux de glycémie chez les DT1.

	Glycémie <1,26 N=5	Glycémie >1,26 N=17	P value	Significativité
<b>Catalase (U/min/mg de protéine)</b>	0,54±0,002	0,27±0,05	P=0,000002	***

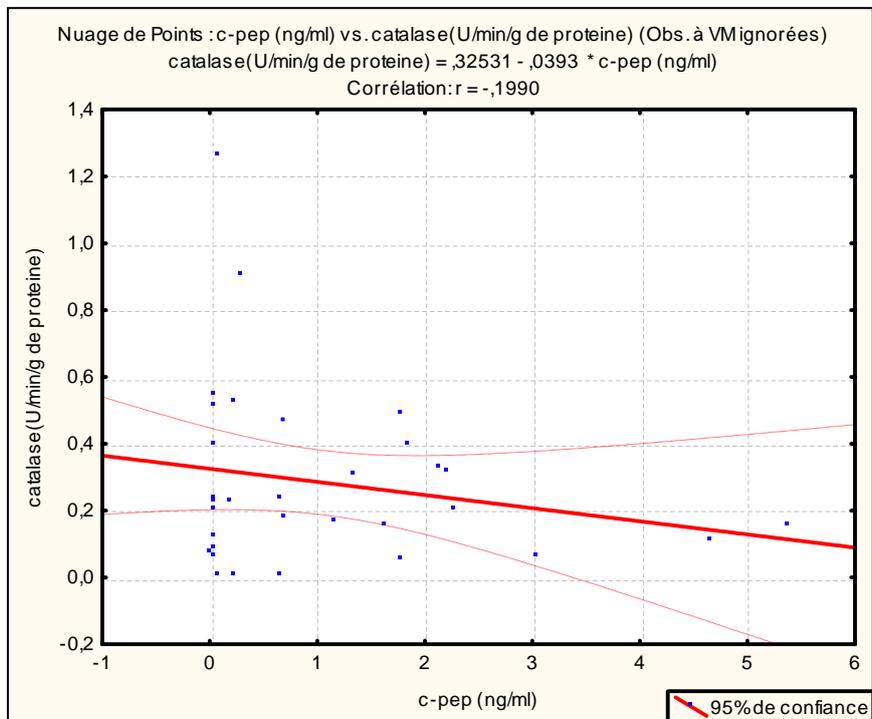
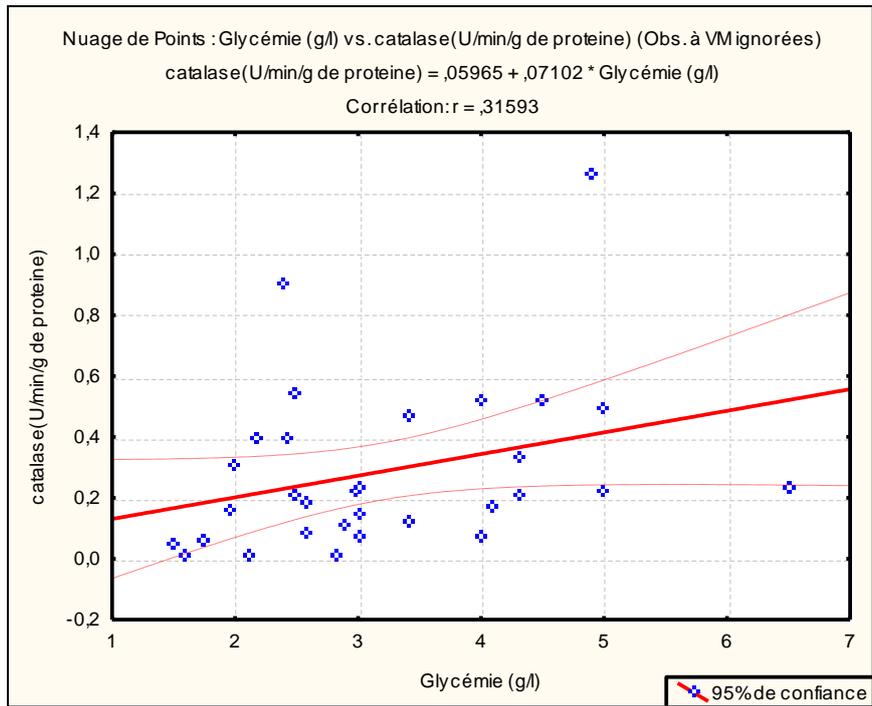
**Tableau VIII :** Evaluation de la concentration du MDA chez les diabétiques de type1 et les témoins.

	Diabète type1 N=22	Témoins N=23	P value	significativité
<b>MDA (µmol/ml)</b>	2,8±0,27	0,63±0,02	0,00001	Très significative

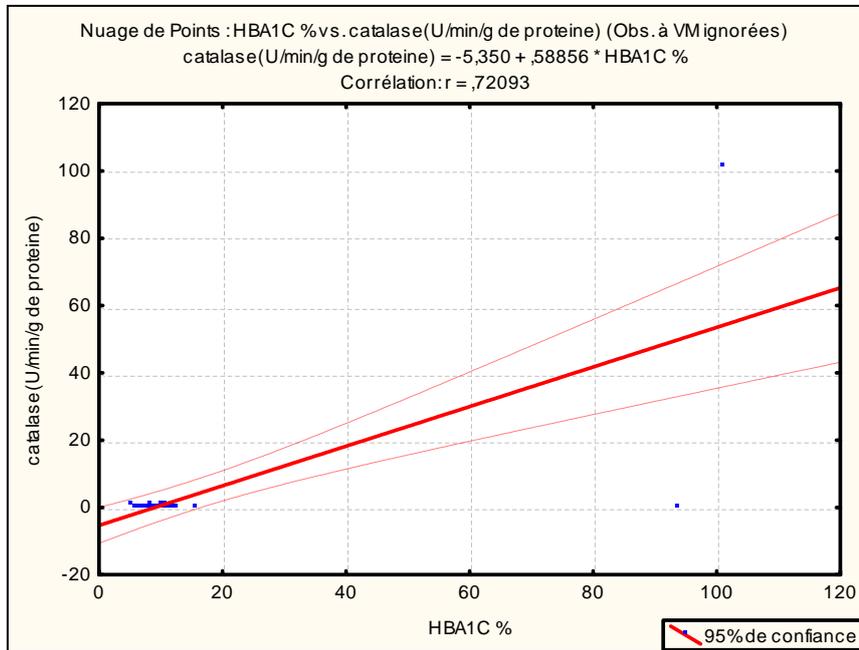
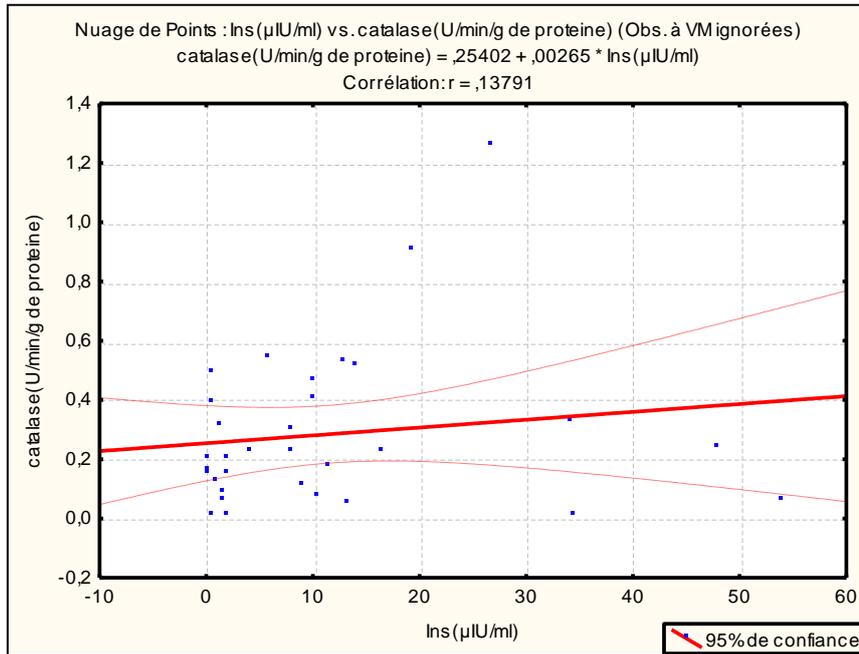
**Tableau IX :** Evaluation de la concentration de monoxyde d'azote chez les diabétiques de type1 et les témoins.

	Diabète type1 N=22	Témoin N=23	P value	significativité
<b>NO</b>	0,3955 ± 0,04031	0,2130 ± 0,02413	P=0,0002	***

# Annexe V



# Annexe V



# Annexe V

