

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

Option : Génie biologique

THEME

INTÉRÊT DU DOSAGE DES PRODUITS
PROTÉIQUES D'OXYDATION AVANCÉE
(AOPP) CHEZ UNE POPULATION DE
DIABÉTIQUE DE TYPE 1 HYPERTENDUE ET
NON HYPERTENDUE

Présenté par :

soutenu le 28-07-2016

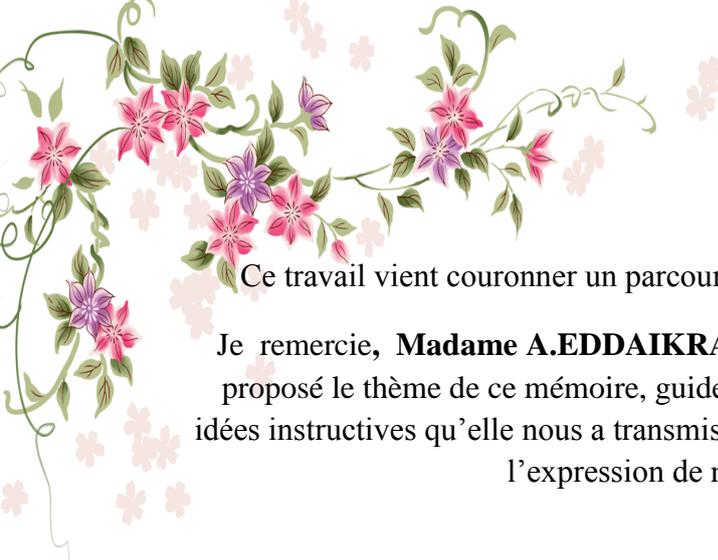
M^{lle} CHADI ASMA

M^{lle} ARABDIOU WARDA

Membre de jury :

SAIDI.F	Professeur	Université de Blida 1	Présidente
KHALDOUN.H	M.C.B	Université de Blida 1	Examinatrice
EDDAIKRA.A	M.A.A	Université de Blida 1	Promotrice

Promotion 2015/ 2016



Ce travail vient couronner un parcours d'étude. Il a été mené à terme grâce à **Dieu**.

Je remercie, **Madame A.EDDAIKRA M.A.A**, Université de Blida 1, de nous avoir proposé le thème de ce mémoire, guidé dans les grandes lignes de ce sujet, et pour les idées instructives qu'elle nous a transmis afin que le travail soit correct, qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.

Mes sincères remerciements s'adressent aux membres du jury qui ont accepté de lire et juger ce travail. **Le Professeur SAIDI.F** qui a bien voulu nous honorer en présidant ce jury, malgré ses énormes préoccupations.

De même que **M^{me} KHALDOUN.H** qui a bien voulu juger ce travail, et enrichir le débat aux côtés de **M^{me} EDDAIKRA.A**, notre promotrice.

Son achèvement n'aurait pu voir le jour sans la collaboration de nombreuses personnes qu'il nous est agréable de remercier.

Je tiens dans un premier temps à remercier ma sœur pour son aide, et ses précieux conseils.

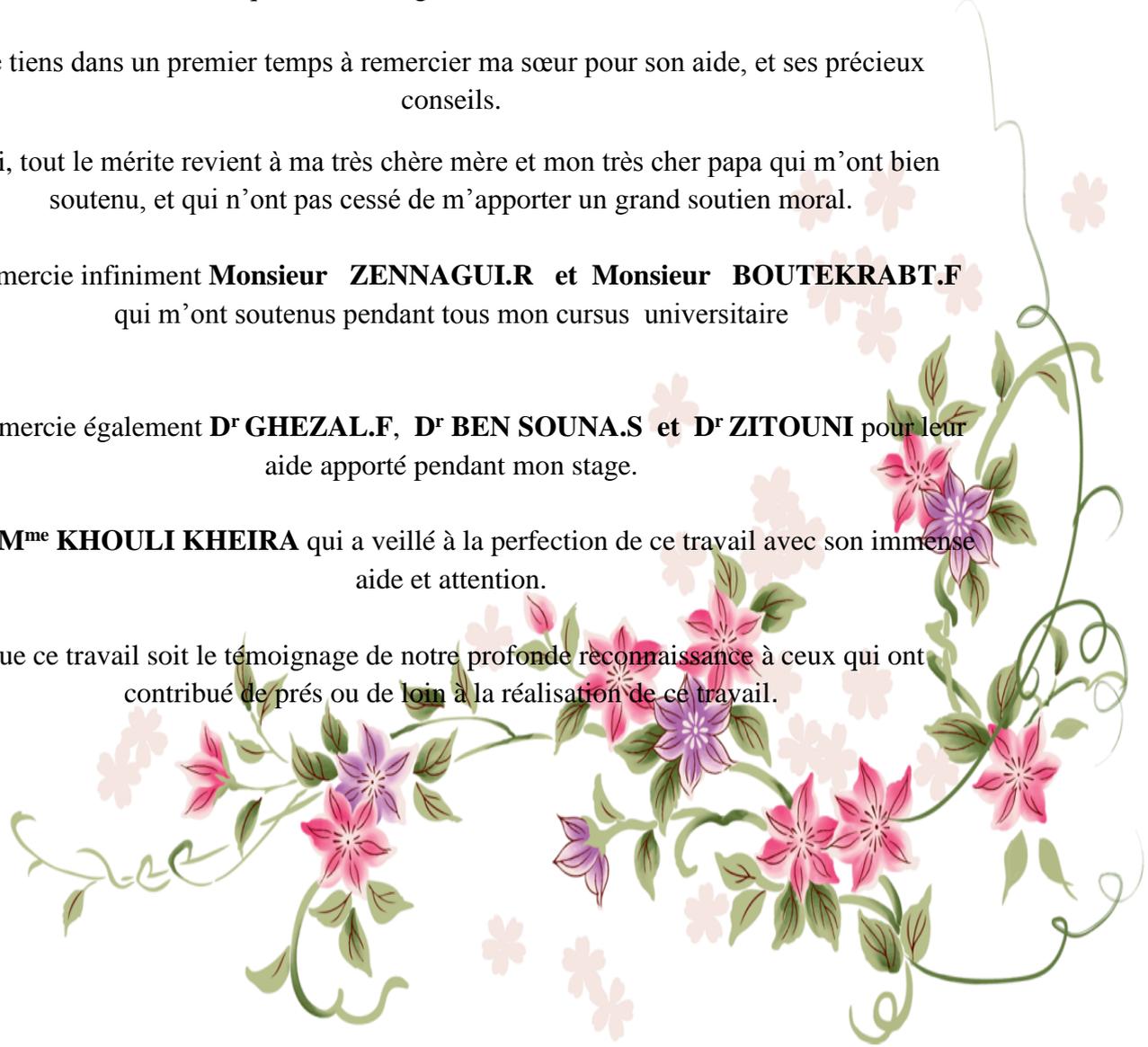
Oui, tout le mérite revient à ma très chère mère et mon très cher papa qui m'ont bien soutenu, et qui n'ont pas cessé de m'apporter un grand soutien moral.

Je remercie infiniment **Monsieur ZENNAGUI.R** et **Monsieur BOUTEKRABT.F** qui m'ont soutenus pendant tous mon cursus universitaire

Je remercie également **D^r GHEZAL.F**, **D^r BEN SOUNA.S** et **D^r ZITOUNI** pour leur aide apporté pendant mon stage.

Ainsi **M^{me} KHOULI KHEIRA** qui a veillé à la perfection de ce travail avec son immense aide et attention.

Que ce travail soit le témoignage de notre profonde reconnaissance à ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Dédicaces

Gladys Bronwyn Stern a dit :

« La reconnaissance silencieuse ne sert à personne »

*En témoignage de ma profonde reconnaissance, je dédie
ce travail :*

*A celle qui m'a donné la vie et qui a fait de moi celle que
je suis, ma très chère maman*

*A celui qui n'a jamais douté de moi et qui m'a toujours
soutenu dans mes choix, mon très cher papa*

*A ma petite sœur et mon petit frère, je vous souhaite
beaucoup de réussite*

*A chaque membre de ma future belle famille, pour toute
l'attention qu'ils m'accordent*

*A ceux avec qui j'ai partagé tous mes délires et qui m'ont
apporté leur soutien et encouragements inconditionnels,
ils se reconnaîtraient...*

ASMA CHADI



DEDICACES

Je dédie ce Mémoire de fin d'étude à toutes personnes que j'aime et spécifiquement À :

Ma chère mère FARIDA ,qui m'a aidée et encouragée tout le temps pour ma réussite.

Mes merveilleux frères AMINE, MOUHAMED ET FETHANOUR, pour leurs soutien et leurs conseils.

Mes enseignant(e)s du département de BPO.

Une spéciale citation à : Mon très chér papa BRAHIM, qui est mort il ya quelques mois.

Toute ma famille et mes amies.

ARABDIOU.WARDA



RESUME

Cette étude a été menée afin d'évaluer chez des patients atteints de diabète de type 1 (auto-immun), d'une part le taux des produits protéiques d'oxydation avancée, marqueurs clés de l'oxydation des protéines (AOPP) et d'autre part d'étudier la relation de ces AOPPs avec différents caractéristiques cliniques.

Notre étude a été réalisée sur 33 sujets diabétiques de type 1 hypertendus et non hypertendus d'apparences saines et 33 sujets témoins sain recrutées au niveau des différents établissements de santé. A coté de l'évaluation du statut oxydatif (MDA, catalase) et la mesure un des paramètres anthropométrique (IMC) et hémodynamique (pression artérielle) le dosage des paramètres biochimiques : lipidique, rénale et hépatique on été effectuer a fin de vérifier l'apparence saine de nos diabétiques et témoins.

Nos résultats montrent que notre population diabétique est caractérisée par un poids normal, une pression artérielle équilibrés au même titre que le statut lipidique rénale et hépatique. Ainsi qu'un âge moyen de $36,11 \pm 2,21$ ans avec une prédominance féminine et une valeur d'hémoglobine glyquée de $8,02 \pm 2,04$ %. Nos résultats montrent également que le taux de l'AOPP est plus élevé chez les DT1 par rapport aux témoins sans aucune différence significative entre les deux sexes et les groupes de diabétiques classé en fonction de la durée du diabète.. En revanche, il existe une différence hautement significative entre le taux de l'AOPP et l'âge du début du diabète.

La peroxydation lipidique est ainsi plus élevée chez les DT1 alors que le taux de l'activité anti-oxydante (catalase) est plus faible chez les DT1 par rapport aux témoins.

Nos résultats montrent aussi que le taux de l'AOPPs est négativement corrélé avec le statut glycémique (glycémie et HbA1c) et le MDA, cependant une corrélation faiblement positive avec l'activité de la catalase

Les concentrations élevées de l'AOPP au cours d'une hyperglycémie chez les DT1 suggèrent son implication dans la glycooxydation et les dommages oxydatifs protéiques confirmant ainsi un état de stress oxydatif.

Mots clés : Diabète type 1, l'AOPP, Stress oxydatif, oxydation protéique, MDA, catalase.

ملخص

أجريت هذه الدراسة لتقييم معدل منتجات بروتين الأكسدة المتقدمة من جهة التي تعتبر مؤشرات مفتاحية لأكسدة البروتينات، و دراسة العلاقة بين هذه المنتجات و الخصائص السريرية المختلفة لدى المرضى المصابين بداء السكري نوع واحد (المناعة الذاتية).

أجريت دراستنا على 33 شخصا مصاب بالداء السكري من النوع 1 مع و عدم ارتفاع ضغط الدم ذوي المظهر الصحي و 33 شخصا سليمين تم تجنيدهم في مختلف المرافق الصحية. إلى جانب تقييم وضع الأكسدة (MDA، الكاتلاز) وقياس مؤشر كتلة الجسم و ضغط الدم، تم تحديد القياسات البيوكيميائية: الخاصة بالدهون و الكلية و الكبد للتأكد من المظهر الصحي لمرضى السكري و غيرهم.

نتائجنا تظهر ان مجموعة مرضى السكري نوع 1 يتميزون بوزن طبيعي و ضغط دم متوازن مثله مثل القياسات البيوكيميائية: الخاصة بالدهون و الكلية و الكبد، كما يبلغ متوسط اعمارهم 36.11 ± 2.21 سنوات مع غلبة الإناث وقيمة الهيموجلوبين السكري 8.02 ± 2.04 ٪.

نتائجنا أظهرت ايضا ان معدل منتجات بروتين الأكسدة المتقدمة مرتفع لدى مرضى السكري نوع واحد مقارنة بالشهود مع عدم وجود فرق بين الجنسين و المجموعات السكري المصنفة وفقا لمدة من مرض السكر. بالمقابل يوجد فرق كبير بين معدل بروتين الأكسدة المتقدمة و بين بداية السكري .

أظهرت نتائجنا ان معدل بيروكسيد الدهون أكثر ارتفاعا عند مرضى السكري نوع واحد , في حين أن الكاتلاز كان منخفض عندهم مقارنة بالشهود. تحليل الانحدار لدى المصابين بالسكري مكن من وجود علاقة سلبية ضعيفة بين بروتين الأكسدة المتقدمة و المألون ثنائي الالدهيد و علاقة ايجابية مع الكاتلاز ,

التركيزات المرتفعة لمنتجات بروتين الأكسدة المتقدمة اثناء ارتفاع نسبة السكر في الدم عند المرضى المصابين بالسكري نوع تقترح مشاركتها في الأكسدة السكرية و الأضرار التأكسدية البروتينية و أيضا الاجهاد السكري.

الكلمات المفتاحية : السكري نوع واحد، منتجات بروتين الأكسدة المتقدمة، الإجهاد التأكسدي، الأكسدة البروتينية ، MDA، الكاتلاز ,

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate in patients with type 1 diabetes (autoimmune), firstly the rate of advanced oxidation protein products, key markers of protein oxidation (AOPP) and secondly to investigate the relationship of these AOPPs with different clinical characteristics.

Our study was conducted on 33 subjects with diabetes type 1 hypertensive and non hypertensive with healthy appearances and 33 healthy control subjects recruited in the various health establishment. Besides the evaluation of oxidative status (MDA, catalase) and a measurement of anthropometric parameters (BMI) and hemodynamic (blood pressure) the determination of biochemical parameters: lipid, one kidney and liver were performed in purpose of verifying the healthy appearance of our control and diabetic.

Our results show that our diabetic population is characterized by normal weight, blood pressure balanced as well as the renal and hepatic lipid status. And an average age of 36.11 ± 2.21 years with a female predominance and a glycosylated hemoglobin value of $8.02 \pm 2.04\%$.

Our results also show that the rate of AOPP is higher in T1DM compared to controls with no significant difference between the sexes and diabetic groups classified according to the duration of diabetes.. However, there is a highly significant difference between the rate of AOPP and the age of onset of diabetes.

Lipid peroxidation is thus higher in T1D while the rate of antioxidant activity (catalase) is lower in T1DM compared to controls.

Our results also show that the rate of AOPPs is negatively correlated with glycemic status (blood glucose and HbA1c) and MDA, however, a weak positive correlation with the activity of catalase

High concentrations of AOPP during a hyperglycemia in T1DM suggests its involvement in the glycooxidation and protein oxidative damage confirming a state of oxidative stress.

Keywords: Type 1 diabetes, AOPPs, oxidative stress, protein oxidation, MDA, catalase.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydant	3
Figure 2 : Produits d'oxydation des résidus acides aminés par l'acide hypochloreux	5
Figure 3 : Sources des espèces réactives de l'oxygène.....	8
Figure 4 : Altérations de l'ADN entraînées par attaque radicalaire du patrimoine génétique de la cellule.....	9
Figure 5 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés, et la nature des produits terminaux formés	10
Figure 6 : Modification des protéines et les pathologies associées	11
Figure 7 : Exemple d'attaque des EROS sur les acides aminés.....	12
Figure 8 : Devenir des protéines oxydées	13
Figure 9 : Principales voies métaboliques du stress oxydatif lié à la surstimulation des phagocytes	14
Figure 10 : Récepteurs et voie de signalisation des AOPPs	16
Figure 11 : Pyramide des systèmes de défenses antioxydants	18
Figure 12 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques	19
Figure 13 : développement du diabète type 1	21
Figure 14 : L'activation des cellules T CD ₄ ⁺ par les cellules présentatrice d'antigène.....	22
Figure 15 : Rôle des macrophages dans le développement du diabète auto-immun	23
Figure 16 : Étiologie du diabète type 1.....	24
Figure 17 : Schéma de la molécule d'insuline	25
Figure 18 : Synthèse d'insuline et transport intracellulaire.....	26

Figure 19 : Stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose par un mécanisme ATP dépendant.....	27
Figure 20 : Effet du stress oxydant sur la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatique	28
Figure 21 : Relation entre l'hyperglycémie et le stress oxydant.....	29
Figure 22 : Voies oxydatives de stress dans le diabète sucré.....	32
Figure 23 : Le complexe entre le cuivre alcalin et les liaisons peptidiques.....	49
Figure 24 : formation d'adduit-TBA.....	52
Figure 25 : Surnageant pour le dosage du MDA après centrifugation.....	53
Figure 26 : Evaluation du taux moyen de l'AOPP chez les diabétiques et les témoins.....	61
Figure 27 : Variation des taux de l'AOPP chez les femmes et les hommes atteint de DT1....	63
Figure 28 : Variation des taux de l'AOPP en fonction de l'âge du début du diabète.....	65
Figure 29 : Variation des taux de l'AOPP en fonction de la durée du diabète.....	66
Figure 30 : Variation des taux de l'AOPP en fonction de l'hémoglobine glyquée chez les DT1.....	68
Figure 31 : Evaluation de la peroxydation lipidique chez les diabétiques de type1 et les témoins	70
Figure 32 : Evaluation du taux moyen de la catalase chez les diabétiques de type1 et les témoins.....	73

LISTE DES TABLAUX

Tableau I : les principales espèces réactives d'oxygènes radicalaire et non radicalaire.....	4
Tableau II : Changement de la composition des acides aminés de l'albumine oxydée	15
Tableau III : Le nombre de patients diabétiques et de témoins recrutés.....	34
Tableau IV: Composition des 03 tubes pour le dosage du glucose.....	37
Tableau V: Composition des 3 tubes pour le dosage des triglycérides	40
Tableau VI : Composition des tubes pour le dosage du cholestérol	42
Tableau VII: Composition des tubes pour le dosage de la créatinine.....	46
Tableau VIII: Composition des tubes pour le dosage de l'urée.....	48
Tableau IX : Composition des tubes pour le dosage des protéines totaux	49
Tableau X: Composition des tubes pour le dosage de l'acide urique.....	50
Tableau XI: Composition des tubes pour le dosage du magnésium.....	51
Tableau XII : Caractéristiques cliniques et épidémiologique de la population de l'étude.....	56
Tableau XIII : Evaluation de la concentration de l'AOPP chez les diabétiques de type 1 et les témoins	61
Tableau XIV : Evaluation de la variation des taux de l'AOPP en fonction du sexe chez les DT1	63
Tableau XV : Variation des taux de l'AOPP selon l'âge du début du diabète	65
Tableau XVI : Evaluation des taux de l'AOPP selon la durée du diabète	66
Tableau XVII : Variation des taux de l'AOPP en fonction de l'hémoglobine glyquée chez les DT1.....	68
Tableau XVIII : Evaluation de la concentration du MDA chez les diabétiques et les témoins	70
Tableau XIX : Evaluation des taux de la catalase chez les DT1 et les témoins	73

LISTE DES ABREVIATIONS

ADA	American Diabetes Association
ADP	adénosine diphosphate
AR	Aldose Réductase
AGE	Advanced Glycation End-products.
AOPP	Advanced Oxidation Proteins Products
ATP	Adénosine triphosphate
CD	Cellule Dendritique
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
DAG	Di-acyl-glycérol
DT1	Diabète de Type 1
ERN	Espèces Réactives de l'Azote.
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène.
FRO	Forme Réactive Oxygénée.
GAD	Glutamate Acide Décarboxylase
GFAT	Glucosamine fructose amido-transférase
GLUT 1/4	Glucose Transporteur 1/4
GPx	Glutathion Peroxydase.
Grb2	Growth factor Receptor Bound 2
GSH	Glutathion réduit
HDL	High Density Lipoprotein
IA-2	Islet Antigen-2
IFNγ	Interferon gamma

IL-1β	Interleukine 1 β
IMC	Indice de Masse Corporel.
IR	Insulin Receptor
IRS	insuline receptor substrate
LDL	Low Density Lipoprotein
MDA	Malondialdéhyde.
MPO	Myéloperoxydase.
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.
NFκB	Nuclear Factor Kappa B.
NO	Monoxyde d'Azote.
NOS	Monoxyde d'Azote Synthase
NOx	NADPH oxydase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PI3K	Phosphadityl-inositol-3-kinase
PKC	Protéine Kinase C.
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End-products.
SDH	Sorbitol Déshydrogénase
SOD	Superoxyde dismutase.
TBARS	Thio Barbituric Acid Reactive Substances.
TCR	T cell receptor
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
ZnT8	Transporteur 8 de zinc

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
-----------------------------------	----------

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I.1 STRESS OXYDATIF

I.1. Stress oxydant	3
I.1.1. Définition.....	3
I.1.2. Les radicaux libres et les espèces réactives oxygénées.....	4
I.1.3. Les sources cellulaires des espèces réactives d'oxygènes.....	7
I.1.4. Cibles biologiques des espèces oxygénées activés	8
I.1.4.1. Dommages oxydatifs de l'ADN.....	9
I.1.4.2. Dommages oxydatifs des lipides	9
I.1.4.3. Dommages oxydatifs des protéines	11
I.1.5. Les produits protéiques d'oxydation avancée	14
I.1.6. Système de défense antioxydant	17

I.2 HOMEOSTATIE GLYCEMIQUE ET DIABETE TYPE 1

I.2. Diabète type 1 et homéostasie glycémique	19
I.2.1. Diabète sucré.....	19
I.2.1.1. Diabète type1.....	19
I.2.1.2. Terrain génétique de susceptibilité et facteurs déclenchant.....	20
I.2.1.3. Destruction des cellules β par un processus auto-immun.....	21

I.2.2. Régulation de la glycémie.....	24
I.2.2.1. L'insuline	25
I.2.2.2. Mécanisme de la réponse insulino sécrétoire au glucose	26
I.2.2.3. Voies de signalisation intracellulaire de l'insuline.....	27
I.2.2.4. Rôle des radicaux libres dans la sécrétion d'insuline.....	28
I.2.3. Hyperglycémie, et stress oxydant	29
I.2.3.1. Impact du stress oxydant et l'hyperglycémie sur les cellules β	29
I.2.3.2. Mécanismes impliqués dans la genèse d'un stress oxydant dans le diabète.....	30

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

II.1. Matériels.....	33
II.1.1. Matériels non biologiques	33
II.1.2. Matériel biologique	34
II.2. Méthode d'étude	34
II.2.1. Les critères de recrutement.....	34
II.2.2. Questionnaire.....	35
II.2.3. Prélèvements	35
II.2.4. Mesures de la pression artérielle	36
II.2.5. Mesure de l'indice de masse corporelle	36
II.2.6. Mesure des paramètres biochimiques.....	36
II.2.7. Mesure des paramètres du stress oxydant.....	51
II.3. Analyse statistique	54

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Etude descriptive des caractéristiques clinique et épidémiologiques de la population.....	55
III.2. Exploration du statut oxydatif.....	60
III.2.1. Distribution des taux de l'AOPP chez la population d'étude	60
III.2.2. Distribution de l'AOPP selon le sexe	63
III.2.3. Distribution des taux de l'AOPP selon l'âge du début du diabète.....	65
III.2.4. Distribution des taux de l'AOPP selon la durée du diabète.....	66
III.2.5. Etude de la variation des taux de l'AOPP en fonction de l'équilibre glycémique..	68
III.2.6. Autre paramètre du statut oxydatif.....	70
III.2.5.1. Evaluation du taux de MDA	70
III.2.5.2. Evaluation du taux de la catalase	73
CONCLUSION	76
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	78

Depuis la découverte des radicaux libres et de leurs espèces dérivées par les chimistes, l'existence de ces entités dans l'organisme vivant a amené la biologie à prendre en compte leurs rôles. Ces radicaux libres sont des espèces chimiques à très forte réactivité et capables d'oxyder une très grande variété de biomolécules dans l'organisme (**Harman, 1956**). Heureusement ! L'organisme est doté de défenses anti-oxydantes intrinsèques, dans le but de détruire ces radicaux libres.

On parle de stress oxydant lorsque l'organisme ne parvient plus à gérer ces entités, suite à une production excessive par rapport à ces capacités anti-oxydante. En effet ce stress oxydant est impliqué dans presque toutes les grandes pathologies de notre siècle tel que le diabète.

Au cours du diabète, l'hyperglycémie chronique entraîne une production excessive de radicaux oxygénés toxiques conduisant à un stress oxydant, qui est à son tour à l'origine de la destruction des cellules bêta pancréatiques au cours du diabète de type 1.

Cet état de stress conduit à long terme à des dommages oxydatifs de nombreux macromolécules, les protéines par leurs abondances relatives et leurs capacités de piéger sont considéré comme les principales cibles, et marqueurs biologiques du stress oxydatif.

L'oxydation des protéines peut conduire à une multitude de produits secondaires parmi eux : les *produits protéiques d'oxydation avancée* (AOPPs), ces derniers sont considéré à la fois comme de véritables marqueurs du stress oxydatif et d'inflammation, accumulés dans de nombreux désordres métaboliques notamment au cours du diabète et ses complications.

Partant de ce constat, l'idée originale de ce mémoire est d'étudier et d'évaluer, chez des sujets diabétiques de type 1 hypertendus et non hypertendus, l'estimation du taux des produits protéiques d'oxydation avancée (AOPPs), et de rechercher la relation du taux des AOPPs avec quelque caractéristiques cliniques (la durée, l'âge du début du diabète, et le sexe), avec l'équilibre glycémique, ainsi qu'avec d'autres paramètres du stress oxydatif (Malondialdéhyde et catalase).

Notre étude s'articule autour de trois chapitres qui englobent une recherche bibliographique concernant le stress oxydatif, le diabète et régulation de la glycémie ainsi que le lien qui se trouve entre le diabète et le stress oxydant. Le second chapitre concerne les matériels et les méthodes utilisé. Et le dernier chapitre est consacré aux résultats et discussion. Et enfin on termine par une conclusion, et des perspectives.

Rappels bibliographique

I.1. Stress Oxydant

I.1.1. Définition

Le stress oxydant est communément défini comme un déséquilibre entre le système oxydant et les capacités anti-oxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire (ROBERT, 2006 ; SARITA et AFREEN, 20013).

Un état où les niveaux des ERO submerge significativement la capacité des défenses anti-oxydantes (YUNBO, 2011), l'organisme se retrouve dans une situation où il ne peut plus contrôler la présence excessive de radicaux toxiques (HALENG *et al.*, 2007).

Il est maintenant connu que de nombreux désordres pathologiques impliquent à un degrés plus au moins important le stress oxydant (GARDES-ALBERT, 2006) tel que le diabète dont il à été observé à la fois une augmentation de la production des radicaux libres et une diminution des défenses anti-oxydantes conduisant ainsi à une augmentation des marqueurs du stress oxydant (MARITIM *et al.*, 2003) (Figure 1).

La mise en évidence du stress oxydant implique le plus souvent la détermination des anti-oxydants enzymatiques et non enzymatiques, ainsi que la mesure des dommages oxydatifs (HALENG, 2007).

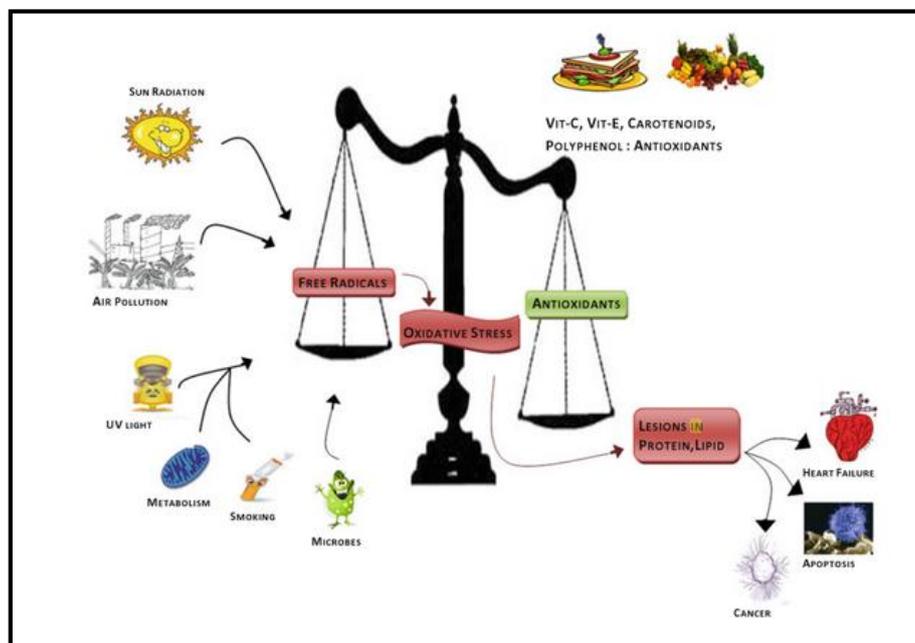


Figure 1 : La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants

(VIBHA et UMESH, 2015).

I.1.2. Les radicaux libres et les espèces réactives oxygénées (EROs)

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) qui possède un électron célibataire c'est-à-dire non apparié. Cette caractéristique le rend instable et lui procure une grande réactivité vis-à-vis des molécules environnantes (YUNBO, 2011 ; LEVERVE, 2009).

Les radicaux libres sont des molécules chimiques instables produites en faible quantité par l'organisme. Ils sont principalement synthétisés dans la cellule lors de réactions avec l'oxygène, donnant naissance dans l'organisme à des dérivés qui, chaque jour, causent des dégâts à nos cellules. Ces dérivés sont appelés Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO).

Le terme ERO est un nom collectif qui inclut non seulement les radicaux libres de l'oxygène mais aussi plusieurs espèces non radicalaires aux capacités oxydantes et contenant un ou plusieurs atomes d'oxygène. Le tableau 1 reprend la nomenclature des espèces réactives, incluant les principales ERO.

Tableau I : les principales espèces réactives d'oxygènes radicalaire et non-radicalaire.

	Radicalaires	Non –radicalaire
Les espèces réactives de l'oxygène	Anion superoxyde, $O_2^{\circ-}$ Radical hydroxyl, HO° Radical peroxyde, ROO°	Peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 acide hypochloreux, $HOCl$ oxygène singulet, 1O_2
Les espèces réactives de l'azote	Monoxyde d'azote, NO°	Peroxynitrite, $ONOO^-$ Nitrique dioxyde, NO_2 Chlorure de nitrile, NO_2Cl
Les espèces réactives du chlore	Chlore atomique, Cl°	Acide hypochloreux, $HOCl$ Chloramine, $R-NHCl$

(ADLY, 2010 avec modification)

L'anion superoxyde malgré qu'il est le moins réactif (RONDEAU, 2009), il est d'une importance capitale puisqu'il est l'espèce primaire produit dans la cellule, et de nombreux autres espèces réactives dérivés du radical superoxyde $O_2^{\circ-}$, le

radical hydroxyle OH° , le peroxy-nitrite ONOO^- , et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (THAO *et al.*, 2003), il partage avec le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 la capacité de traverser les membranes cellulaires et dont agir à distance du tissu producteur (BENJAMIN, 2015).

D'après (GARDÈS-ALBERT *et al.* (2003), la majeure partie de la toxicité du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle en présence de cations métalliques tel que l'ion ferreux Fe^{2+} par une réaction, dite de Fenton(1) :

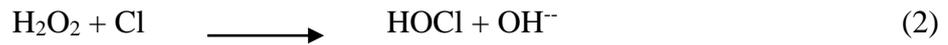


Le radical hydroxyle est considéré parmi les espèces les plus agressives et dommageables du stress oxydant (GARDÈS-ALBERT *et al.*, 2003) puisqu'il ne peut être détruit enzymatiquement (AUBERVAL, 2010), et est capable d'initier la peroxydation lipidique (GOUDABLE et FAVIER, 1997).

En comparaison le NO° est moins réactif, mais exerce son effet toxique par la formation du peroxy-nitrite en réagissant avec l'anion superoxyde (SZABO *et al.*, 2007).

Dans les circonstances quotidiennes normales (BAROUKI, 2006) les EROs sont produites en permanence à l'intérieur des cellules à des concentrations physiologiques (ANNIKA *et al.*, 2013), jouant un rôle de messager secondaire capable de réguler le phénomène d'apoptose des cellules évaluant vers un état caséux, d'activer la transcription du NF κ B et P38-MAP kinase, eux même responsables de l'activation de gènes impliqués dans la réponse immunitaire (LEVESQUE, 2006). Par contre, une surproduction des ces ERO se traduit par un effet toxique en activant des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (HALENG *et al.*, 2007), et induisant un phénomène d'apoptose dans les cellules saines (LEVESQUE, 2006).

L'acide hypochloreux (HOCl) est un puissant oxydant chloré bactéricide (MONGENS, 2013), produit par les cellules phagocytaires activées principalement par les neutrophiles grâce à l'action de la myéloperoxydase (MPO), qui a la faculté de catalyser la réaction suivante (2) (CAPEILLER *et al.*, 2004 ; BENJAMIN, 2015).



la MPO se diffuse très bien au travers les membranes, entraînant des dégâts sur les protéines et les lipides (BENJAMIN, 2015).

l'acide hypochloreux HOCl en présence de l'anion superoxyde peut générer le OH° (3), renvoyant au rôle centrale de l'anion superoxyde, qui malgré sa faible réactivité donne naissance à plusieurs espèces réactives encore plus toxiques (BENJAMIN, 2015) en réaction avec les résidus protéiques, l'HOCl génère des produits oxydés et des produits chlorés avec les groupe amines selon la réaction (4) (TOSHIO *et al.*, 2011) (Figure 2).

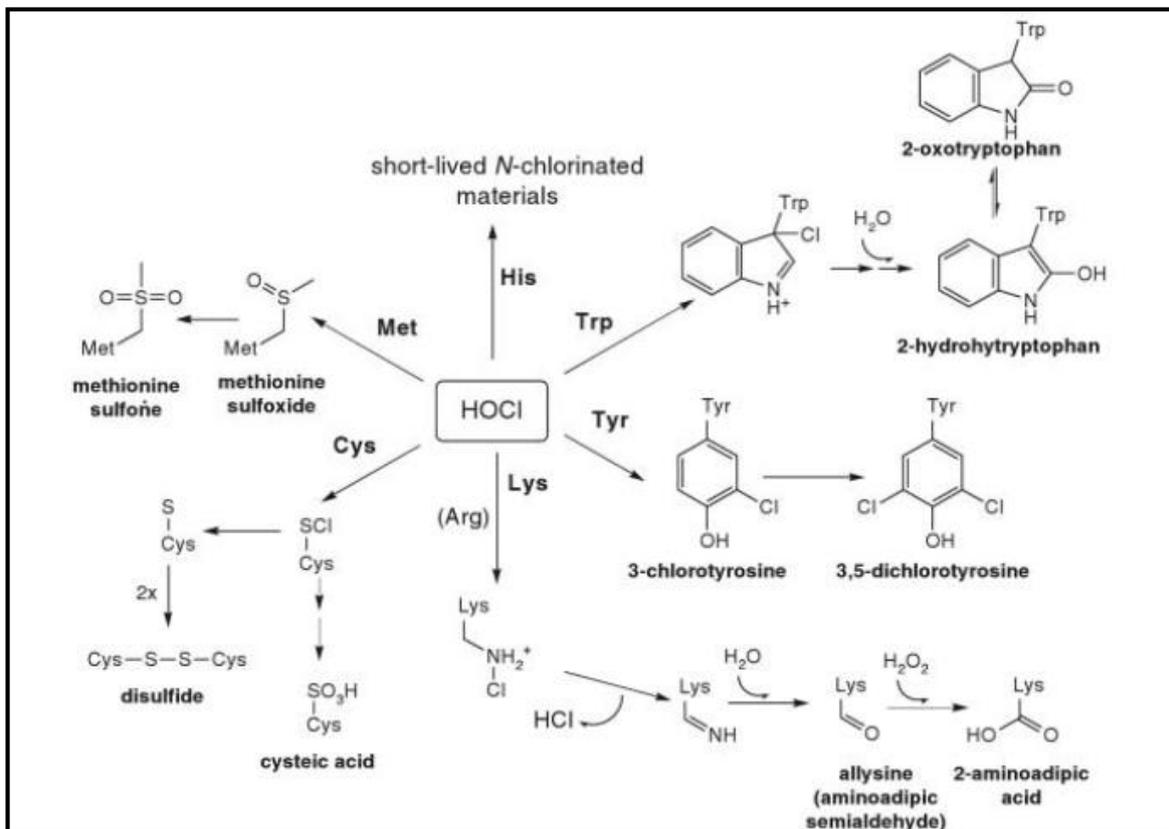
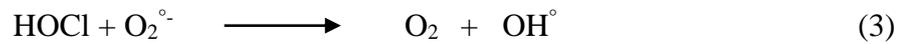


Figure 2 : Produits d'oxydation des résidus acides aminés par l'acide hypochloreux (TOSHIO *et al.*, 2011).

I.1.3. Les sources cellulaires

Les ERO sont majoritairement produites dans la mitochondrie (**Figure 3**) par la chaîne respiratoire (**RONALD, 2011**), la mitochondrie est considérée comme la principale source endogène génératrice des radicaux libres (**ANNIKA, 2013**) induit par l'hyperglycémie dans le diabète (**SARITA et AFREEN, 2013**).

le long du transport d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (**LAZO et FERNANDEZ, 2013**) 0,4 à 4% de l'oxygène moléculaire sera réduit en H₂O (**LAZO-DE-LA-VEGA MONROY, 2013**) pour fournir de l'énergie aux cellules (**HALENG et al., 2007**), et subit une réduction mono-électronique, pour produire l'anion superoxyde O₂⁻ (**RONALD St-Louis, 2011**).

Les RL sont aussi formé à partir de source non-mitochondrial (**Figure 3**) incluant des enzymes du métabolisme et de l'inflammation tels que les NADPH oxydases, (NOX), les monoxydes d'azote synthéase (Nos) et la MPO (**SARITA et AFREEN, 2013 ; BENJAMIN, 2015**), il a été démontré que l'inflammation est considéré comme un facteur contribuant à augmenter le stress oxydatif par infiltration des cellules inflammatoires (neutrophiles et monocytes) productrices d'espèces réactives (**SAVINI et al., 2013 ; SUBRATA, 2015**)

La NOX est un complexe enzymatique présent dans les membranes plasmiques des neutrophiles et des macrophages, on le retrouve aussi dans les cellules endothéliales et dans les cellules musculaires lisses (**STRALIN et MARKLUND, 2000; JAIRAM et al., 2012**). Son rôle principal est de générer le radical superoxyde O₂⁻ en transférant des électrons du NADPH au dioxygène O₂ (**BENJAMIN, 2015**), conduisant à une expansion des lymphocytes T dans le cadre de l'auto-immunité (**TSE et al., 2007**). L'isoforme phagocytaire de la NOX activée en réponse à des cytokines pro-inflammatoire (**SUBRATA, 2015**) provoque une production massive des EROs, et jouant un rôle clé dans le premier ligne de défense contre les micros organismes pathogènes (**RONALD-St-Louis, 2011**).

La Nos exprimé de manière constitutive au niveau des cellules endothéliales (eNOs) et celle exprimé de manière inductible (iNOs) dans le cytosol des hépatocytes et des cellules des ilots pancréatique (**BENJAMIN, 2015**) catalysent la

formation du NO° à partir de l'acide aminé L-arginine (HALLIWELL et GUTTERIDGE, 2008).

La MPO est une enzyme présente en grande concentration dans les granules des neutrophiles et dans une moindre mesure dans les monocytes, elle est activée durant l'explosion respiratoire des phagocytes au même titre que la NOX. La MPO est capable d'oxyder un grand nombre de substrat, en utilisant le peroxyde d'hydrogène pour produire d'autres espèces réactives de l'oxygène (HALLIWELL et GUTTERIDGE, 2008).

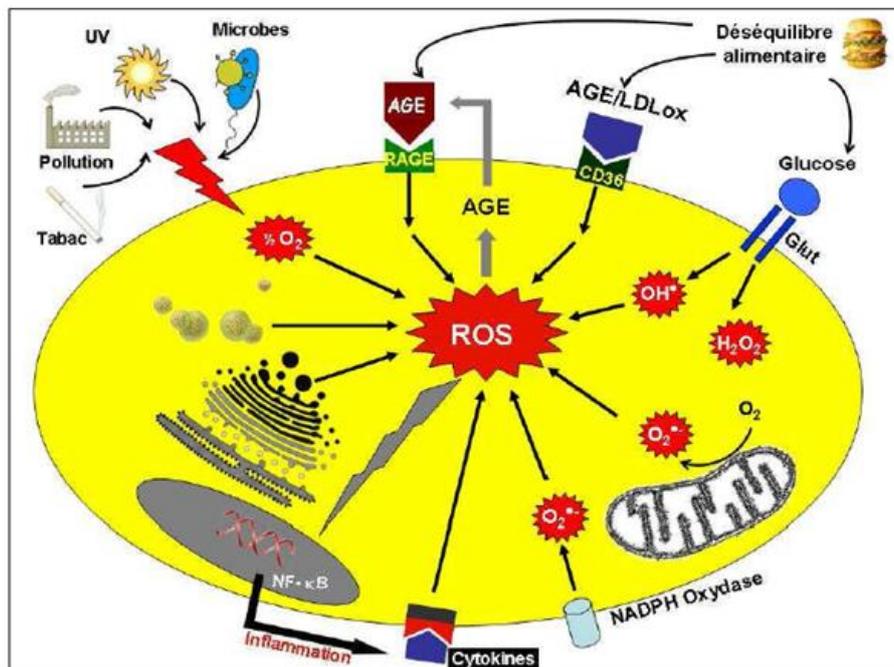


Figure 3 : les sources des espèces réactives de l'oxygène. (RONDEAU, 2009)

I.1.4. Cibles biologiques des EOA

Au cours du vieillissement les espèces réactives augmentent en raison d'une capacité limitée des systèmes anti-oxydantes et des mécanismes de réparation (ANNIKA et al., 2013), ce même concept il a été observé chez les patients diabétiques et pré-diabétiques (MAXWELL et al., 1997), ce qui conduit inévitablement à une grande modification oxydative des protéines, des lipides et des acides nucléiques (FAVIER, 2007).

I.1.4.1. Dommages oxydatifs de l'ADN

L'ADN représente la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants (FAVIER, 2003), c'est la cible privilégiée pour les EOA (HALENG et *al.*, 2007). Cinq classes principales de dommages oxydatifs médie par OH^\bullet et $\text{O}_2^{\circ-}$ peuvent être générées. Parmi elles, les sites abasiques, des adduit intra-caténaire, des cassure de brin, des pontages ADN-protéine (FAVIER, 2003), et des bases oxydées conduisant notamment à la formation de 8-exo-guanine, à l'origine de mutation génétique ce qui explique la gonocyté des RL (MOREL et BABOUKI, 1998) (Figure 4).

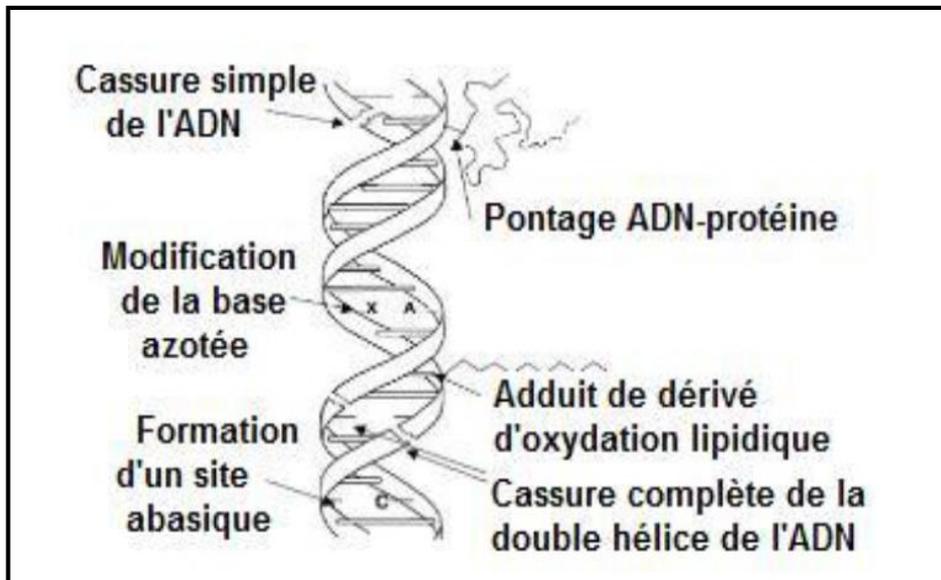


Figure 4 : les altérations de l'ADN entraînées par attaque radicalaire du patrimoine génétique de la cellule (FAVIER, 2003 ; BENJAMIN, 2015).

Notons que l'ADN mitochondrial, du fait de sa proximité avec la chaîne respiratoire site éminent de production des ERO, est particulièrement exposé à l'oxydation (BECKMAN et AMES, 1999).

I.1.4.2. Dommage Oxydatifs des lipides

Les lipides membranaires, particulièrement les acides gras polyinsaturés en raison de leur double liaison (RONALD St-Louis, 2011) sont sensibles à l'oxydation par les métaux et les radicaux libres oxygénés. Cette réaction

d'oxydation non enzymatique en chaîne, appelée peroxydation lipidique est la cible privilégiée du radical OH^\bullet (COLAS, 2010) qui se déroule en trois étapes :

- Initiation ;
- Prolongation ;
- Propagation ;

donnant la formation de très nombreux produits primaires (hydroperoxydes) ou secondaires (aldéhydes) (THEROUND, 2006) (Figure5), dont les conséquences cellulaires sont à l'origine d'une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la nécrose (HALENG *et al.*, 2007). Ainsi l'attaque des lipides circulant aboutit à la formation de LDL (lipoprotéines de densité légère) oxydées qui, captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome (SAAD *et al.*, 2006).

Parmi les aldéhydes formés, le plus connu est le dialdéhyde malonique (MDA) (LEFEVRE *et al.*, 1998), il est utilisé comme biomarqueur des dommages lipidiques et du stress oxydant, son augmentation contribue dans le développement des complications diabétiques (BRAHM *et al.*, 2013).

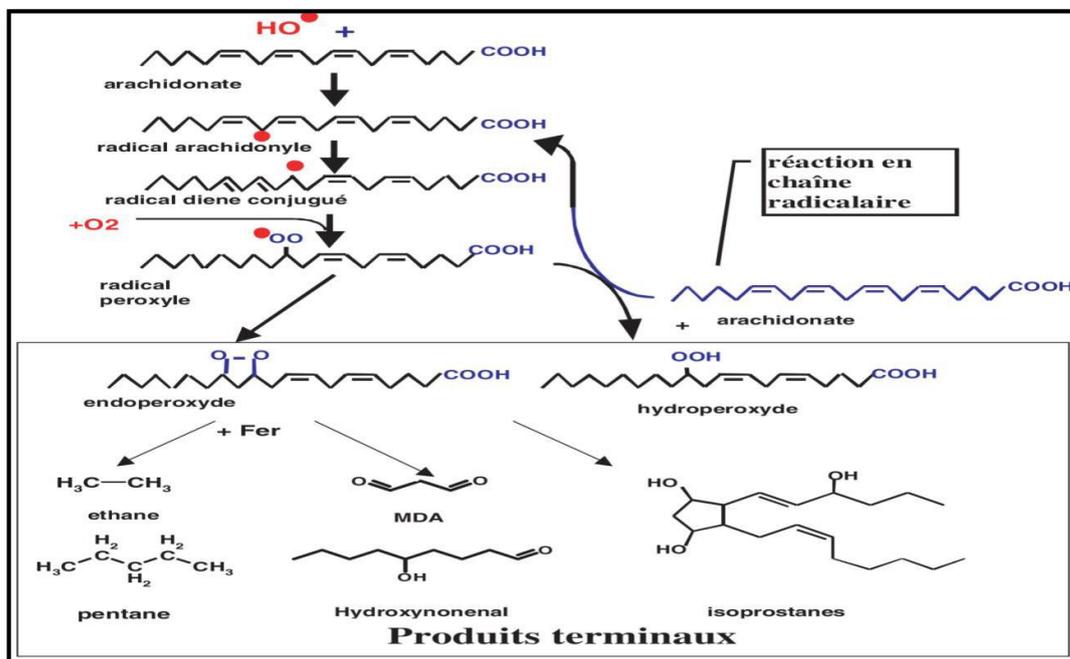


Figure 5 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés, et la nature des produits terminaux formés (FAVIER, 2003)

I.1.4.3. Dommages Oxydatifs des protéines

Les protéines sont les molécules biologiques vitales importantes pour la cellule, impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques (BRAHM, 2013), en raison de leur abondance dans les systèmes biologiques (BELKHETRI, 2010 ; ANNIKA *et al.*, 2013), et leur capacités à piéger jusqu'à 75% (JEAN-LOUIS et GENEVIEVE, 2011) les espèces réactives (GRAZIANO *et al.*, 2014), et la faible teneur des fluides extracellulaires en enzymes anti-oxydantes (WEI *et al.*, 2014) sont considérés comme des cibles majeures pour les modifications oxydatives, accompagnant les maladies neurodégénératives, et une large variété de troubles liés à l'âge (ANNIKA *et al.*, 2013). (Figure 6)

l'oxydation des protéines est un processus commun durant l'inflammation (GUILHERME *et al.*, 2016), où de nombreuses maladies inflammatoires chroniques incluant le diabète et l'athérosclérose, sont caractérisées par l'augmentation du stress oxydant et par des niveaux systémiques de protéines oxydées (GUILHERME *et al.*, 2013).

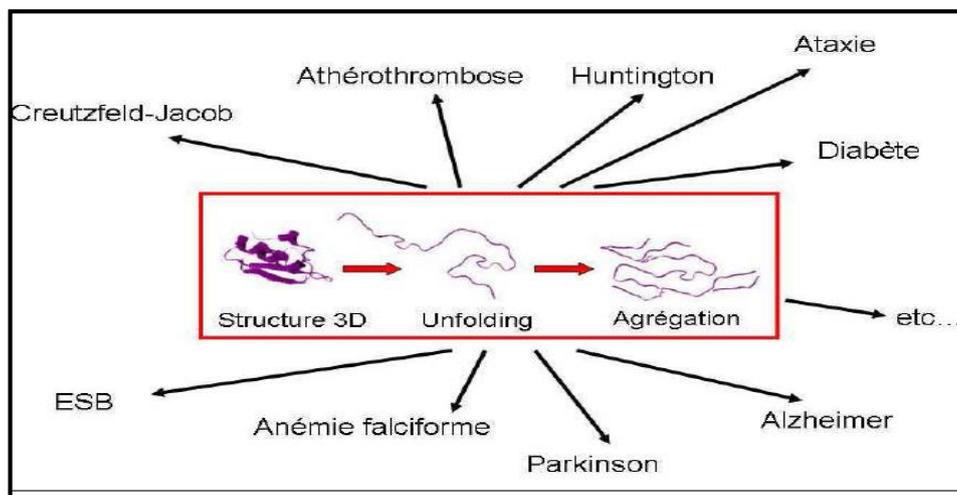


Figure 6 : La modification des protéines et les pathologies associées (RONDEAU, 2009).

En présence des espèces réactives ou leurs sous-produits comme celles de la peroxydation, les protéines peuvent subir une oxydation de leurs acides aminés les plus sensibles, tels que les acides aminés aromatiques et sulfurés (FINKEL, 2000 ; ANNIKA *et al.*, 2013) (Figure 7) .

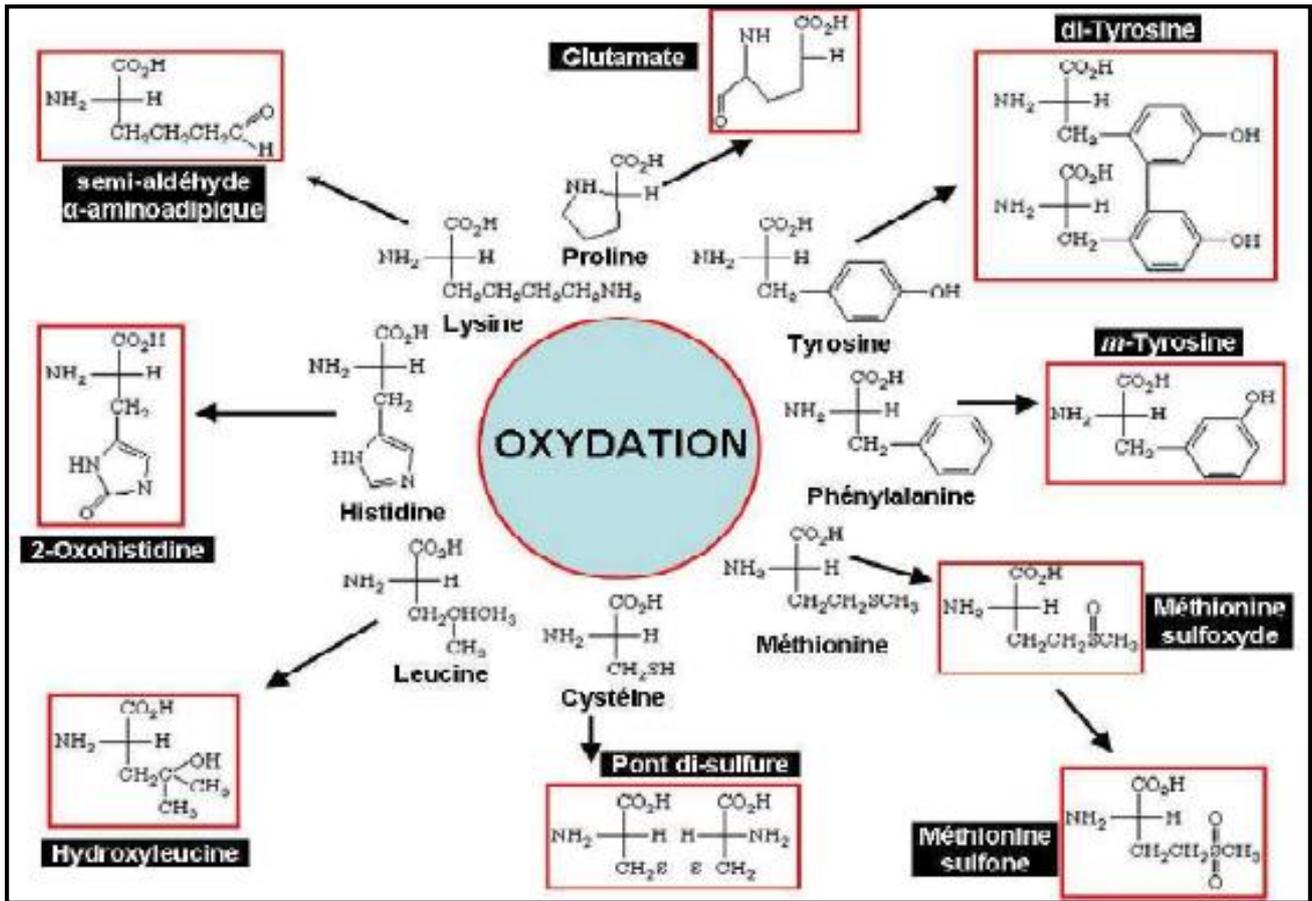


Figure7 : Exemple d'attaque des EROS sur les acides aminés (RONDEAU, 2009).

Tous ces attaques oxydatifs ont par conséquent la modification de la structure, et de la fonction des protéines, ainsi que ses caractéristiques spectroscopiques (WITKO-SARSAT *et al.*, 1999), et peut également conduire à la formation de protéines réticulées de poids moléculaire plus élevé et/ou des produits protéiques de poids moléculaire inférieur (RODNEY, 2002) due à la fragmentation par oxydation de la chaîne carbonée (VIBHA et UMESH, 2015) (DALLE-DONE *et al.*, 2005 ; BACHI *et al.*, 2013) qui seront prises en charge par des systèmes de réparation ou d'élimination (RONDEAU, 2009) (Figure 8).

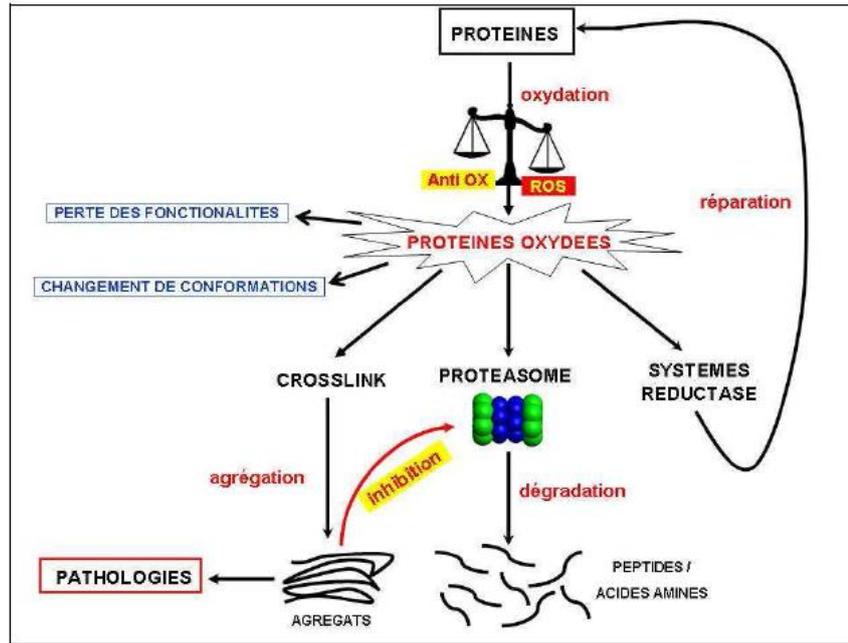


Figure 8 : Devenir des protéines oxydées (RONDEAU, 2009).

ces différents types de modification sont à l'origine de la formation des protéines carbonylées (ISABELLA *et al.*, 2002) qui constituent les marqueurs précoces de l'oxydation des protéines (THAO *et al.*, 2003), et qui ont été apportées en grande quantité chez les patients diabétiques (BARAHL, 2013). Les protéines carbonylées sont des composés organiques contenant des fonctions aldéhydes (CH=O) ou cétones (C=O) (BENJAMIN, 2013) formées par oxydation des acides aminés lysine, arginine, et proline situés sur les chaînes latérales des protéines et par clivage des liaisons peptidiques (ISABELLA *et al.*, 2003 ; VIBHA et UMESH, 2015). Cependant la lysine et l'arginine peuvent se combiner avec des carbohydrates selon un processus de glycoxydation pour donner les produits de glycation avancés (AGEs) potentiellement immunogènes et pouvant déclencher une réponse auto-immune (RONDEAU, 2009).

L'halogénéation et la nitration sont deux autres types de modification des protéines due à une sur stimulation des phagocytes (Figure 9). La nitration est secondaire à un excès du NO conduisant à la formation de nitrotyrosine par action du peroxynitrique (THAO *et al.*, 2003; FERNANDEZ, 2013).

Tandis que l'halogénéation, plus particulièrement la chloration est due à l'action de l' HOCl et des chloramines sur les protéines, conduisant à la formation d'une famille de molécules hétérogènes définie comme produits protéiques d'oxydation avancée (AOPPs). (FERNANDEZ, 2013).

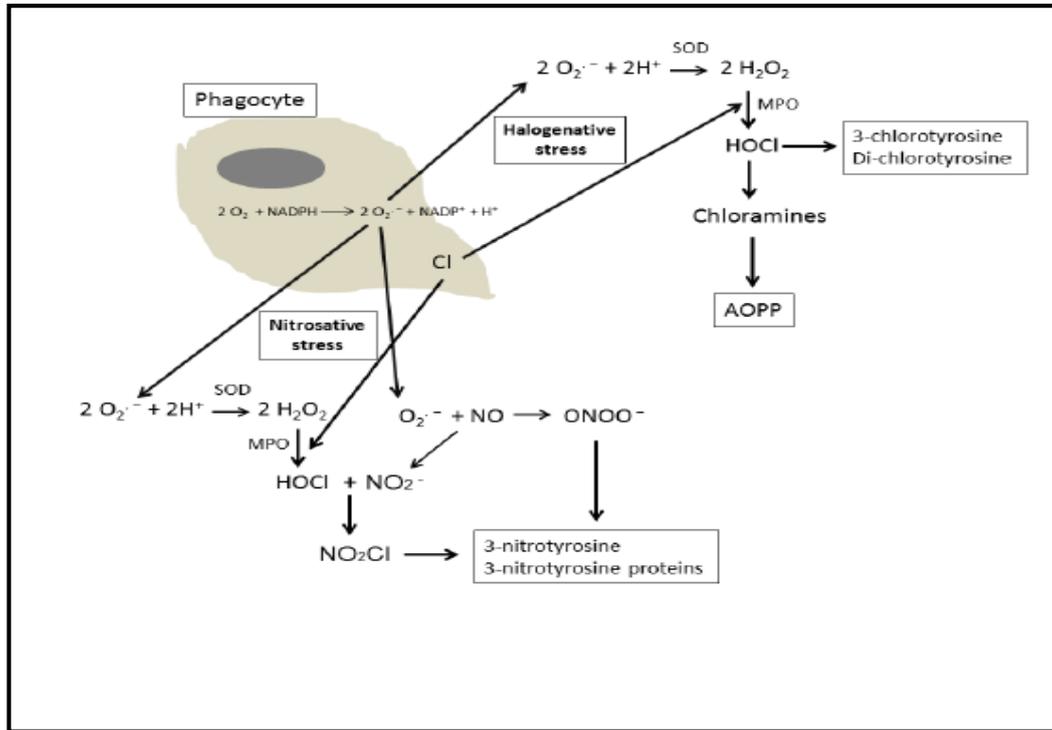


Figure 9 : Les principales voies métaboliques du stress oxydatif lié à la surstimulation des phagocytes (FERNANDEZ, 2013).

I.1.5. Les produits protéiques d'oxydation avancée :

Les protéines plasmatiques principalement l'albumine, la fibrinogène (AGNIESZKA, 2010) à côté du collagène de la matrice extracellulaire (NOWOTNY et GRUNET, 2014) sont considéré comme les molécules les plus vulnérables aux EROs (GUILHERME *et al.*, 2014), dont l'oxydation chlorée médiée par le système $\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cl}^-$ contribue de manière significative à la formation des produits protéiques d'oxydation avancée (AOPPs), une famille de composés hétérogène avec divers modification structurale impliqué dans un certain nombre de pathologies inflammatoires chroniques tel que le diabète et

l'athérosclérose (LAEMML, 1970) et considéré comme le paramètre le plus approprié pour la détermination du stress oxydatif chez les patients présentant un syndrome métabolique (DANIELLE, 2015).

L'albumine humaine sérique est considéré jusqu'à maintenant la principale protéine responsable de la génération des AOPPs qui sont en étroite corrélation avec les niveaux de di-tyrosine (WITKO-SARSAT *et al.*, 1996).

En effet, YASUNORIE *et ses collaborateurs* en 2006, ont montré que l'albumine oxydée était surtout présentée sous la forme d'agrégats multimoléculaires, résultant probablement de di-tyrosine réticulée ou des ponts disulfure, en outre l'analyse des acides aminés indique que l'oxydation de l'albumine induit une modification significative en résidus di-tyrosine et des acides aminés basique (Tableau II) (YASUMORI *et al.*, 2006).

Par conséquent, les AOPPs ont été définies comme des produits protéiques réticulés contenant des di-tyrosines (WEI *et al.*, 2014) ainsi que des groupes carbonyles sont présents en grande quantité (AGNIESZKA, 2010), formés par une activité dépendante de la MPO via la production des oxydants chlorés : HOCL et Chloramines (CAPEILLERE-BLAUDIN *et al.*, 2004), mais pas exclusivement (CAPEILLERE -BLAUDIN *et al.*, 2004). La réaction de fenton représente une voie alternative de la formation des AOPPs, étant donné que c'est une source importante d'ERO spécifiquement durant le processus inflammatoire. (LAEMML, 1970).

Tableau II : Changement de la composition des acides aminés de l'albumine oxydée (YASUNORIE *et al.*, 2006).

Amino acids	Literature value	Control-HSA (n = 3)	Oxi-HSA (n = 3)
Thr	28	22.5 ± 0.3	22.4 ± 0.4
Ser	24	24.5 ± 0.2	24.6 ± 0.3
Gly	12	12.0 ± 0.3	12.8 ± 0.3
Ala	62	62.0 ± 0.4	62.0 ± 0.1
Val	41	38.6 ± 0.2	39.4 ± 0.4
Met	6	3.2 ± 0.1	2.14 ± 0.2
Ile	8	7.7 ± 0.5	7.8 ± 0.1
Leu	61	61.3 ± 0.4	61.8 ± 0.1
Tyr	18	16.0 ± 0.3	6.7 ± 0.4*
Lys	59	53.0 ± 0.1	26.9 ± 0.4*
His	16	15.1 ± 0.4	14.5 ± 0.4
Arg	24	23.9 ± 0.4	18.6 ± 0.3*

*Significantly different (P < 0.01) from control-HSA.
Data are mean ± SD.

Bien que les mécanismes de dégradation et d'élimination des AOPPs restent à être élucidé, il semble que le foie et la rate sont principalement responsable (LAEMML, 1970).

A cause de l'analogie structurale entre les AGEs et les AOPPs (WITKO-SARSAT *et al.*, 1999) il semble que ces dernière partage les même propriétés et activités biologiques des AGEs, et se lieit également aux mêmes récepteurs à savoir les RAGE (AGNIESZKA, 2010) responsable de l'activation de la voie redox impliquant la NOX et le NF_kB (MIW *et al.*, 2012), mais se lieit aussi aux récepteurs scavengers CD36 (QIAN *et al.*, 2015).(Figure 10)

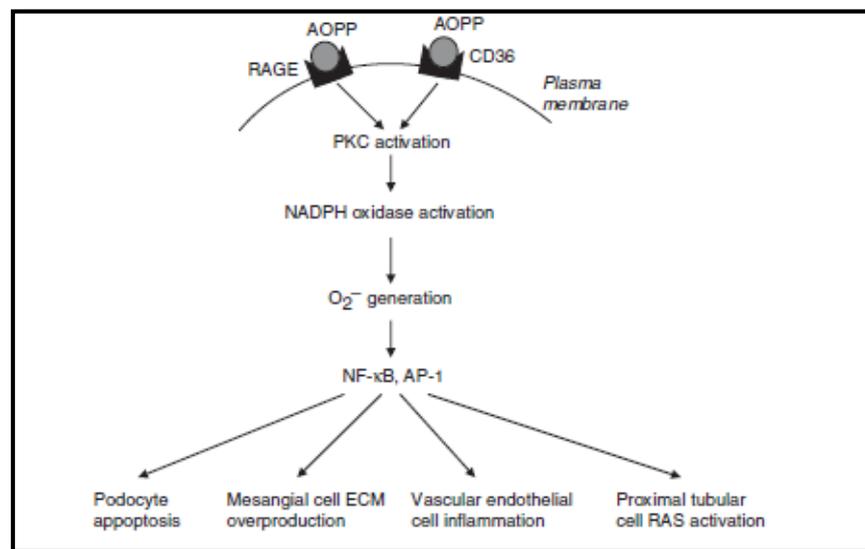


Figure 10 : Récepteurs et voie de signalisation des AOPPs (WEI *et al.* , 2014)

Les AOPPs ont été considérés à l'origine comme des marqueurs des dommages oxydatifs des protéines (WITKO-SARSAT *et al.*, 1996 ;WITKO-SARSAT *et al.*, 1998), mais sont maintenant identifiés d'être capable de déclencher l'explosion respiratoire dans les neutrophiles et les monocytes, et apparaissant ainsi à agir comme de véritable médiateurs inflammatoires (GRONE *et al.*, 2002 ; DESCAMPS-LATSCHA et WITKO-SARSAT, 2001), responsables de l'activation du facteur de transcription NF_kB (AGNIESZKA, 2010) impliquée dans la transcription et la libération des cytokines pro-inflammatoires tel que les TNF- α (WITKO-SARSAT *et al.*,1998) qui après liaison avec leur récepteurs de mort (TNF-R1) présents notamment sur la surface les cellules β pancréatiques

(**CARDOZO, 2007**) induisent l'apoptose ,l'activation du NF_κB (**GEOFFREY et al., 2006**) et la génération des EROs (**MITTAL et al., 2014**).

Les AOPPs malgré qu'ils sont la conséquence d'un stress oxydatifs chronique sont d'autre part capable de promouvoir la production des EROs en particulier le radical superoxyde par un mécanisme impliquant la NOX -une voie dépendante de la PKC- conduisant à une boucle de rétroaction positive (**WEI et al., 2014**) (**ZHOU et al., 2009**) , cette production est à l'origine de l'activation du NF_κB qui régule l'expression des gènes de cytokine pro-inflammatoire (**SUBRATA, 2015**), ainsi la présence de forte concentration intracellulaire de H₂O₂ peut induire la libération du cytochrome C et des AIF des mitochondries dans le cytosol ou ils déclenche l'activation des caspases conduisant à la mort cellulaire par apoptose (**LAZO-DE-LA-VEGA MONROY et al., 2013**).

Cependant la composition moléculaire des AOPPs n'est pas claire (**BOCHI et al., 2016**), en plus les voies et les protéines cibles pour la formation sont largement inconnues (**COLOMBO, 2015**) .

I.1.6. Système de défense

Compte tenu du caractère toxique de ces radicaux libres, l'organisme a mis en place des systèmes de défense pour se protéger des effets délétères qu'ils puissent induire (**HLENG et al., 2007**).

HALLIWELL et GUTTERIDHE définissent un 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 ; GRERORY, 2009**). à fin de maintenir un environnement réduit (**MEGHAN et al., 2011**). Ces antioxydants peuvent prévenir directement la formation radicalaire (**GRERORY, 2009**) comme ils sont capables de piéger directement les ERO et les ERN par des réactions enzymatiques ou bien réparer les dommages oxydatifs qu'ils induisent (**YOUNBO, 2011**)

Les différents systèmes de défense anti-oxydante interviennent en cascade en fonction de leur localisation et de leur affinité pour les différents FRO produit (THAO *et al.*, 2003) (Figure 11).

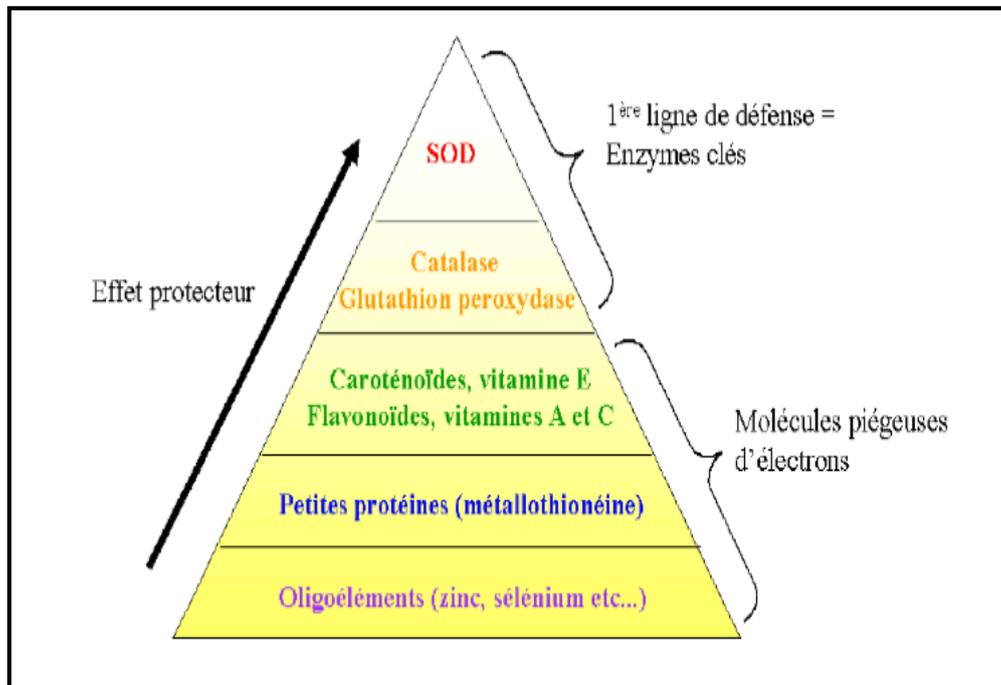


Figure 11 : Pyramide des systèmes de défenses antioxydants (AUBERVAL, 2010).

Il existe 2 sources de défense anti-oxydante (Figure 12), l'une apportée par l'alimentation sous forme de légume et fruit (vitamine C, vitamine E, Caroténoïde, Flavonoïde, Glutathion) Et l'autre endogène composée d'enzymes (SOD, GPx, Catalase) qui sont connus pour être des antioxydants intracellulaire (4) nécessitant parfois des oligoéléments (sélénium, cuivre, zinc) comme cofacteur pour pouvoir exercer leur activité et de protéines plasmatique (Ferritine, Transferrine, albumine). (HALENG *et al.*, 2007 ; PINCEMAIL *et al.*, 2009).

Chez les patients diabétiques ces mécanismes antioxydants sont diminués et des niveaux exceptionnellement bas en SOD et catalase sont détectés dans les mitochondries des cellules β pancréatiques (LAZO-DE-LA-VEGA MONROY *et al.*, 2013).

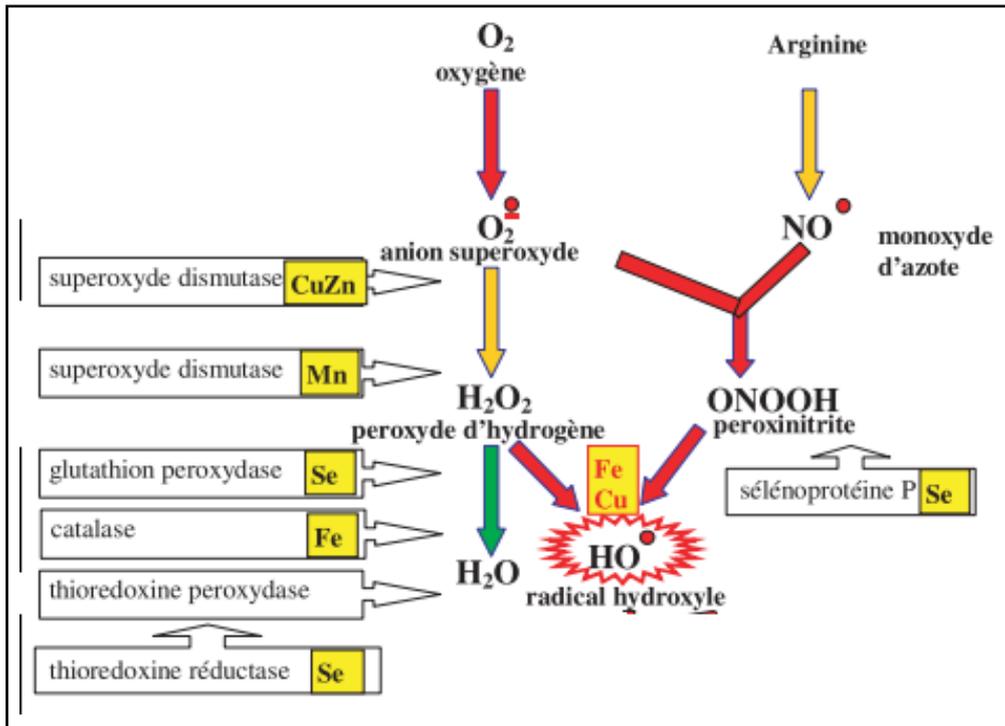


Figure 12 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (FAVIER, 2003 avec modification).

I.2. Diabète type 1 et homéostasie glycémique.

I.2.1. Diabète sucrée

Selon l'association américaine du diabète (ADA) (2010), Le diabète sucré est désigné comme étant un groupe de maladies métaboliques caractérisé par une hyperglycémie résultant du défaut de la sécrétion, ou de l'action de l'insuline, ou les deux en même temps. L'hyperglycémie chronique du diabète est associée à des dommages à long terme, un dysfonctionnement, et la défaillance des différents organes, en particulier les yeux, les reins, les nerfs, le cœur, et les vaisseaux sanguins (LAZO-DE-LA-VEGA-MONROY, 2013; DROUIN *et al.*, 1999)

Ainsi, les critères biologiques du diagnostic indiquent que le diabète correspond à une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/l (7 mmol/l), ou une glycémie supérieure à 2 g/l (11,1 mmol/l) à n'importe quel moment de la journée (RODIER, 2001), ou une hémoglobine glyquée supérieure à 6,5% (ADA, 2009 ; MARK *et al.*, 2014).

I.2.1.1. Diabète type 1

Le DT1 ou le diabète insulino-dépendant est une maladie multifactorielle (**DENEMAN, 2006 ; KIM et POLYCHRONAKOS, 2005**) résultant d'une destruction sélective et progressive des cellules β pancréatique par un processus auto-immun pendant une période asymptomatique qui se prolonge souvent pendant de nombreuses années (**MICHEL, 2001**) aboutissant à une carence absolue en insuline (**JI-WON et HEEN-SOOK, 2005**).

Le DT1 est une maladie complexe, qui apparaît liée à la conjonction d'une susceptibilité génétique, et de facteurs environnementaux, développé généralement chez les jeunes et représente environ 5 à 10% de la population diabétique dans le monde (**JI-WON et HEEN-SOOK, 2005 ; LOUI, 2010**).

Dans 90% des DT1, les personnes nouvellement diagnostiquées présentent souvent des caractéristiques d'une contribution immunologique à la pathogenèse de la maladie tel que les auto-anticorps d'îlot (**MARK *et al.*, 2014**) dirigés contre des auto-antigènes (insuline- GAD- ZnT8- IA-2) (**MIN *et al.*, 2014**), ces auto-anticorps en plus d'avoir une valeur diagnostique pour le DT1 (**DRIMALDI, 2000**), peuvent aider à identifier les personnes à risque, puisqu'il apparaissent des mois voire des années avant l'apparition des troubles métaboliques (**AUBEVAL, 2010**), cependant en l'absence de ces marqueurs le diabète est dit idiopathique (**MARK *et al.*, 2014**). Ces auto-anticorps sont des marqueurs fiables du déroulement du processus auto-immun pathologique (**KNIP et SILJANDER, 2008**).

I.2.1.2. Terrain génétique de susceptibilité et facteurs déclenchant

Le DT1 est clairement considéré comme un trouble polygénique (**MIN *et al.*, 2014**), dont les individus sont nés avec divers degrés de susceptibilité génétique (**MARK *et al.*, 2014**), cette dernière apparaît comme une condition préalable pour le développement du DT1 (**JI-WON et HEEN-SOOK, 2005**). (**Figure 17**)

Près de quarante locis ont été connus (**MARK *et al.*, 2014**) d'être impliqués dans l'étape de présentation antigénique (**DUBOIS-LAFORGUE, 2007**), l'association du DT1 se fait essentiellement avec certains allèles du gène HLA de classe II (**LOUI, 2010**), le génotype présenté par une hétérozygotie DR3-

DQ2/DR4-DQ8 confère le risque le plus élevé (LOUI, 2010 ; NERUP *et al.*, 1994).

A ce stade le processus conduisant à la maladie n'a pas encore débuté (MICHEL, 2001), mais l'incrimination de certains facteurs environnementaux tel que les infections virales (LOUI, 2010; JI-WON et HEEN-SOOK, 2005) peuvent conduire au déclenchement de la réaction auto-immune et la dégradation progressive de la capacité insulino-sécrétoire , conduisant à la fin à une hyperglycémie chronique et des manifestations cliniques du diabète (à savoir une polyuro-polydipsie, un amaigrissement en dépit d'une appétit conservée voir augmentée) (MICHEL, 2001) Cela aura lieu lorsque environ 70% des cellules β sont détruites (AUBEVAL, 2010) (Figure 13)

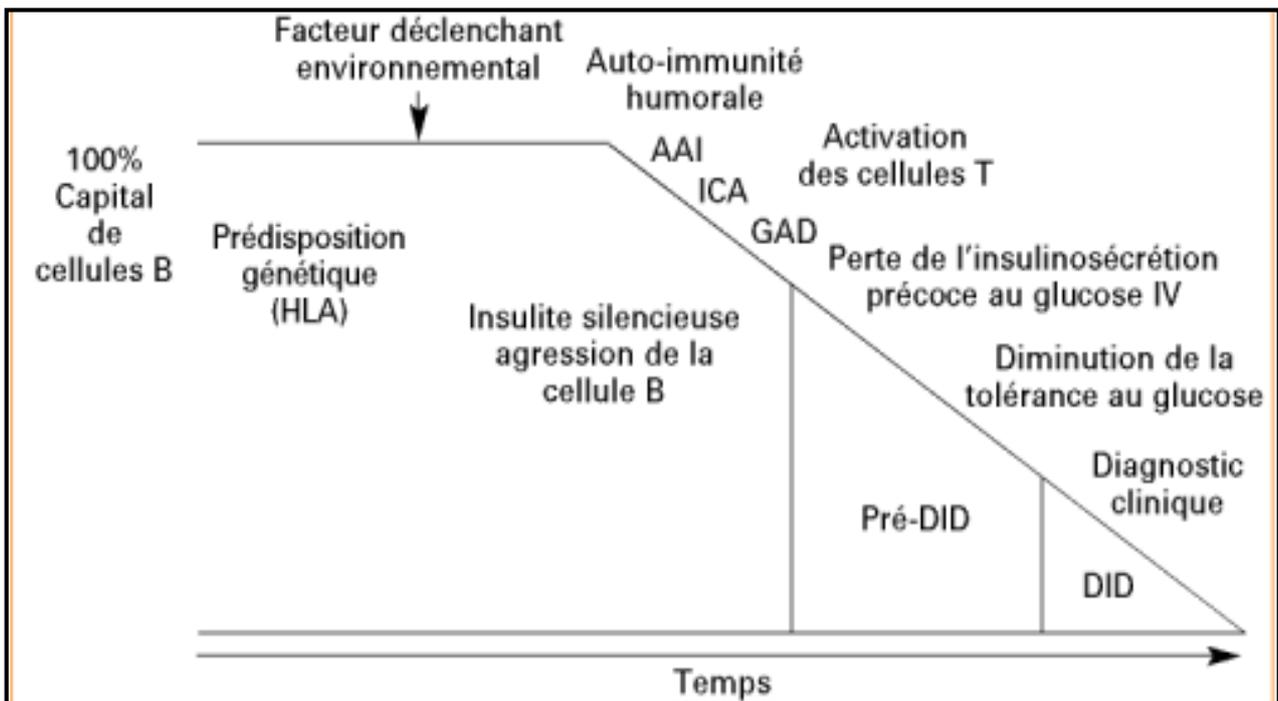


Figure 13: développement du diabète type 1 (PHILIPS et ACHEEN, 2003)

Les mécanismes par lesquels ces virus (rubéole – coxsackie) pourraient participer à la diabétogènes, sont la libération d'auto-antigènes par la lyse des cellules β infectées, un mimétisme moléculaire entre les protéines virales et les antigènes des cellules β (ALESSANDR et DECIO, 2007; LOUI, 2010).

I.2.1.3. Destruction des cellules β par un processus auto-immun

La destruction des cellules β résulte d'une combinaison des mécanismes spécifiques de l'antigène (cellules T auto-réactives) et non spécifiques de l'antigène (production des cytokines et ERO) (MANDRUP-POULSEN, 2003), elle est caractérisée par infiltration des cellules immunitaire " insulite " dans ces îlots pancréatiques (LOUI, 2010) (Figure 16).

Les cellules de l'immunité tels que les macrophages et cellules dendritiques sont les premiers à entrer dans les îlots pendant l'insulite (DELMASTRO et PIGANELLI, 2011; MIN *et al.*, 2014), et sont responsable de la présentation des auto-antigènes correspondant aux lymphocytes T auto-réactif (LOUI, 2010).

Les auto-antigènes libérés par les cellules β après la mort cellulaire ou une infection virale (DIANA *et al.*, 2011) , sont traités par les CPA (CDs, macrophages) et présentés aux lymphocytes TCD₄⁺ en association avec le CMH II au niveau des nœuds lymphatiques du pancréas (JI-WON et HEEN-SOOK, 2005 ; MIN *et al.*, 2014). L'activation de ces derniers nécessite un premier signal par interaction spécifique entre son récepteur (TCR) et le complexe CMH II/peptide, un second signal entre les molécules de co-stimulation (B7-CD28), le troisième signal consiste à des signaux solubles constitués de ERO- IL1 β - TNF α (DINARELLO *et al.*, 1986) produits par les CPAs (Figure 14), les EROs en particulier sont aussi connus d'avoir provoqué des dommages au niveau des cellules β (DELMASTRO et PIGANELLI, 2011).

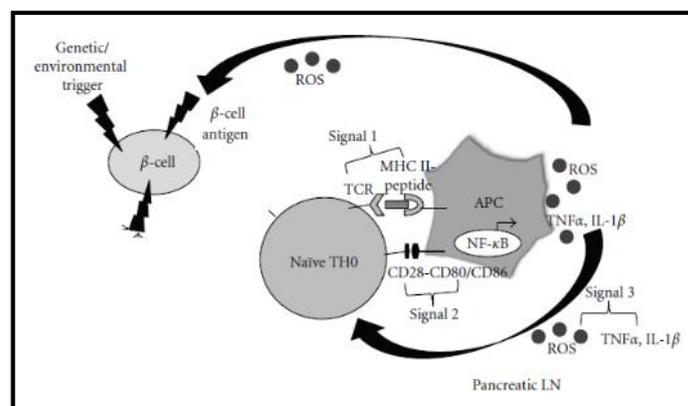


Figure 14 : L'activation des cellules T CD₄⁺ par les cellules présentatrice d'antigène (DELMASTRO et PIGANELLI, 2011 avec modification).

Deux types d'activation sont ensuite possible, selon les cytokines produites : la voie TH2 induit l'activation des lymphocytes B qui se différencient en plasmocyte qui produit des auto-anticorps (BAALBAKI, 2013), et la voie TH1 majoritaire dans le DT1 (DUBOIS-LAFORGUE, 2007).

Les cellules TH1 produisent l'IFN γ et l'IL2. D'une part l'IL2 active les cellules TCD $_8^+$ perotoxique spécifique des cellules β pour devenir des cellules T cytotoxique (JI-WON et HEEN-SOOK, 2005), considérés comme les exécuteurs finaux de la destruction des cellules β (MIN *et al.*, 2014), en libérant dans l'environnement péri-cellulaire des protéines cytotoxique (perforine) et des sérines estérases toxiques (WONG *et al.*, 2008), d'autre part l'IFN γ va faire en sorte que les macrophages deviennent cytotoxiques (Figure 15), et endommagent les cellules β (JI-WON et HEEN-SOOK, 2005).

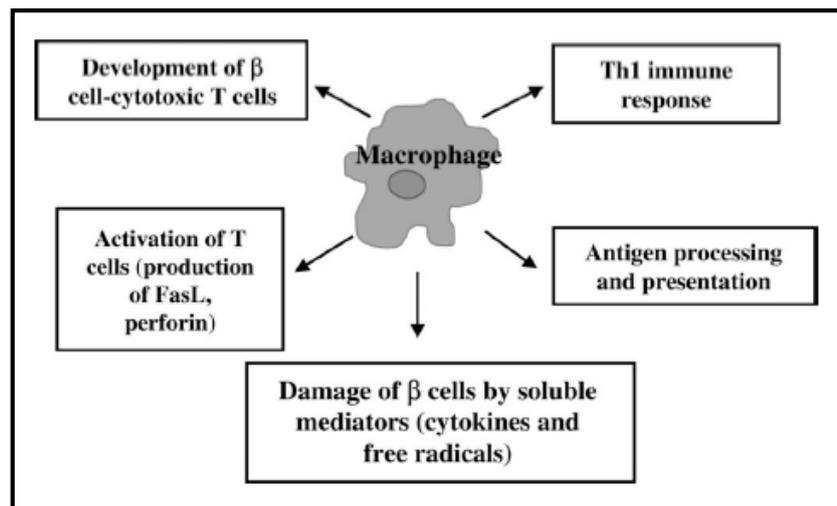


Figure 15 : Rôle des macrophages dans le développement du diabète auto-immun (JI-WON et HEEN-SOOK, 2005).

Les macrophages cytotoxiques produisent des médiateurs solubles tels que les RL oxygénés (H_2O_2 - O_2° - NO°) et des cytokines IL-1 β qui sont spécifiques des cellules pancréatiques (JI-WON et HEEN-SOOK, 2005) responsables de l'activation du facteur de transcription NF κ B et PKC (ALESSANDR et DECIO, 2007), le TNF α qui stimule la production du NO° par la iNOs dans les cellules β et l'IFN γ ; tous ces cytokines sont détectés durant la phase primaire de l'insulite (JI-WON et HEEN-SOOK, 2005).

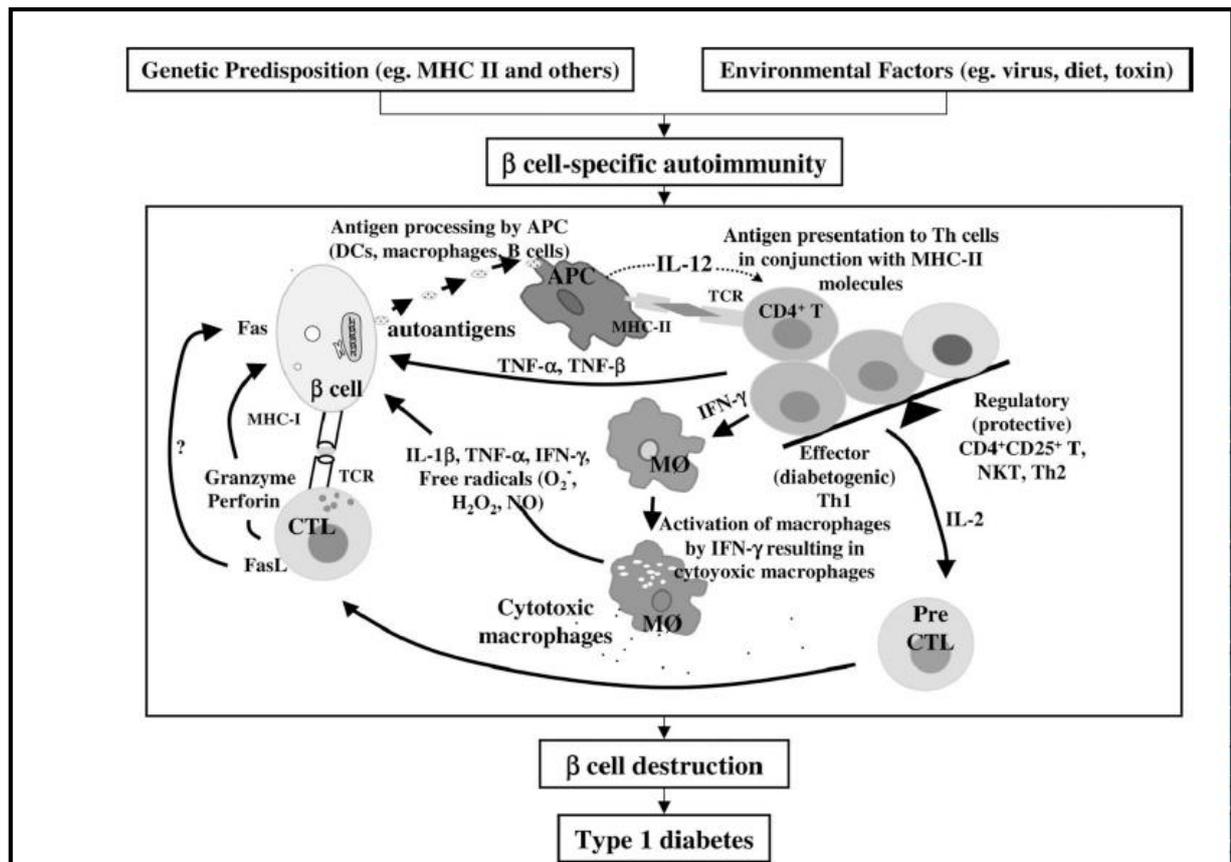


Figure 16: Étiologie du diabète type 1 (JI-WON et HEEN-SOOK, 2005).

I.2.2. Régulation des la glycémie

La glycémie est un paramètre métabolique crucial pour la survie et le bon fonctionnement de l'organisme, ce qui explique sa régulation fine. Elle est maintenue à une valeur relativement constante proche de 1 g/l à jeun selon les recommandations de l'OMS (CASSEL, 2014).

Le métabolisme du glucose est conditionné 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).

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

2002). Par contre des variations trop importantes de la concentration du glucose peuvent avoir des répercussions importantes sur l'organisme (CASSEL, 2014).

I.2.2.1. L'insuline

L'insuline est la seule hormone hypoglycémisante de l'organisme (MAGNAN et KTORZA, 2005), joue un rôle dans le contrôle de l'homéostasie du glucose en stimulant son transport dans les cellules, et sa mise en réserve sous forme de glycogène dans le foie et les muscles, régularise ainsi le métabolisme lipidique en favorisant le stockage des lipides dans le tissu adipeux blanc (MAGNAN et KTORZA, 2005 ; JUSTIN *et al.*, 2011). L'insuline est également nécessaire pour la synthèse de l'absorption des acides aminés et des protéines (SESTI, 2006). Les actions pléiotropiques de l'insuline sont cruciales pour le maintien de l'homéostasie normale des cellules et de permettre la prolifération et la différenciation cellulaire (JUSTIN *et al.*, 2011).

La molécule d'insuline est un polypeptide d'un poids moléculaire d'environ 6kDa, hétéro-dimère constituée de deux chaînes reliées entre elles par deux ponts disulfures, la chaîne A (21 acides aminés) avec un pont disulfure intra-caténaire et la chaîne B (30 acides aminés) (MAGNAN et KTORZA, 2005) (Figure 17).

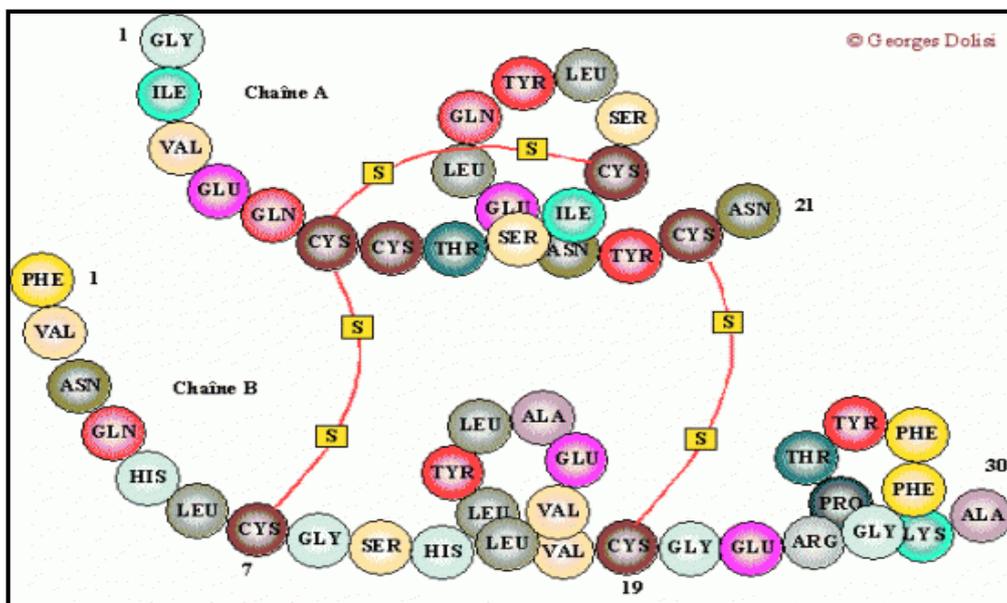


Figure 17 : Schéma de la molécule d'insuline (MALARDE, 2012).

L'expression du gène de l'insuline humaine située sur le bras court du chromosome 11 (MAGNAN et KTORZA, 2005) est classiquement l'apanage exclusif de la cellule β du pancréas endocrine, elle est synthétisée sous forme de pré-pro-insuline contenant le peptide signal (DASU *et al.*, 2008 ; BOUGLE et ANNANE, 2009) qui est responsable du passage du peptide en formation dans le réticulum endoplasmique, à ce niveau des enzymes protéolytiques clivent la séquence signal formant par la suite la pro-insuline (BOUGLE et ANNANE, 2009), le peptide C à pour rôle de maintenir les ponts disulfures qui réunissent les chaînes A et B (MAGNAN et KTORZA, 2005) (Figure 18).

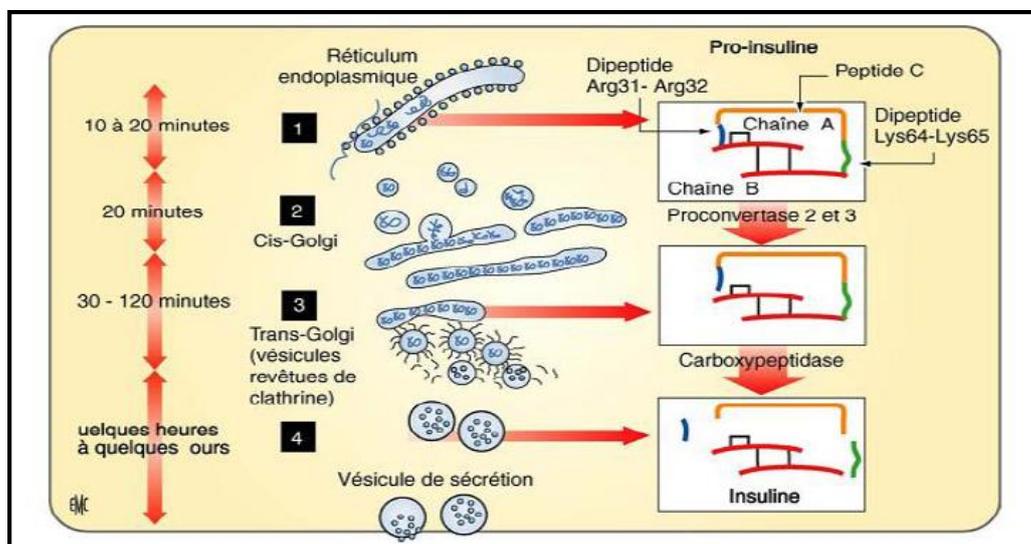


Figure 18 : Synthèse d'insuline et transport intracellulaire (MAGNAN et KTORZA, 2005).

I.2.2.2. Mécanisme de la réponse insulino sécrétoire au glucose

le glucose est l'agent stimulant le plus puissant de la biosynthèse de l'insuline (TALIOR *et al.*, 2003 ;BOUGLE et ANNANE, 2009), exerce son effet en augmentant la concentration intracytosolique du Ca^{2+} , ainsi que sa perméabilité cellulaire (CHRISTOPHE, 2008).

Le glucose pénètre dans la cellule β par l'intermédiaire d'un transporteur GLUT1, le glucose phosphorylé est utilisé par la voie du glucose et la respiration oxydative, ce qui est à l'origine d'une production accrue d'intermédiaires phosphorylés à haute énergie (ATP) conduisant à l'inactivation des canaux K^+ ATP

dépendants (MINAMI *et al.*, 2004) en conséquence la dépolarisation de la membrane plasmique permet l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage, l'augmentation de la concentration intracellulaire du Ca^{2+} aboutira à la fusion des vésicules d'exocytoses avec la membrane plasmique (MAGNAN, 2008) (Figure 19). La sécrétion d'insuline dans le compartiment vasculaire s'accompagne de la libération d'une quantité équimolaire de C-peptide (CHEVENNE, 2007).

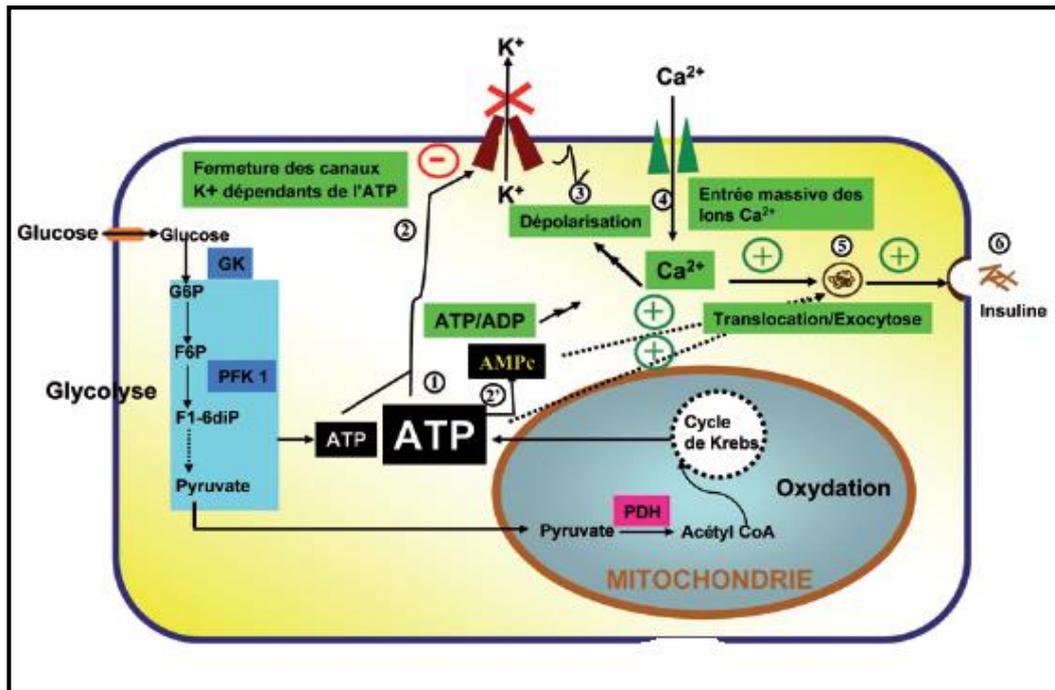


Figure 19: Stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose par un mécanisme ATP dépendant (MAGNAN, 2008).

I.2.2.3. Voies de signalisation intracellulaire de l'insuline

la signalisation normale de l'insuline se produit grâce à l'activation de son récepteur IR qui appartient à la superfamille des récepteurs à tyrosine kinase (JUSTIN et SUSHIL, 2011 ; Riant, 2009), La liaison de l'insuline à son récepteur induit des changements morphologiques du récepteur, déclenchant l'activité tyrosine kinase intrinsèque des sous-unités β transmembranaire, ce qui permet l'autophosphorylation des résidus tyrosine, et l'activation de deux voies d'activation intracellulaire (BOUGLE et ANNANE, 2009).

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 récepteur IR avec les protéines SHC et Grb2 aboutit à l'activation des molécules impliquées dans la prolifération cellulaire et l'apoptose (BOUGLE et ANNANE, 2009).

La seconde voie est celle liée à l'IRS. Les IR trans-phosphorylent plusieurs substrats dont IRS1 à 4, Gab 1, et Cbl. Cette première série d'évènement 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 (DEMEYTS, 2005).

I.2.2.4. Rôle des radicaux libres dans la sécrétion d'insuline

Dans le DT1 une altération de la sécrétion d'insuline est observée pendant les étapes initiales, avant la destruction des cellules β (ISLAM, 2010), les EROs perturbent et inhibent l'insulinosécrétion en inhibant la transduction du signal du glucose dans les cellules β (KRIPPEIT-DRENS, 1994), en effet le H_2O_2 diminue le ratio ATP/ADP intracellulaire suite à une attaque mitochondriale, par conséquent une activation des canaux potassiques ATP dépendant entraine une hyperpolarisation membranaire qui empêche la libération d'insuline (AUBERVAL, 2010) (Figure 20).

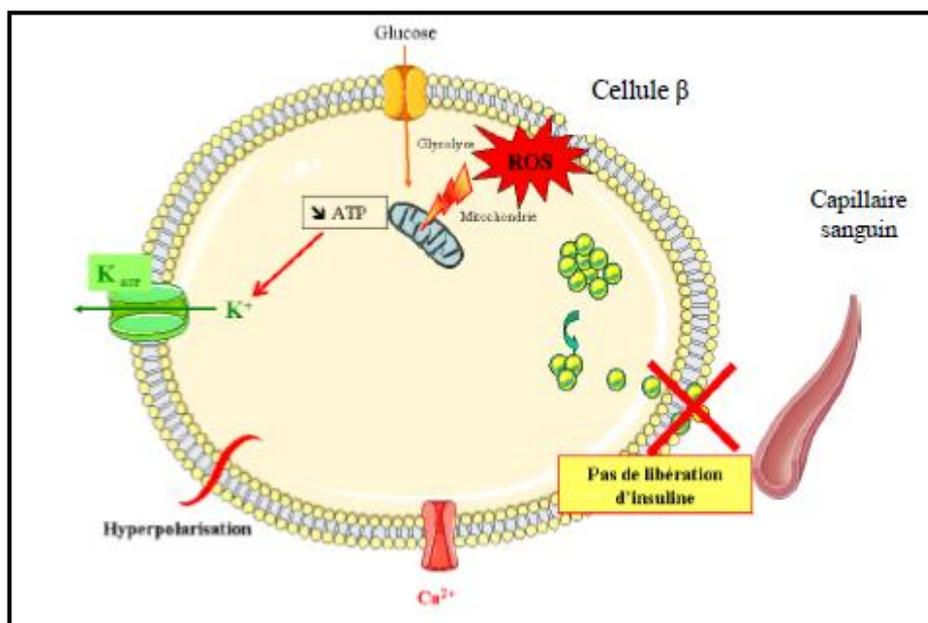


Figure 20: Effet du stress oxydant sur la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatique (AUBERVAL, 2010).

I.2.3. Hyperglycémie et stress oxydant

I.2.3.1 Impact du stress oxydant et l'hyperglycémie sur les cellules β

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 β à s'adapter à l'hyperglycémie, ce qui est le cas dans le diabète (PILLON, 2010).

L'hyperglycémie est l'un des liens directs avec la production de radicaux libres et la gestion du stress oxydant mitochondrial (LEVERVE, 2006), en particulier les mitochondries des cellules β pancréatiques ont des niveaux exceptionnellement bas d'activité en SOD et catalase (DELMASTRO et PIGANELLI, 2011) ce qui rend ces cellules plus sensibles aux ERO et ERN, qui jouent un rôle essentiel dans la stimulation des réponses inflammatoires et la destruction des cellules β par apoptose (LAZO-DELA-VEGA-MONROY et FERNÁNDEZ-MEJÍA, 2013).

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 (Figure 21) (BONNEFONTROUSSELOT *et al.*, 2004).

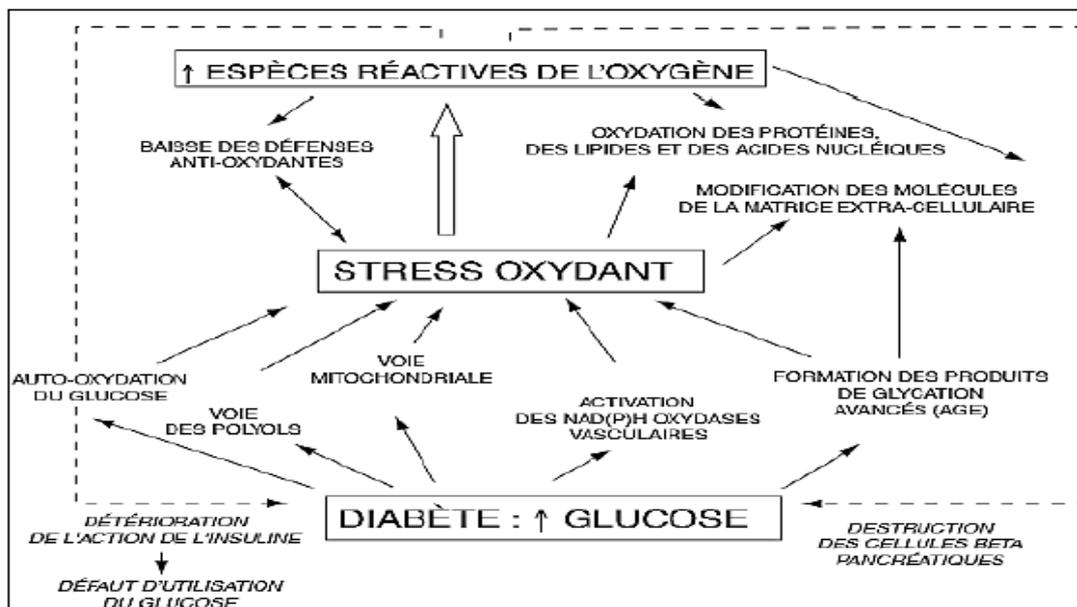


Figure 21: Relation entre l'hyperglycémie et le stress oxydant (BONNEFONT 2004).

I.2.3.2. Mécanismes impliqués dans la genèse d'un stress oxydant dans le diabète

D'après **DELATTRE et ses collaborateurs en 1999; BONNEFONT-ROUSSELOT et ses collaborateurs en 2004**, plusieurs mécanismes biochimiques semblent être impliqués dans le développement d'un stress oxydant en présence de concentrations élevées en glucose, ainsi l'hyperglycémie contribue à un stress oxydatif soit par la génération directe des EROs ou en modifiant l'équilibre d'oxydoréduction (**JUSTIN et SUSHIL, 2011**) (**Figure 22**).

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 (**RACCAH, 2004**) qui comprend deux enzymes l'aldose réductase (AR) et le sorbitol déshydrogénase (SDH) (**OMOTAYO, 2012**). Elle conduit à la réduction du glucose en sorbitol par l'intermédiaire d'aldose réductase d'une manière NADPH-dépendante, le sorbitol est ensuite oxydé en fructose par le sorbitol déhydrogénase avec réduction du NAD en NADH (**JUSTIN et SUSHIL, 2011**).

Dans des conditions normales, l'aldose réductase AR a une faible affinité pour le glucose, tandis que dans des conditions hyper glycémique, il y a une augmentation de l'activité enzymatique, et une diminution globale de NADPH(**19**), ce dernier est un cofacteur essentiel pour la production du GSH, un antioxydant intracellulaire (**AHMAD et al., 2005**)

Ainsi l'augmentation du sorbitol et sa conversion en fructose augmente le ratio NADH/NAD⁺ qui peut conduire à l'activation de la PKC et l'inhibition de l'enzyme Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogénase (**BROWNLEE, 2001**).

Cette voie ne produit pas des EROs directement, mais elle contribue à un déséquilibre global d'oxydoréduction de la cellule, qui conduit à un stress oxydatif (**JUSTIN et SUSHIL, 2011**).

B. Voie des hexosamine

Sous des conditions physiologiques, une petite quantité de fructose-6-phosphate provenant de la glycolyse est déviée vers la voie des hexosamines (**OMOTAYO, 2012**); induisant la formation de UDP-N-acétylglucosamine

(UDPGlcNac) par l'enzyme glucosamine fructose amido-transférase (GFAT) **(DENIS, 2002 ; LOSSER *et al.*, 2009)**.

Comme pour les autres voies, avec une hyperglycémie chronique la voie des hexosamines devient renforcée **(FIGUEROA-REMERO *et al.*, 2008)**, cela conduit à des modifications dans l'expression génique des facteurs de transcription TGF α et TGF β qui contribue aux complications micro-vasculaire du diabète **(SCHLEIHER *et WEIGERT*, 2000)**.

C. Voie des protéines kinase C (PKC)

L'hyperglycémie peut contribuer à la production directe et indirecte des EROs via l'activation de la voie DAG-PKC **(BROWNLEE, 2001)**. Les différents isoformes de la PKC sont activés par le second messenger lipidique DAG, cette activation se traduit par une série d'altération de la signalisation cellulaire **(JUSTIN *et SUSHIL*, 2011)**.

en effet les PKC activés contribuent à un environnement oxydatif par production excessive d'EROs en activant le NF κ B et divers NADPH oxydase **(BROWNLEE, 2001)**.

D. Glycation des protéines

L'hyperglycémie augmente l'intensité des réactions dites de glycation non enzymatiques 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 aldéhyde 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 produits de glycation avancée (AGE) ou produits de Maillard **(BONNEFONTROUSSELOT *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 leur récepteur membranaire (RAGE).

La fixation des AGE sur RAGE déclenche une signalisation entraînant un stress oxydant intracellulaire (GILLERY, 2006). Ils induisent aussi un état inflammatoire en activant le facteur de transcription NF-Kb, la production de TNF α (LOSSER *et al.*, 2009).

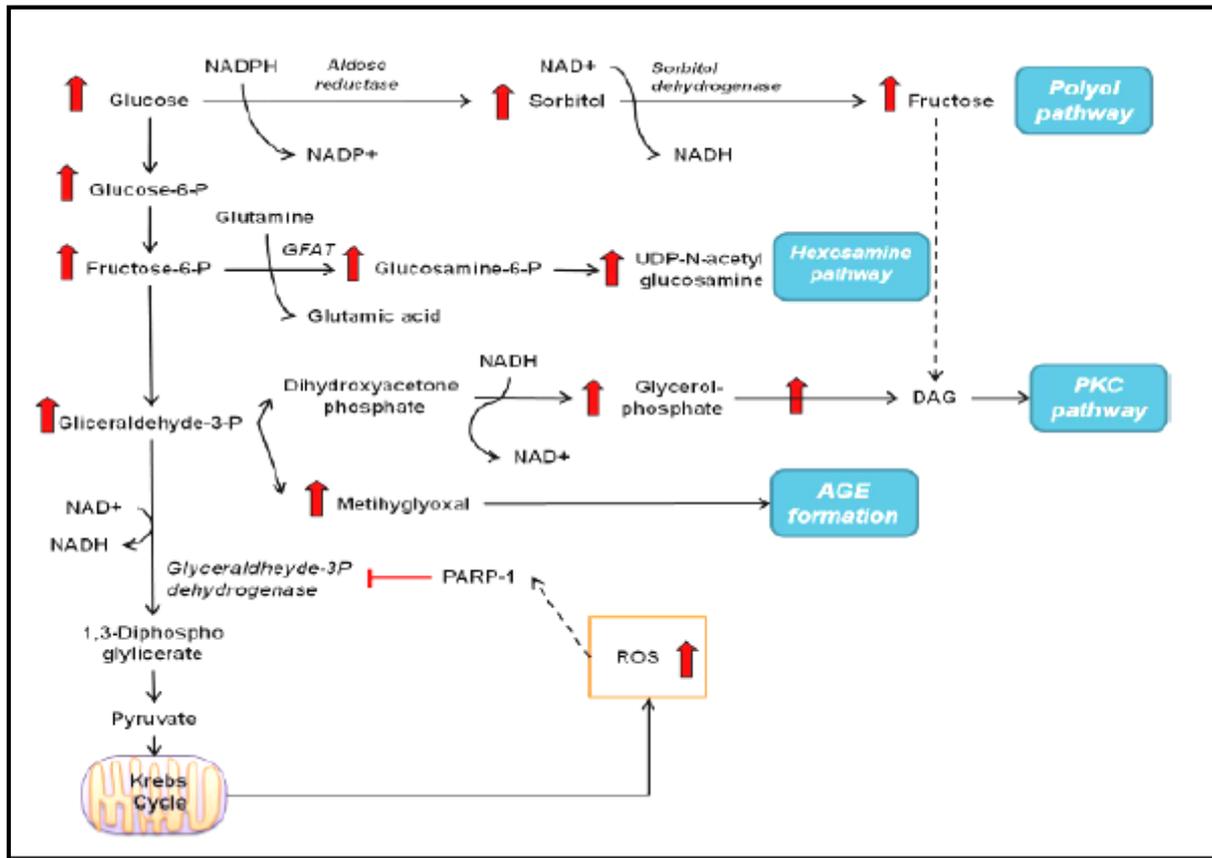


Figure 22 : Voies oxydatives de stress dans le diabète sucré

(LAZO-DE-LA-VEGA-MONROY et FERNÁNDEZ-MEJÍA, 2013).

Matériel et méthodes

Afin d'estimer les dommages oxydatifs des protéines causés par le stress oxydant chez les patients diabétiques de type 1, et d'étudier leurs relations avec les troubles métaboliques, nous nous sommes intéressés à évaluer :

1. Les paramètres du stress par le dosage :

⊗ de leurs marqueurs protéiques et lipidiques (AOPP et MDA respectivement) ;

⊗ et leurs défenses anti-oxydantes comme la catalase et la SOD

2. Explorer les troubles métaboliques par les différents statuts :

⊗ Anthropométrie (IMC) et hémodynamique (pression artérielle systolique et diastolique).

⊗ Biochimiques (Bilan glycémique, lipidique, rénale, hépatique, magnésium, protéines totaux et acide urique).

Pour ce faire, nous avons sollicité cinq lieux de stages :

- ✓ L'établissement public de santé (E.P.S.P) d'Ouled Yaïch pour le recrutement des DT1 (13 patients) et des témoins (33 patients) et les dosages biochimiques.
- ✓ L'établissement public de santé (E.P.S.P) de Bouzereah (16 patients) pour le recrutement des DT1.
- ✓ l'établissement public hospitalier (E.P.H) de BLIDA «TRICHINE IBRAHIME EX (FABORE)» (04 patients) pour le recrutement des DT1 et les dosages biochimiques.
- ✓ l'établissement public hospitalier (E.P.H) d'EL-AFFROUN (03 patients) pour le recrutement des DT1
- ✓ Le laboratoire du département de vétérinaire de l'université de BLIDA (PFE) pour le dosage du statut oxydatif.

Cette étude s'est étalée sur une durée de 04 mois (du mois de Mars au mois de Juin 2016).

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel non biologique

- ❖ L'appareillage et les réactifs utilisés voir **annexe I**.
- ❖ La composition des réactifs voir **annexes (III- VII)**.

II.1.2. Matériel biologique

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

II.2. Méthode d'étude

Dans cette étude, la population recrutée est constituée par:

- un groupe de sujets témoins ;
- et un groupe de diabétique type 1(DT1).

II.2.1. Les critères de recrutement

Les critères de recrutement pour la population témoin et diabétique sont :

- être volontaire ;
- homme ou femme ;
- âgé de 18 à 55 ans.

Les sujets diabétiques recrutés concernent des patients hospitalisés, ainsi que des patients externes suivis en consultation au niveau des établissements de santé. La population témoin a été recrutée au niveau de l'établissement de santé d'Ouled Yaïch. Ainsi, nous avons recruté 33 sujets non diabétiques, aucune pathologie connue, et 33 sujets diabétiques type 1 (DT1). Le nombre de sujets recrutés est répertorié dans le tableau suivant :

Tableau III : Le nombre de patients diabétiques et de témoins recrutés.

	Hommes	Femmes	Total
Patients diabétiques type 1 (DT1)	12	21	33
Patients non diabétiques : Témoins	10	23	33

II.2.2. Questionnaire (annexe II)

Une fiche de renseignement a été établie pour chaque patient pour répertorier les renseignements concernant chaque patient qui sont :

- L'âge et le sexe ;
- Les paramètres cliniques et anthropométriques (le poids corporel, taille).
- Paramètres hémodynamiques (pression artérielle systolique et diastolique) ;
- Les paramètres biologiques :
 - ✓ Statut glycémique : Glycémie, Hémoglobine glyquée (HbA1c).
 - ✓ Bilan lipidique : Cholestérol totale (CT), Triglycéride (TG).
 - ✓ Bilan hépatique : ASAT, ALAT.
 - ✓ Bilan rénal : Urée, Créatinine
 - ✓ Autres : Protéines totales, Acide urique (AU), Magnésium (Mg).
 - ✓ Statut oxydatif : AOPP, MDA, Catalase.

II.2.3. Prélèvements

Les prélèvements de sang s'effectuent entre 8H30mn et 10 heures du matin, dans les mêmes conditions, après 12 heures de jeun.

Après avoir placé le garrot, désinfecté la surface cutanée à l'alcool, par une ponction veineuse franche au pli du coude à l'aide d'une aiguille, le sang est alors prélevé.

Il est ensuite recueilli dans des tubes étiquetés, et sont acheminés au laboratoire pour analyse soit ; directement pour le dosage de l'hémoglobine glyquée A1c(HbA1c), ou après une centrifugation à 4000 tour/minute pendant 15 minutes, afin de récupérer :

- Le plasma sur tube d'héparinate de lithium pour le dosage de quelques paramètres biochimiques à savoir : Glycémie, CT, TG, l'urée, créatinine, ASAT(GOT), ALAT (GPT), Mg, Protéines totaux, AU ;
- le plasma sur tube EDTA pour le dosage du MDA, et du AOPPs ;
- le sérum sur tube sec (avec élimination du fibrinogène) pour le dosage de la catalase.

II.2.4. Mesures de la pression artérielle

La mesure de la pression artérielle a été effectuée à l'aide d'un tensiomètre électronique, dont les valeurs sont exprimées en millimètre de mercure (mm Hg).

Placé sur le bras gauche du patient en position assise après un repos de 10 minutes au moins.

II.2.5. Mesure de l'indice de masse corporelle

Le poids a été mesuré avec une balance électronique, et la taille a été mesurée à l'aide d'une toise fixé. L'indice de masse corporelle (IMC) a été calculé selon la formule de Quételet :

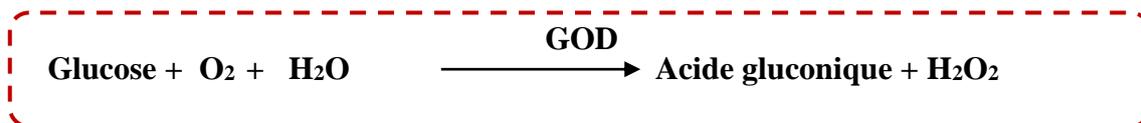
$$\text{IMC} = \text{Poids (kg)} / \text{Taille (m}^2\text{)}.$$

II.2.6. Mesure des paramètres biochimiques

III.2.6.1. Dosage du glucose

A.Principe :

La glycémie est dosée par la méthode enzymatique colorimétrique selon **TRINDER, (1969)**. Elle consiste à un dosage colorimétrique à la suite de deux réactions enzymatiques couplées. La première, catalysée par la glucose oxydase (GOD), transforme le glucose, en acide gluconique et en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 selon la réaction ci-dessous :



La peroxydase POD en présence du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 formé lors de la première réaction oxyde le chromogène incolore (4-aminophénazone) en un composé quinonéimine, de coloration rougeâtre. Cette coloration est d'autant plus intense que la quantité de glucose présente dans l'échantillon est élevée (réaction 2) :

Réaction 2 :



B. Mode opératoire (Pour les réactifs voir Annexe III) :

Afin de doser le glucose sanguin trois tubes ont été préparé successivement dont un tube blanc, un tube étalon et enfin le dernier contenant l'échantillon le plasma.

Tableau IV: Composition des 03 tubes pour le dosage du glucose.

La composition des réactifs voir (annexe IV).

Tube	Blanc	Etalon	Echantillon
Composition	1ml RT	1ml RT + 10 µl standard	1mlRT+10µl Plasma

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

Le calcul de la concentration du glucose exprimée en mol/l dans les échantillons se fait selon la formule suivante, avec n=1g/l la concentration de l'étalon.

:

$$[\text{Glucose}] = \frac{\text{DO Echantillon}}{\text{DO Etalon}} \times n$$

II.2.6.2. Dosage de l'hémoglobine glyquée (HbA1c).

Le dosage de l'hémoglobine glyquée (ou HbA1c) permet de vérifier l'équilibre du diabète. Il est le reflet de la glycémie (taux de sucre dans le sang) sur les 3 derniers mois. Ce dosage d'HbA1c nécessite un prélèvement sanguin dans un laboratoire d'analyse médicale. Il est recommandé au moins 2 fois par ans.

L'hémoglobine se trouve dans les globules rouges du sang. Elle a la particularité de **capter une partie du sucre** présent dans le sang. La partie de l'hémoglobine qui capte le sucre est appelée "hémoglobine glyquée".

Le dosage de l'hémoglobine glyquée, ou HbA1c, donne la proportion d'hémoglobine du sang qui a fixé du sucre. Elle s'exprime en **pourcentage**. Le terme "glyquée" vient de "glucose", le sucre qui est capté par l'hémoglobine.

A. 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 β 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.

B. Mode opératoire (Pour les réactifs voir Annexe III).

1. Préparation de l'hémolysât

L'hémolysât est récupéré après avoir éliminé la fraction labile à température ambiante (21-26°C). Ensuite, 50 μ l de sang sont ajoutés à 200 μ l de réactif 1 dans un tube à essai, puis agités et laissés à température ambiante pendant 10-15 mn.

2. Préparation des colonnes

La partie supérieure de la colonne est débouchée, par la suite la languette inférieure est cassée, l'éluât est alors éliminé.

3. Séparation et lecture de HbA1c

50 μ l d'hémolysât sont appliqués avec précaution sur le disque supérieur et l'éluât est éliminé. Quand l'hémolysât a entièrement pénétré, 200 μ l du réactif 2 (contenant un tampon de phosphate et l'azoture de sodium) sont ajoutés et l'éluât est éliminé. Après l'élution, on ajoute 2000 μ l du même réactif.

La colonne est placée sur un tube à essai contenant 4ml du réactif 3 (contenant un tampon de phosphate et l'azoture de sodium). La fraction HbA1c de l'éluât est ensuite récupérée. L'absorbance de la fraction HbA1c est lu à 415 nm par rapport à l'eau distillée (AHb1c), après avoir bien agité le mélange obtenu.

Pour la lecture d'Hémoglobine totale (Hb Totale), on prend 50 μ l de l'hémolysât précédemment préparé, et on le met dans des tubes en verres, puis on ajoute 12 ml

de réactif 3, après mélange l'absorbance à 415 nm est lue contre l'eau distillée, elle est stable pendant au moins une heure.

Le calcul de la concentration exprimée en pourcentage du HbA1c dans les échantillons est calculé selon la formule suivante :

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

DO_{HbA1c} : Densité Optique de l'hémoglobine glyquée.

DO_{Hb Totale} : Densité optique de l'hémoglobine totale.

II.2.6.3. Dosage des triglycérides

Les **triglycérides** sont des lipides qui servent de réserve énergétique. Elles proviennent de l'alimentation, et sont aussi synthétisées par le foie. Lorsqu'elles sont trop nombreuses dans le sang, elles constituent un facteur de risque cardiovasculaire car elles contribuent à « boucher » les artères.

Le dosage des triglycérides totaux est effectué dans le cadre d'un **bilan lipidique**, en même temps que le dosage du cholestérol (total, HDL et LDL), pour détecter une **dyslipidémie**, c'est-à-dire une anomalie du taux de graisses circulant dans le sang. Le dosage s'effectue grâce à un simple prélèvement sanguin.

A. Principe :

Le dosage des triglycérides se fait par une méthode enzymatique colorimétrique. La technique est décrite par **YOUNG et PESTANTER, en 1975**. Les triglycérides sont hydrolysés par une lipoprotéine-lipase (LPL) en glycérol et en acides gras (réaction 1).

Réaction 1 :



Le glycérol est ensuite phosphorylé en glycérol-3-phosphate par l'ATP lors d'une réaction catalysée par le glycérol kinase (GK) (réaction 2).

Réaction 2 :



L'oxydation du glycérol-3-phosphate est catalysée par la glycérol-phosphate-oxydase (GPO) pour former du dihydroxyacétone-phosphate et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (réaction 3).

Réaction 3 :



En présence de peroxydase, le peroxyde d'hydrogène formé entraîne le couplage oxydatif du 4-chlorophénol (4-CP) et de 4-aminophénazone (4-AP) pour former la quinonéimine colorée, selon la réaction de **TRINDER, 1969**. Le taux de Quinonéimine ainsi produit est proportionnel à la quantité initiale des triglycérides qui est mesurée à 505 nm (réaction 4).

Réaction 4 :



B. Mode opératoire (La composition des réactifs voir **annexe IV**) :

Tableau V: Composition des 3 tubes pour le dosage des triglycérides.

Tube	Blanc	Etalon	Echantillon
Composition	1000 µl RT	1000 µl RT + 10 µl standard	1000 µl RT+ 10µl Plasma

La densité optique (DO) des essais et des standards est lue contre un blanc à 505 nm, la lecture est faite par un spectrophotomètre. La coloration obtenue est stable 30 mn, l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en triglycérides dans le plasma. Le calcul de la concentration des triglycérides dans les échantillons est calculé selon la formule suivante, avec $n=2g/l$ représente la concentration de l'étalon.

$$[\text{Triglycéride}] \text{ g/l} = \frac{\text{DO Echantillon}}{\text{DO Etalon}} \times n$$

II.2.6.4. Dosage du cholestérol

A. Principe :

Le dosage du cholestérol total se fait par une méthode enzymatique colorimétrique. La cholestérol-estérase (CE) hydrolyse les esters du cholestérol pour former du cholestérol libre et des acides gras (réaction 1).

Réaction 1 :

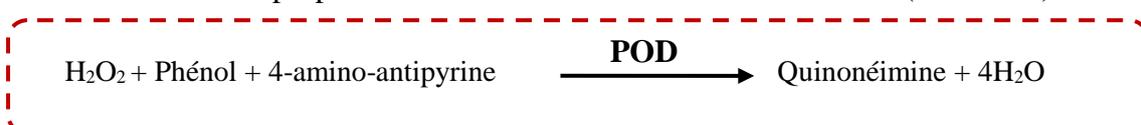


Le cholestérol oxydase (CHOD) catalyse ensuite l'oxydation du cholestérol en cholestène-4 one-3 et en peroxyde d'hydrogène (réaction 2).

Réaction 2 :



En présence de peroxydase (POD), le peroxyde d'hydrogène formé entraîne le couplage oxydatif du phénol et de 4-amino-antipyrine (4-AAP) pour former un complexe de coloration rouge : le quinonéimine. L'intensité de la couleur de ce dernier est directement proportionnelle à la concentration de cholestérol (réaction 3).



B. Mode opératoire (La composition des réactifs voir **annexe IV**):

Tableau VI : Composition des tubes pour le dosage du cholestérol.

Tube	Blanc	Etalon	Echantillon
Composition	1000 µl RT	1000 µl RT + 10 µl standard	1000 µl RT+ 10µl Plasma

On agite bien les tubes, et on les incube pendant 5 min, dans un bain marie à 37°C, la coloration finale est stable pendant 30 minutes, on ajuste le zéro du spectrophotomètre avec le blanc, lire directement l'absorbance à 505 nm.

L'intensité de la coloration obtenue est directement proportionnelle à la concentration en cholestérol. Le calcul de la concentration du cholestérol dans les échantillons est calculé selon la formule suivante :

$$[\text{Cholestérol}] \text{ g/l} = \frac{\text{DO Echantillon}}{\text{DO Etalon}} \times n$$

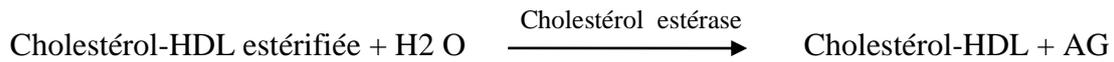
Où n représente la concentration de l'étalon, n=2g/l.

II.2.6.5. Dosage du HDL-Cholestérol

A. Principe :

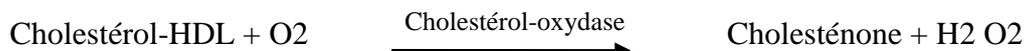
Le dosage du HDLc se fait par une méthode enzymatique colorimétrique. Les LDL, les VLDL et les chylomicrons contenus dans l'échantillon sont précipités par addition d'acide phosphotungstique en présence d'ion magnésium. Le surnageant après centrifugation contient les HDL cholestérol. La concentration en cholestérol HDL est déterminée par voie enzymatique à l'aide de cholestérol-estérase et de cholestérol-oxydase modifiées par du PEG (polyéthylène glycol). Sous l'action de la cholestérol-estérase, les esters du cholestérol sont scindés en cholestérol libre et en acides gras.

Réaction 1 :



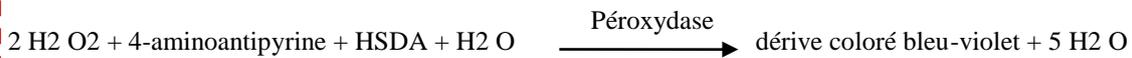
Dans une réaction ultérieure catalysée par le cholestérol-oxydase modifiée par le PEG, le cholestérol est transformé en présence d'oxygène en 4-cholesténone avec formation de l'eau oxygénée.

Réaction 2 :



En présence de peroxydase, l'eau oxygénée formée réagit avec l' amino-4-phénazone et l'HSDA (Sodium N-(hydroxy-2 Sulfo-3propyl) diméthyl- 3, 5 aniline) avec formation d'un dérivé coloré. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration en cholestérol HDL.

Réaction 3 :



B. Mode opératoire

500 µl de sérum sont ajoutés à 50 µl du réactif précipitant. L'ensemble est bien mélangé pendant 10 minutes à 20 -25°C ou 5 minutes à 37°C, ensuite centrifugé à 4000 tours/ minute pendant 10 minutes.

La concentration en cholestérol-HDL est mesurée dans le surnageant résultant de la centrifugation du précipité par la même technique enzymatique que le cholestérol total. La longueur d'onde 505 nm est utilisée pour la lecture des différentes concentrations des échantillons.

❖ Calcul de LDL-C

La concentration en cholestérol LDL dans l'échantillon est calculée par la formule de « FRIEDWALD », à condition que la concentration en TG soit inférieure à 4 g/l .

$$\text{LDL-C (g/l)} = \text{cholestérol total} - (\text{HDL-C} + \text{TG}/5)$$

NB : Le LDL-C doit être mesuré par un dosage direct si les triglycérides sont ≥ 4 g/l.

II.2.6.6. Dosage des enzymes hépatiques : Transaminases (ASAT, ALAT)

Les transaminases sont des enzymes de nature glycoprotéique ayant une activité importante dans le métabolisme protéique. Leur dosage a essentiellement pour but d'explorer la fonction hépatique. Leur augmentation reflète l'étendue de la cytolysse hépatique comme dans les hépatites infectieuses.

II.2.6.6.1. ASAT (Aspartate-Amino-Transférase) ou GOT (Glutamate-Oxaloacétate-Transaminase)

A. Principe :

Nous avons utilisé pour le dosage des ASAT une méthode cinétique pour la détermination de l'activité de la GOT. L'aspartate amino transférase (AST), initialement appelée transaminase glutamate oxaloacétique (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminique de l'aspartate vers l'alpha-cétoglutarate à formation de glutamate et d'oxalacétate (réaction 1).

Réaction 1 :



L'oxalacétate ainsi produit est réduit en malate en présence de la malate déshydrogénée (MDH) et NADH (réaction 2).

Réaction 2 :



B. Mode opératoire (La composition des réactifs voir **annexe V**) :

Introduire dans un tube 100 µl de Plasma et 1000 µl de Réactif de travail. Mélanger et incuber le tube pendant 1 min dans un bain marie à 37°C, on ajuste le zéro du spectrophotomètre sur l'eau distillé, lire l'absorbance initial à 430 nm puis toute les minutes pendant 03 minutes, la diminution de l'absorbance est due à la conversion de NADH en NAD⁺, et qui est proportionnelle à l'activité de ASAT. Afin de déterminer l'activité enzymatique de l'ASAT par la formule suivante exprimée en Unité International (UI) :

$$\text{ASAT UI/L} = \Delta A/\text{min} \times 1750$$

$\Delta A/\text{min}$: représente la moyenne des variations d'absorbance par minute.

II.2.6.6.2.ALAT (Alanine-Amino-Transférase) ou GPT

A. Principe :

L'ALAT initialement appelée transaminase glutamique pyruvique (GPT) a été dosé par une méthode cinétique, elle catalyse le transfert réversible d'un groupe animique d'alanine vers l' α -cétoglutarate pour former le glutamate et le pyruvate (réaction 1).

Réaction 1 :



Le Pyruvate ainsi formé, en présence du pouvoir réducteur le NADH+H, et sous l'action du lactate déshydrogénase (LDH) se transforme en L-lactate (réaction2).

Réaction 2 :



B .Mode opératoire (Voir la composition des réactifs **Annexe V**) :

Mettre dans un tube 1000 µl de Réactif de travail et 100 µl de Plasma, mélanger et incuber le tube pendant 1 min dans un bain marie à 37°C, on ajuste le zéro du spectrophotomètre sur l'eau distillé, lire l'absorbance initiale à 430 nm puis toutes les minutes pendant 03 minutes, sa diminution est due à la conversion de NADH en NAD⁺, et qui est proportionnelle à l'activité de l'ASAT. Le calcul de l'activité enzymatique de l'ASAT est donné par la formule suivante exprimée en Unité International (UI), avec ΔA/min l'absorbance par minute.

$$\text{ASAT UI/L} = \Delta A/\text{min} \times 1750.$$

II.2.6.7. Dosage de la créatinine

La créatinine est un déchet formé dans l'organisme à partir de la créatine, son élimination est exclusivement urinaire.

A. Principe :

Le dosage de créatinine plasmatique est effectué selon une méthode cinétique colorimétrique. En milieu alcalin, la créatinine réagit avec le picrate en formant un complexe coloré en rouge orange. L'absorbance de ce complexe est proportionnelle à la concentration de la créatinine dans l'échantillon (**LECOQ, 1972**).

B. Mode opératoire (voir la composition des réactifs **annexe VI**):

Tableau VII: Composition des tubes pour le dosage de la créatinine.

Tube	Blanc	Etalon	Echantillon
Composition	1000 µl RT	1000 µl RT +	1000 µl RT+
		100 µl standard	100 µl Plasma

Après avoir bien mélangé pendant 30 secondes, nous avons déterminé l'absorbance à 490nm contre un blanc. Le calcul de la concentration de la créatinine dans l'échantillon est calculé selon la formule suivante :

$$[\text{Créatinine}] \text{ mg/l} = \frac{(\text{DO2-DO1}) \text{ Echantillon}}{(\text{DO2-DO1}) \text{ Etalon}} \times n$$

n : Concentration de l'étalon.

DO 1 = Densité optique 10 seconde après l'addition de l'échantillon.

DO 2 = Densité optique 02 minutes après DO1.

II.2.6.8. Dosage de L'urée

L'urée est la principale forme d'élimination des déchets azotés du catabolisme protéique chez l'homme, éliminée principalement dans les urines, dont elle est utilisée pour le diagnostic et le suivi d'une insuffisance rénale.

A. Principe :

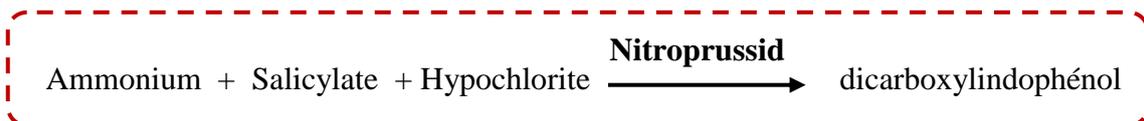
Le dosage de l'urée plasmatique se fait selon une méthode enzymatique colorimétrique basée sur l'action spécifique de l'uréase qui hydrolyse l'urée en ammoniacque et dioxyde de carbone (réaction 1).

Réaction 1 :



Les ions d'ammonium ainsi formés, forment avec l'hypochlorite et le salicylate en présence du Nitroprussid un complexe coloré bleu-vert (réaction 2).

Réaction 2 :



B. Mode Opérateur (voir la composition des réactifs Annexe VI):

Ce mode opératoire comprend deux étapes.

Tableau VIII: Composition des tubes pour le dosage de l'urée

Tube	Blanc	Etalon	Echantillon
Composition	1000 µl (R1+R2)	1000 µl (R1+R2) + 10 µl standard	1000 µl (R1+R2) + 10 µl Plasma
	Mélanger et incuber pendant 5 min à 37 °C		
	1000 µl R2	1000 µl R2	1000 µl R2

Les tubes sont à nouveau incubés pendant 5 min à 37°C, l'absorbance est lue à 580 nm contre le blanc. Le calcul de la concentration de l'urée dans les échantillons est calculé selon la formule suivante avec une concentration d'étalon n égale à 50mg/dl.

$$[\text{Urée}] \text{ mg/dl} = \frac{\text{DO Echantillon}}{\text{DO Etalon}} \times n$$

II.2.6.9. Dosage des protéines totales (protide)

Les protéines totales sont une variété hétérogène de protides composées d'un grand nombre d'acide aminés. Ces protéines comprennent l'albumine, les globulines et le fibrinogène, une hyperprotéïnémie peut être due à une augmentation importante des immunoglobulines monoclonales lors d'un myélome.

A. Principe :

Le dosage est effectué selon une méthode colorimétrique. Les liaisons peptidiques des protéines réagissent avec le Cu^{2+} en solution alcaline pour former un complexe de coloration bleu-violet, dont l'absorbance est proportionnelle à la concentration en protéine dans le plasma. Le réactif de Biuret contient du sodium potassium tartrate qui complexe les ions cuivriques, et maintient leur solubilité en solution alcaline.

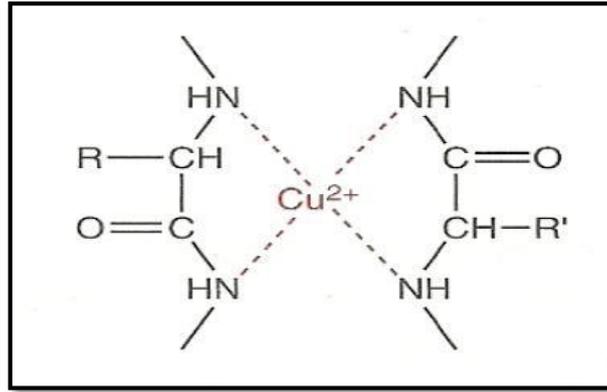


Figure 23 : Le complexe entre le cuivre alcalin et les liaisons peptidiques.

B. Mode Opérateur (voir la composition des réactifs **annexe VII**):

Tableau IX : Composition des tubes pour le dosage des protéines totaux.

Tubes	Blanc	Etalon	Echantillon
Composition	1000 µl de chlorure de sodium	20 µl de l'étalon	20 µl de Plasma
	+ 1000 µl de réactif de Biuret	+ 1000 µl de chlorure de sodium +1000 µl de réactif de Biuret	+ 1000 µl de chlorure de sodium +1000 µl de réactif de Biuret

Mélanger bien et laisser reposer 10 min à température ambiante. L'absorbance est lue à 550 nm contre le blanc réactif. Le calcul de la concentration plasmatique en protide est donné par la formule suivante avec une concentration d'étalon n égale à 60mg/l :

$$[\text{Protide}] \text{ g/l} = \frac{\text{DO Etalon}}{\text{DO Echantillon}} \times n$$

II.2.6.10. Dosage de l'Acide urique

A. Principe :

Le dosage de l'acide urique un produit principal du catabolisme des purines se fait selon une méthode enzymatique colorimétrique. L'uricase agit sur l'acide urique pour produire de l'allantoïne, du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et du dioxyde de carbone. En présence de peroxydase, le H₂O₂ réagit avec un chromogène « Dichloro-hydroxybenzène sulfonate et amino-antipyrine » pour former une quinonéimine de coloration rouge.

B. Mode opératoire (voir la composition des réactifs **annexe VII**) :

Tableau X: Composition des tubes pour le dosage de l'acide urique.

Tube	Blanc	Etalon	Echantillon
Composition	1000 µl RT	1000 µl RT + 25 µl standard	1000 µl RT+ 25 µl Plasma

Mélanger bien et laisser incuber pendant 5 min à 37°C. L'absorbance est lue contre un blanc à 505 nm. Le calcul de la concentration plasmatique en acide urique est donné par la formule suivante avec une concentration d'étalon n égale à 6mg/l :

$$[\text{Acide Urique}] \text{ mg/dl} = \frac{\text{DO Echantillon}}{\text{DO Etalon}} \times n$$

II.2.6.11. Dosage du magnésium

Le magnésium, est le deuxième cation intracellulaire le plus abondant dans l'organisme humain après le potassium, étant essentiel dans un grand nombre de processus enzymatique et métabolique. C'est un cofacteur dans toutes les réactions enzymatiques qui impliquent l'ATP. L'hypermagnésémie, qui peut être observé en cas d'acidose diabétique aigue.

A. Principe :

Le dosage est effectué selon une méthode colorimétrique ; le magnésium forme un complexe coloré en réagissant avec Magon sulfoné en solution alcaline.

B. Mode opératoire (voir la composition des réactifs **annexe VII**):

Tableau XI: Composition des tubes pour le dosage du magnésium.

Tube	Blanc	Etalon	Echantillon
Composition	1000 µl RT	1000 µl RT + 10 µl standard	1000 µl RT+ 10 µl Plasma

Mélanger et incuber 5 mn à température ambiante. L'absorbance (A) de l'étalon et de l'échantillon sont lues par rapport au témoin du réactif. Ainsi l'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration du magnésium, et elle est stable durant 30 minutes. Le calcul de la concentration plasmatique en Mg^{2+} est donné par la formule suivante, où n représente la concentration de l'étalon tel que n égal à 2mg/dl.

$$[Mg^{2+}] \text{ mg/dl} = \frac{(A) \text{ Echantillon} - (A) \text{ Blanc}}{(A) \text{ Etalon} - (A) \text{ Blanc}} \times 2 n$$

II.2.7. Paramètre du stress oxydant

II.2.7.1. Dosage de l'AOPP

A. Principe :

Les produits d'oxydation protéiques avancés résultent de l'interaction entre les protéines plasmatiques et les oxydants chlorés comme la chloramine (**Witko-Sarsat et al., 1996**).

B. Mode opératoire :

Un volume de 200 µl de plasma est dilué dans du tampon PBS (1: 5). Ensuite, un volume de 50 µl d'Iodure de Potassium (KI) et 100 µl d'acide acétique sont

ajoutés. L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 340 nm. La concentration des produits de l'oxydation protéique avancée est déterminée à l'aide d'une **courbe standard de chloramine T (0-100 µM)**.

II.2.7.2. Dosage du MDA

Le malondialdéhyde un des produit terminaux formé lors de la peroxydation des acides gras polyinsaturé méditée par les radicaux libres peut être détecté par une réaction colorimétrique à l'acide thiobarbiturique (TBA) selon la méthode de (OKHAW *et al.*, 1979). Le MDA permet la quantification de la peroxydation lipidique qui constitue le marqueur majeur du stress oxydant.

A. 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 (Figure 23) d'un pigment coloré « rose » absorbant à 530 nm, et extractible par les solvants organiques comme le butanol.

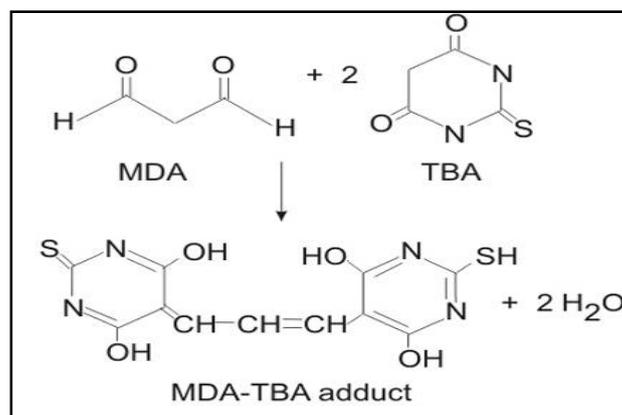


Figure 24 : formation d'adduit-TBA

B. Mode opératoire :

100µl de plasma sont mélangés à une solution constituée de 200µl d'acide thiobarbiturique à 20%, et 600µl d'acide-ortho-phosphorique à 1%. Le mélange est incubé pendant 1h dans un bain marie à 95°C, suivi d'un refroidissement dans de la glace pour arrêter la réaction. Ensuite 900µl de butanol sont ajoutés pour l'extraction du complexe MDA-TBA. L'ensemble est centrifugé à 4000rpm pendant 15 min. On obtient 2 phases et même 3 phases (Figure 24), on récupère directement le surnageant dans une cuve, et l'absorbance est lue à 532 nm contre un blanc qui

contient du butanol. 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 $\mu\text{mol/l}$.

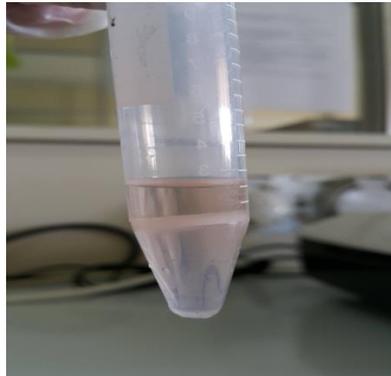
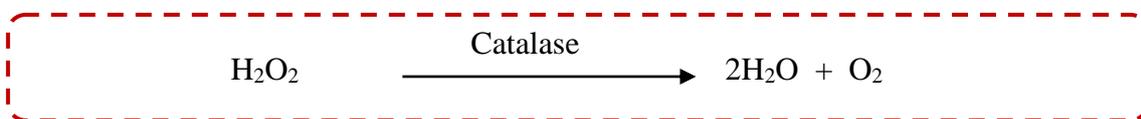


Figure 24 : Surnageant pour le dosage du MDA après centrifugation

II.2.7.3. Dosage de la catalase

A. Principe :

Le dosage de la catalase sérique se fait par la méthode **AEBI, 1984** et **CLAIBORNE, 1986**. La catalase décompose le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en dioxygène suivant la réaction ci-dessous. Ainsi, la disparition du peroxyde d'hydrogène peut être mesurée en spectrophotométrie à 240nm.



B. Mode opératoire :

50 μl d'échantillon (sérum) sont ajoutés à 950 μl de solution tampon (phosphate, 50mM, pH=7,4). La réaction est déclenchée avec 500 μl de H_2O_2 (**0,3%**). La lecture de la densité optique du milieu réactionnel se fait par spectrophotométrie à 240nm contre un blanc (tampon phosphate et H_2O_2), à l'obscurité chaque 30 secondes pendant 2 minutes.

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

$$\text{Catalase activity (U mg proteins)} = \frac{\Delta \text{DO/ min}}{0,040 \times \text{mg/ml protéines}}$$

0,040 : Coefficient de distinction moléculaire.

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 10 et Graph PAd Prism 6*.

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

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

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

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

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

Erreur standard de la moyenne (ESM) :

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

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

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

- 0,01 < P < 0,001..... *** hautement significative
- 0,05 < P < 0,01..... ** très significative
- P < 0,05..... * significative
- P > 0,05.....non significative

Résultats et discussion

III.1. Description de la population :

Rappelons que notre étude était portée sur 66 sujets dont 33 patients atteints de diabète de type 1 hypertendus, et non hypertendus, et 33 sujets témoins indemnes de toutes pathologies. Cependant, notre étude statistique n'a pas pris en considération les DT1 hypertendus, la raison est que le nombre de ces derniers est largement inférieur au nombre des DT1 non hypertendus.

Rappelons que l'objectif de notre travail est de montrer l'intérêt de l'estimation des produits protéiques d'oxydation avancée chez le diabétique de type 1.

Pour ce faire, nous allons explorer nos résultats par :

- Une étude descriptive des caractéristiques cliniques et épidémiologiques de la population ;
- Une évaluation des taux des AOPPs chez le diabétique de type 1 ;
- Une exploration du statut oxydatif par la peroxydation lipidique et la catalase chez le diabétique de type 1 ;
- Une corrélation des AOPPs au statut oxydative, et à l'équilibre glycémique.

L'évaluation clinique et épidémiologique des sujets de l'étude est regroupée dans le **tableau XII**.

L'étude des caractéristiques cliniques et épidémiologiques de notre population (**Tableau XII**), nous a permis de constater une prédominance féminine avec 21 femmes 63,36% vs 12 hommes 36,36 avec un sexe-ratio 1/2 pour le groupe des diabétiques de type 1. La même prédominance féminine a été constaté chez les témoins avec 69,69% femmes vs 30,30% hommes et un sexe-ratio 10/23.

Nous constatons que la moyenne d'âge des DT1 est de $36,11 \pm 2,21$ ans vs $32,3 \pm 4,22$ ans pour les témoins. L'âge du début de diabète était de $23,54 \pm 1,73$ ans avec une durée moyenne de $12,25 \pm 1,41$ ans et un taux d'hémoglobine glyquée de $8,02 \pm 2,04\%$.

Tableau XII : Caractéristiques cliniques et épidémiologique de la population de l'étude.

Paramètres	DT1	Témoins
Nombre de population total (%)	33(50%)	33(50%)
Hommes (%)	12(36,36%)	10(30,30%)
Femmes (%)	21(63,36%)	23(69,69%)
Sexe- ratio	1/2	10/23
Age (ans)	36,11±2,21	32,3±4,22
Durée du diabète (Ans)	12,25±1,41	/
Age début DT(Ans)	23,54±1,73	/
Indice de masse corporelle (kg/m ²)	24,19±0,76	23,80±0,56
Pression artérielle systolique (mmHg)	112,56±0,25	114,22±3,15
Pression artérielle diastolique (mmHg)	90,17±1,94	71,32±0,98
Hémoglobine glyquée HbA1c %	8,02±2,04	/
Triglycéride (g/l)	0,83±0,08	1,47±0,04
Cholestérol total (g/l)	1,68±0,06	0,39±0,01
HDLc (lipoprotéine de haut poids moléculaires) (g/l)	0,53±0,04	0,94±0,04
LDLc (lipoprotéine de faible poids moléculaires) (g/l)	0,89±0,07	<1,60
Créatinine (mg/l)	8,88±0,51	7,28±1,79
Urée (g/l)	0,19±0,01	0,18±0,02
ASAT (UI/l)	21,8±1,75	19,25±0,73
ALAT (UI/l)	15,37±1,29	14,74±1,04
Protéines totaux (g/l)	66,35±2,17	60-75
Magnésium (mg/l)	28,26±1,95	16-25
acide urique (mg/l)	44,32±2,70	40-60

Valeurs exprimées en moyenne ± écart type.

Ces résultats montrent une concordance avec l'étude de **LOSADA et ALIO en 1997**, qui ont trouvé sur 60 patients diabétiques de type 1 que l'âge moyen respectif était de 35±13,23 ans et 26,92±14,07 ans avec une prédominance féminine dont 41 femmes et 29 hommes.

Il semble que d'après ces résultats que le DT1 est plus rencontré chez les femmes que chez les hommes. Cette prédominance du sexe féminin a été confirmée aussi dans l'étude de **TOURE en 1998**, qui a trouvé 50,5% de femmes et 49,5% d'hommes. Cependant 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.

FALFOUL et ses collaborateurs en 2010, ont montré par une étude similaire ayant concerné 50 patients diabétiques de type 1 répartis en 23 hommes et 27 femmes que l'âge moyen était de $31,82 \pm 11,06$ ans. Ce qui confirme effectivement la jeunesse de la population diabétique, d'où son appellation ancienne de « diabète juvénile ».

Le statut anthropométrique a fait l'objet d'un seul paramètre qui est l'indice de masse corporelle (IMC), dont nous constatons que notre population diabétique et témoin est caractérisée par un poids normal avec un IMC de $24,19 \pm 0,76$ Kg/m² et $23,8 \pm 0,56$ Kg/m² respectivement. Ce résultat est similaire à celui de l'étude de **FALFOUL et ses collaborateurs en 2010**, avec un IMC de $22,55 \pm 3,62$ Kg/m².

Mais qui ne concorde pas avec l'étude menée par **MNIF et ses collaborateurs en 2012**, portée sur 16 diabétiques type 1, hospitalisés au service d'endocrinologie diabétologie sur une durée de 13 ans. Ces sujets présentent un IMC de $29,2$ Kg/m² avec un statut lipidique déséquilibré. Ce surpoids peut être expliqué par la qualité d'alimentation, et le degré de sédentarité en comparaison à notre population diabétique.

Le statut hémodynamique est représenté par la pression artérielle systolique (P.A.S), et par la pression artérielle diastolique (P.A.D). Cependant, il faut noter que la pression artérielle systolique supérieure à 135mmHg, et la pression artérielle diastolique supérieure à 85mmHg est un facteur de risque cardiovasculaire et rénal pour les sujets diabétiques. Dans notre étude, l'exploration de ce statut montre que la P.A.S est équilibrée dans les deux populations d'étude avec, une valeur de $112,56 \pm 0,25$ mmHg chez les DT1 vs $114,22 \pm 3,15$ chez les témoins. Tandis que les résultats de la P.A.D semblent supérieurs pour les DT1, avec une valeur moyenne de $90,17 \pm 1,94$ mmHg vs $71,32 \pm 0,98$ mmHg pour les témoins.

En effet plusieurs études ont confirmé qu'un contrôle optimale de la pression artérielle prévient ou ralentit le développement des lésions rénales chez les diabétiques de type 1 (**POULSEN, 2002**).

L'exploration du profil lipidique chez les diabétique de type 1 ainsi que chez les témoins n'a enregistré aucune dyslipidémie. La comparaison entre les taux moyens de triglycéride des diabétiques et des témoins montre qu'ils appartiennent à

la norme [0,5-1,5] (g/l), avec des valeurs moyennes de $0,83\pm 0,08$ g/l chez les DT1 vs $1,47\pm 0,04$ g/l chez les témoins. Aussi, nous observons un taux équilibré du cholestérol chez les DT1 avec une valeur moyenne de $1,68\pm 0,06$ g/l, une moyenne plus élevée par rapport aux témoins $0,39\pm 0,01$ g/l.

Nous remarquons aussi que le taux du HDL est équilibré chez les DT1 avec une valeur moyenne de $0,53\pm 0,04$ g/l, une moyenne plus faible cette fois ci par rapport aux témoins $0,94\pm 0,04$ g/l. Nos résultats montrent ainsi que le taux moyen des LDL est de $0,89\pm 0,07$ g/l par rapport à la norme ($<1,60$) g/l.

La dyslipidémie a été montrée pour être un facteur de risque de maladie coronarienne dans le diabète de type 1, ainsi il semble important de prêter attention aux anomalies lipidiques chez les patients atteints de DT1, afin de réduire les maladies cardiovasculaires qui sont la principale cause de décès chez les DT1. Cependant selon **BRUNO en 2011**, les patients avec un contrôle optimal du diabète montrent un taux normal ou légèrement inférieur au taux des triglycérides et LDL. La carence insulinaire accompagnant les épisodes d'acidocétose diabétique est conçue d'induire une hypertriglycéridémie, et une diminution des LDL plasmatique suite à la réduction du catabolisme des lipoprotéines riches en triglycéride (**BRUNO, 2011**).

En effet nos résultats ne montrent aucune correspondance avec les travaux de **MOSAAD et ABD-ALLAH en 2004**, où la concentration moyenne du cholestérol, des LDL, et des triglycérides sont élevés chez les DT1, ainsi que le taux des HDL a été significativement diminué. Les taux inférieurs observés chez notre population, semblent être dus à l'efficacité du traitement insulinaire qui favorise la lipogénèse.

L'exploration de la fonction rénale dans notre étude était sujette au dosage de la créatininémie et l'urémie, démontrant d'une part que les sujets diabétiques de type 1 présentent un taux moyen de $8,88\pm 0,51$ mg/l de créatinine vs $7,28\pm 1,79$ mg/l chez les témoins, ce qui est de concordance avec les travaux de **BOUATTAR et ses collaborateurs en 2009**, qui ont trouvé un taux de $8,2\pm 2,1$ mg/l chez un groupe de diabétique indemne de toutes complications.

D'autre part le taux d'urée est de $0,19\pm 0,01$ g/l chez les DT1 vs $0,18\pm 0,02$ g/l chez les témoins. **REDOUN en 2011**, a montré que le taux d'urée a augmenté

proportionnellement avec le degré de l'atteinte rénale chez les DT1. En outre le taux de l'urée sanguin dépend de nombreux facteurs tels que les apports protidiques **(Roland et al., 2011)**.

Sachant que la néphropathie diabétique est une conséquence d'un déséquilibre glycémique assez commune chez les personnes atteintes de DT1. Nos résultats montrent que la fonction rénale est préservée, et ceci à été confirmé par le taux normal de la créatinine et de l'urée.

Les transaminases ASAT et ALAT, constituent l'essentiel du bilan hépatique. Dans cette étude, les résultats du dosage des paramètres hépatiques montrent une fonctionnalité conservée avec un taux moyen de $21,8 \pm 1,75$ UI/l de l'aspartate aminotransférase chez les DT1 vs $19,25 \pm 0,73$ UI/l chez les témoins, et une valeur moyenne de $15,37 \pm 1,29$ UI/l pour l'alanine aminotransférase chez les DT1 vs $14,74 \pm 1,04$ UI/l chez les témoins.

Le dosage sanguin des transaminases (ALAT, et ASAT), est un des plus fréquemment effectué au cours d'une prise de sang, Les transaminases sont des enzymes ayant une activité métabolique à l'intérieur des cellules. Ces enzymes sont présentes dans plusieurs tissus (foie, cœur, reins, muscles...) reflétant ainsi l'activité du foie et du cœur.

Il est nécessaire pour le diagnostic et la surveillance de toutes les maladies impliquant directement ou indirectement le foie, d'origine infectieuse (hépatites virales), toxique (médicaments, alcool), maladies auto-immunes, cancéreuse,...etc. Il permet de comprendre le mécanisme de l'atteinte du foie en repérant les différents syndromes dont les principaux sont l'insuffisance hépatique, la cytolyse, la cholestase (avec ou sans ictère) et l'inflammation. C'est dans ce cadre que nous nous sommes intéressés à ce statut.

Parmi les autres paramètres du profil plasmatique, nous nous sommes intéressés à la détermination de la concentration plasmatique en protéines dont nous constatons un taux moyen de $66,35 \pm 2,17$ g/l chez DT1 par rapport à la norme qui est entre 60 et 75 g/l. Tenant compte de la capacité antioxydante de l'acide urique démontré déjà par la littérature, nos résultats montrent que l'uricémie est maintenue équilibrée chez les diabétiques type 1 avec un taux moyen de $44,32 \pm 2,70$ mg/l.

Ainsi le dosage du magnésium plasmatique (la magnésémie) chez les diabétiques type 1 montre un taux élevée par rapport à la norme avec une valeur moyenne de $28,26 \pm 1,95$ mg/l, ce résultat ne concorde pas avec l'étude de **ABDUL en 2002**, qui n'a pas trouvé une différence significative entre les diabétiques type 1 17 ± 1 mg/l et les témoins $16 \pm 0,7$ mg/l, les même résultats ont été trouvé par **MOSAAD et ABD-ALLAH en 2004**, avec un taux moyen de $20,38 \pm 0,52$ mg/l chez les DT1 vs $22,13 \pm 1,65$ mg/l ainsi plusieurs autre études antérieurs ont rapporté une hypomagnésémie chez les patients atteints de diabète de type 1 (**ISBIR et al., 1994 ; Gurlek et Bayraktar, 1998**).

Cependant l'hypermagnésémie constatée au cours de notre étude semble être due aux troubles électrolytiques observés au cours de l'acidocétose diabétique, comme peut être c'est la conséquence d'une insuffisance rénale, malgré que le bilan rénal montre une fonction rénale préservée.

La créatinine est un composé que l'on dose dans le sang, et parfois dans les urines, pour évaluer la fonction rénale. Mais le taux de créatinine reflète aussi la quantité de masse musculaire et donc l'intensité de l'activité physique.

Le dosage de la créatinine ne nous renseigne pas sur le diagnostic de l'insuffisance rénale débutante particulièrement chez les sujets âgés (sa valeur dépend du sexe, de la masse musculaire et de l'alimentation) (**DUSSOL., 2011**).

III.2. Exploration du statut oxydatif :

Pour explorer le statut oxydatif, nous avons évalué les taux plasmatiques de trois paramètres : AOPPs, MDA, et la catalase

III.2.1. Distribution de l'AOPP chez la population d'étude :

La conséquence de l'oxydation des protéines a été recherché chez les diabétiques de type 1 et les témoins par le dosage du taux de l'AOPP, les résultats obtenus sont répertoriés dans le **tableau XIII** et représentés par la **figure 26**.

Tableau XIII : Evaluation de la concentration de l'AOPP chez les DT1 et les témoins.

Paramètre	33 DT1	33 Témoins	P value	significativité
AOPP ($\mu\text{mol/l}$)	88,23 \pm 6,68	55,58 \pm 3,07	0,0002	***

Valeurs exprimées en moyenne \pm écart type.

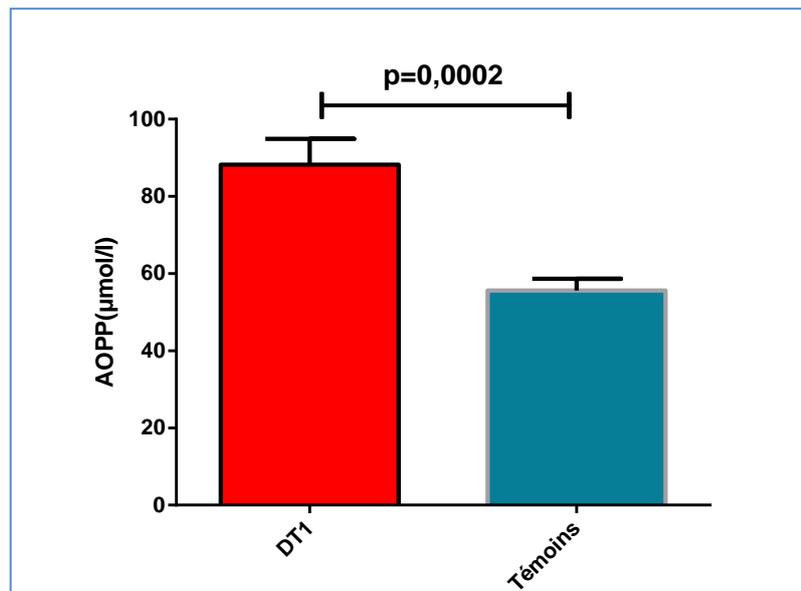


Figure 26 : Evaluation du taux moyen de l'AOPP chez les diabétiques et les témoins (*La différence est hautement significative à *** $p < 0,001$*).

La figure 26, représentant le taux moyen de l'AOPP chez les DT1 et les témoins montre que la concentration moyenne de l'AOPP chez les DT1 est plus élevée par rapport aux témoins avec des valeurs respectives de (88,23 \pm 6,68) $\mu\text{mol/l}$ et (55,58 \pm 3,07) $\mu\text{mol/l}$. La comparaison entre les deux groupes DT1 et témoins par le test de Mann Whitney montre qu'il existe une différence hautement significative ($p = 0,0002$) vs témoins (**Tableau XIII**).

Pour les DT1, l'hyperglycémie chronique induit des séquelle biochimiques multiples, et le stress oxydatif induit par le diabète pourrait jouer un rôle dans l'apparition et la progression de la maladie (**PILAR et al., 2003**).

Une surcharge d'EROs est connue pour modifier les protéines en premier lieu et générer des aldéhydes réactifs issus de la peroxydation des lipides, ces molécules

à leur tour peuvent également produire des modifications secondaires des protéines (**PILAR *et al.*, 2003**).

La présence de protéine oxydée à été confirmé par un nouveau marqueur qui fournit des information sur le degré des dommages oxydatifs des protéines et la présence d'un stress oxydatif (**KALOUSOVA *et al.*, 2001**).

Nos résultats se confirment avec les travaux de **KALOUSOVA *et ses collaborateurs en 2001***, qui ont montré que sur 52 sujets diabétiques dont 18 atteints de DT1 et 34 atteints de diabète de type 2 (DT2), que le taux de l'AOPP était significativement élevé dans les deux types de diabète avec un taux de $97,5 \pm 30,9$ $\mu\text{mol/l}$ chez les DT1 vs $79,80 \pm 23,72$ $\mu\text{mol/l}$ chez les témoins, avec une moyenne plus élevée chez les DT2. Les mêmes résultats ont été trouvés par **MOSAAD et Abd-Allah en 2004**, où les taux moyens de l'AOPP étaient très significativement élevés chez les DT1 que chez les témoins avec $116,47 \pm 35,42$ $\mu\text{mol/l}$ et $65,71 \pm 18,15$ $\mu\text{mol/l}$ respectivement.

L'augmentation de l'AOPP chez les patients diabétiques peut être due à la génération d'ERO, ainsi que de la modification oxydative des LDL puisque ces derniers sont souvent les premiers à être détectés chez les DT1 (**MOSAAD et ABD-ALLAH, 2004**).

III.2.2. Distribution de l'AOPP selon le sexe :

Tableau XIV : Evaluation de la variation des taux de l'AOPP en fonction du sexe chez les DT1.

Paramètre	Femmes N=21	Hommes N=12	P value	Significativité
AOPP ($\mu\text{mol/l}$)	86,04 \pm 8,14	94,57 \pm 11,83	0,5463	Ns

Valeurs exprimées en moyenne \pm écart type.

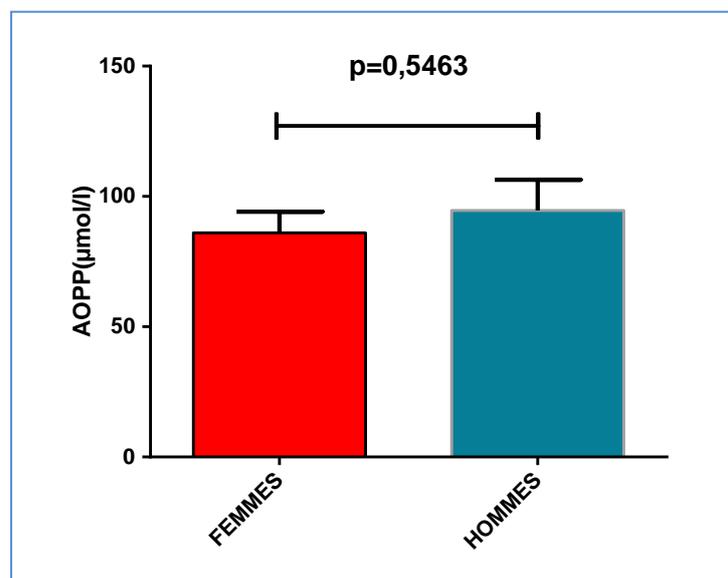


Figure 27 : Variation des taux de l'AOPP chez les femmes et les hommes atteints de DT1, (La différence n'est pas significative à $p > 0.05$).

La figure 27, représente la variation des taux de l'AOPP entre les deux sexes des femmes et des hommes atteints de DT1. Ainsi, nous observons que les femmes ont des taux plus faibles $86,04 \pm 8,14 \mu\text{mol/l}$ par rapport aux hommes qui ont un taux de $94,57 \pm 11,83 \mu\text{mol/l}$. La comparaison entre les deux groupes hommes et femmes par le test de Student montre qu'il n'existe pas de différence significative ($p=0,5463$) entre eux (Tableau XIV).

Nos résultats s'accordent avec les travaux de **MALGORZATA et ses collaborateurs en 2007**, qui ont montré que sur 115 enfants diabétiques il n'existe aucune différence significative entre le taux de l'AOPP et le sexe ($p=0,346$).

Cependant, la différence entre les deux sexes peut être expliquée par le fait que les hommes sont plus fumeurs que les femmes, ainsi que la pratique du sport est généralement plus remarquable chez les hommes, en effet la pratique d'un sport pour le plaisir, associée à une alimentation équilibrée sont incontestablement des atouts de poids pour conserver un état de santé optimal le plus longtemps possible. Mais tout excès est susceptible d'engendrer des effets néfastes pour le développement d'un stress oxydant dont les effets peuvent porter sur l'atteinte des protéines plasmatiques qui sont les premiers à être exposés à cet état de stress (**PINCEMAIL et al., 2003**)

Il semble aussi que la femme bénéficie de quelques avantages par rapport à l'homme puisque l'accroissement de la production du taux de progestérones dès l'âge de la puberté à la ménopause lui permet de combattre contre le stress oxydatif par la stimulation de la production des enzymes antioxydants.

III.2.3. Distribution des taux de l'AOPP selon l'âge du début du diabète :

Tableau XV : Variation des taux de l'AOPP selon l'âge du début du diabète.

Age du début du diabète	AOPP ($\mu\text{mol/l}$)	P value	Significativité
< 20 ans (n=12)	85 \pm 0,39	0,0414	*
(20_30) ans (n=11)	83 \pm 0,46	0,00003	***
(30_40) ans (n=7)	86 \pm 0,41	0,046361	*
(40_50) ans (n=2)	91 \pm 0,47	0,0134	*
Témoins (n=33)	55,58 \pm 3,07	–	
ANOVA test		< 0,0001	****

Valeurs exprimées en moyenne \pm écart type.

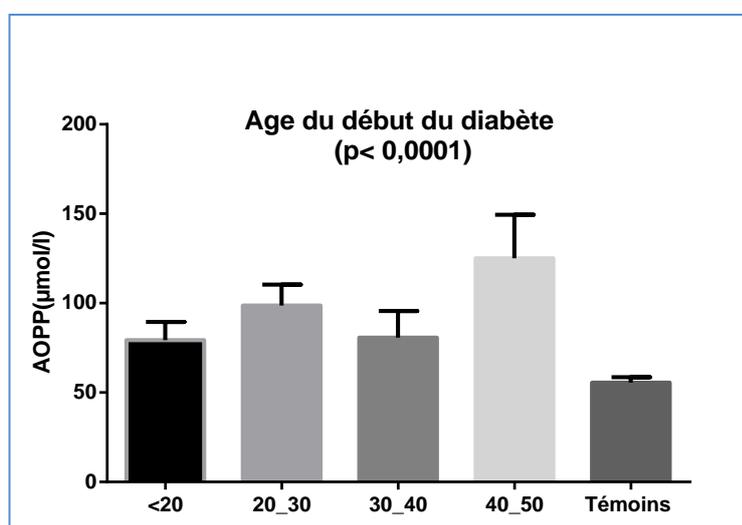


Figure 28: Variation des taux de l'AOPP en fonction de l'âge du début du diabète (La différence est hautement significative à $***p < 0,001$ vs témoin).

La **figure 28** et le **tableau XV**, représentent la variation des taux de l'AOPP selon l'âge du début de diabète. La figure ci-dessus, montre que le taux de l'AOPP est plus élevé chez le groupe des diabétiques dont l'âge du début du diabète est entre (40 – 50) ans par rapport aux autres groupes, ainsi que la différence est hautement significative entre les différents groupes DT1 et les témoins ($P < 0,0001$).

L'étude statistique par ANNOVA à un facteur montre qu'il existe une différence hautement significative entre le taux de l'AOPP chez le groupe des DT1

dont l'âge du début du diabète est entre 20 et 30 ans et les autres groupes DT1 (P=0,00003), ainsi qu'une différence significative entre les différents groupes DT1 dont l'âge du début du diabète est (<20 ans), (30-40) ans et (40-50) ans avec (P<0,05) .

D'après ces résultats on peut supposer que l'augmentation du taux de l'AOPP chez les DT1 dont l'âge du début du diabète était après 40 ans, est due à une diminution des capacités antioxydantes par rapport aux autres groupes, et à une forte oxydation des protéines.

III.2.4. Distribution des taux de l'AOPP selon la durée du diabète :

Tableau XVI : Variation du taux de l'AOPP selon la durée du diabète.

Durée du DT1	AOPP ($\mu\text{mol/l}$)	P valeur	Significativité
(0_5) (n=8)	74,66 \pm 13,39	0,0631	ns
(5_10) (n=7)	80,49 \pm 10,38		
(10_15) (n=6)	94,91 \pm 16,82		
(15_20) (n=4)	75,54 \pm 17,15		
(20_25) (n=4)	147,9 \pm 2,15		
(25_30) (n=2)	75,95 \pm 0		
(30_35) (n=2)	59,64 \pm 17,14		

Valeurs exprimées en moyenne \pm écart type.

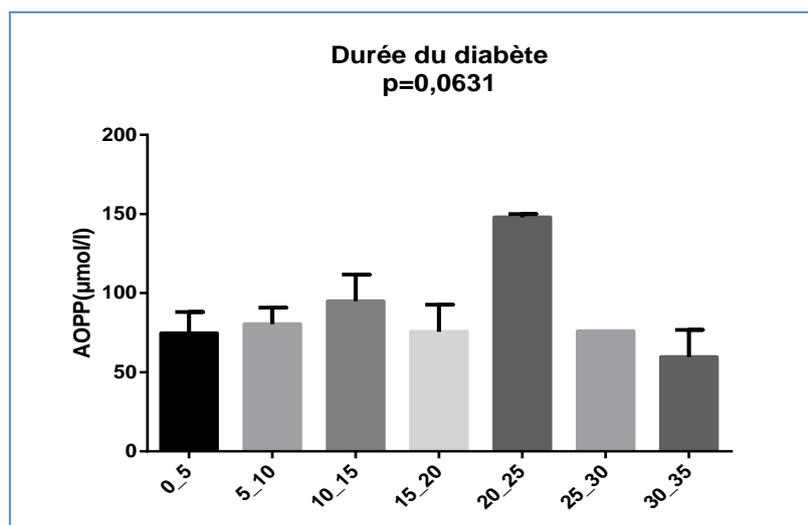


Figure 29: Variation du taux de l'AOPP en fonction de la durée du diabète (*La différence n'est pas significative à $p > 0.05$*).

Selon la **figure 29** et le **tableau XVI** qui représentent la variation du taux de L'AOPP en fonction de la durée du diabète nous constatons que le taux de l'AOPP est plus élevé chez le groupe des DT1 dont la durée du diabète est entre (20-25) ans par rapport aux autres groupes DT1. L'analyse statistique par ANNOVA à un facteur n'a montré aucune différence significative entre les différents groupes de diabétique classés selon la durée du diabète ($P=0,0631$).

Cependant, la comparaison deux à deux des différents groupes des diabétiques et des témoins par le test de Student (**Annexe VIII**) montre globalement une différence hautement significative entre le groupe de DT1 dont la durée du diabète est de (20-25) ans avec les groupes DT1 dont la durée du diabète est de (0-5) ans, (5-10) ans et (15-20) ans .

En effet les travaux de **KALOUSOVA et ses collaborateurs en 2001**, ont montré qu'il n'y a aucune relation entre le taux de l'AOPP et la durée du diabète. Par contre, **KRZYTEK-KORPACKA et ses collaborateurs en 2008**, ont montré par une étude menée sur des jeunes DT1 que le taux de l'AOPP trouvé, c'était un taux accumulé au fil du temps, donc ce il est significativement associé à la durée du diabète.

Ainsi que **Malgorzata et ses collaborateur en 2007**, ont montré par une expérience réalisée sur 45 sujets DT1 parmi 87 que le taux moyen de l'AOPP chez des DT1 avec une durée du diabète inférieur à 04 ans diffère significativement du taux de l'AOPP des diabétiques avec une durée du diabète plus longue ($p=0,009$).

En revanche, **JAKU et ses collaborateurs en 2012**, suggèrent qu'il n y a pas de relation entre le taux de l'AOPP élevé chez les enfants atteints de DT1, et la durée du diabète.

Plusieurs études portées sur des DT1 ont montré qu'il n'existe aucune différence significative entre le taux de l'AOPP chez les DT1 avec et sans complication micro et macro-vasculaire (**KALOUSOVA et al., 2001**), tenant compte de ces études et Sachant que les complications diabétiques apparaissent avec la progression de la maladie, nous pouvons suggérer qu'il n'existe aucune relation entre le taux de l'AOPP et la durée du diabète.

BASKOL et ses collaborateurs en 2008, ont montré par une étude porté sur 57 patients DT2 dont 37 avec rétinopathie, que le taux d'AOPP est élevé chez les deux groupes de diabétique, sans aucune différence significative.

III.2.5. Etude de la variation des taux de l'AOPP en fonction de l'équilibre glycémique :

Tableau XVII : Variation du taux de l'AOPP en fonction du taux de l'hémoglobine glyquée chez les DT1.

	HbA1C<7 (N=2)	HbA1C>7 (N=31)	P value	significativité
AOPP (µmol/l)	94,85 ± 15,36	78,69 ± 7,543	0,2963	Ns

Valeurs exprimées en moyenne ± écart type.

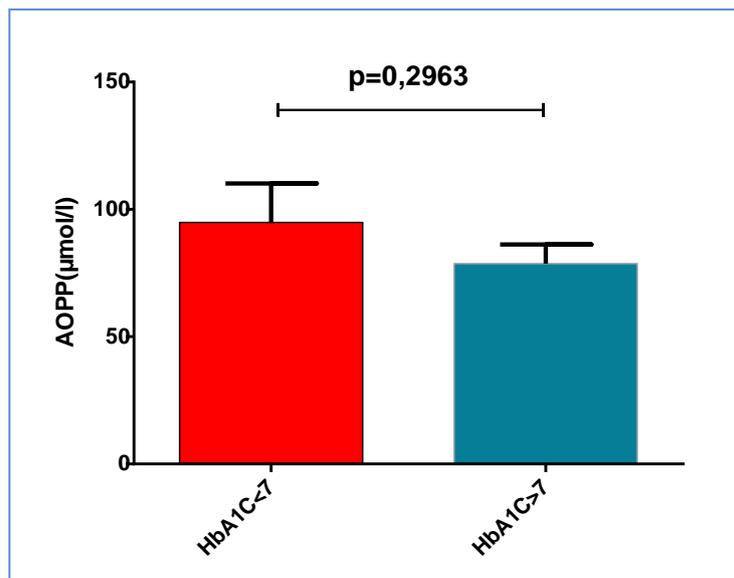


Figure 30 : Variation du taux de l'AOPP en fonction du taux de l'hémoglobine glyquée chez les DT1 (La différence n'est pas significative à $p>0.05$).

La **figure 30** représente la variation du taux de l'AOPP chez les diabétiques type 1 en fonction du taux de l'hémoglobine glyquée, nos résultats montrent que le groupe des DT1 ayant un taux d'HbA1c>7 ont un taux d'AOPP inférieur (78,69±7,543) µmol/l de ceux du groupe avec un taux d'HbA1c<7 (94,85±15,36) µmol/l (**Tableau XVII**). La comparaison des deux groupes par le test de Student

montre qu'il n'existe pas de différence significative ($P=0,2963$) entre les deux groupes.

L'analyse de régression de l'AOPP chez les diabétiques (**Annexe IX**) a montré une corrélation faiblement négative avec la glycémie à jeun ($r= - 0,3025$) et l'hémoglobine glyquée ($r= -0,1621$).

L'HbA1c est définie par la fixation lente et irréversible d'une molécule de glucose désignée comme étant un exemple caractéristique des produits d'Amadori. C'est un marqueur qui prend de plus en plus d'importance vu son rôle à la fois dans le diagnostic, et le suivi du patient diabétique de type 1 et de type 2, représentant ainsi le reflet de l'équilibre glycémique sur une période moyenne de 2 à 3 mois ([ZENDJABIL., 2015](#)).

Nos résultats concordent avec les travaux de [KOSTOLANSKA et ses collaborateurs en 2009](#), qui ont montré que pour 60 enfants atteints de DT1, le taux de l'AOPP est plus élevée pour une HbA1c>8% par rapport au groupe d'enfants ayant une HbA1c <8%.

MALGORZATA et ses collaborateurs en 2007, ont montré par une étude réalisée sur 115 enfants DT1 équilibré (HbA1c<8%) et non équilibré (HbA1c>8%) que le taux de l'AOPP est significativement plus élevé chez les deux groupes de diabétiques classé en fonction de l'équilibre glycémique. Cependant d'autre travaux réalisés par ([JANA et al., 2009](#)) n'ont pas trouvé de différence significative.

Nos résultats ne concordent pas avec ceux décrit par **MATTAENCCI E et ses collaborateurs en 2001**, qui ont trouvé que le taux de l'AOPP présente une corrélation avec la concentration du glucose dans le plasma chez les sujets diabétiques, **EMMA et ses collaborateurs en 2015**, confirment cette corrélation.

Cependant les travaux réalisé par ([KALOUSOVA et al., 2001](#)), n'ont montré aucune corrélation entre le taux de l'AOPP et la statut glycémique (glycémie et HbA1c).

Le contrôle de la glycémie joue un rôle important dans l'étiologie des complications diabétiques. Des données récentes soutiennent l'hypothèse que des voies non-enzymatiques (glycation et oxydation) sont impliquées dans la pathogenèse des lésions tissulaires dans le diabète sucré ([ODETTI P et al., 1996](#)).

Les AOPPs sont une famille de protéines réticulées, formée par la réaction des protéines plasmatiques avec les oxydants chlorés, la production de ces derniers est une caractéristique des neutrophiles qui jouent un rôle important dans les réactions inflammatoires (WEI *et al.*, 2014), par la suite on peut supposer que si la génération des AOPPs n'est pas fonction de l'équilibre glycémique, elle sera obligatoirement en fonction de l'intensité de l'inflammation.

III.2.6. Autres paramètres du statut oxydatif :

III.2.6.1. Evaluation du taux de MDA :

La peroxydation lipidique est estimée chez les diabétiques de type 1, ainsi que chez les témoins par le dosage de malondialdéhyde plasmatique (MDA), les résultats obtenus sont répertoriés dans le **tableau XIX** et représentés dans la **figure 31**.

Tableau XVIII : Evaluation de la concentration du MDA chez les DT1 et les témoins.

Paramètre	DT 1 N=33	Témoins N=33	P value	Significativité
MDA ($\mu\text{mol/ml}$)	3,88 \pm 0,05	0,64 \pm 0,002	<0,0001	****

Valeurs exprimées en moyenne \pm écart type.

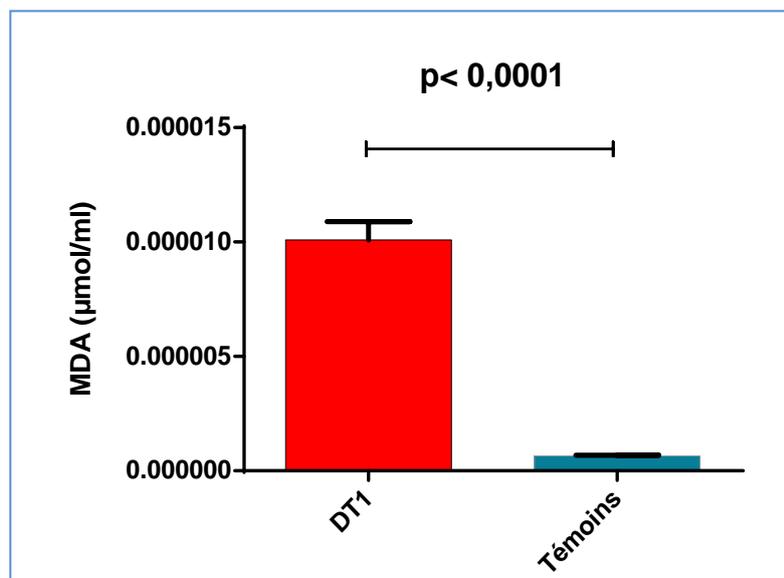


Figure 31: Evaluation de la peroxydation lipidique chez les diabétiques de type 1 et les témoins (La différence est hautement significative à $***p < 0,001$ vs témoin).

La **figure 31** représente la variation du taux moyen de MDA plasmatique chez les DT1 ainsi que chez les témoins. A partir de ces résultats, nous concluons que la concentration moyenne de MDA chez les DT1 est plus élevée en comparaison aux témoins avec $(3,88 \pm 0,05) \mu\text{mol/l}$ et $(0,64 \pm 0,002) \mu\text{mol/l}$ respectivement (**Tableau XVIII**), la différence entre les DT1 et les témoins est hautement significative à $p < 0.0001$.

L'analyse de régression de l'AOPP chez les DT1 (Annexe X) a montré une corrélation faiblement négative avec le MDA ($r = -0,0218$).

La Peroxydation lipidique est un mécanisme bien établi dans les lésions cellulaires, elle est utilisée comme un indicateur du stress oxydatif dans les cellules et les tissus. Et elle est toujours une indication du déclin des mécanismes de défense enzymatiques et non enzymatiques (**BRAHM *et al.*, 2013**).

Malondialdehyde (MDA) est un produit naturel de la peroxydation lipidique, il peut également être généré au cours de la biosynthèse des prostaglandines dans les cellules (**SUWIMOL, 2005**). Leur détermination a suscité un large intérêt, car il semble offrir un moyen facile pour l'évaluation du stress oxydatif (**DRAPER et HADLEY, 1990**).

Les résultats obtenus se concordent avec les travaux de **GALLOU *et ses collaborateurs en 1993***, qui ont montré que les concentrations du MDA chez 117 sujets diabétiques (type 1 et 2) étaient plus élevées chez les DT1 par rapport aux témoins. Les mêmes résultats ont été obtenus par **JANA *et ses collaborateurs en 2001***, dont les niveaux de MDA étaient significativement plus élevés chez les enfants DT1 par rapport aux enfants en bonne santé. D'autres études réalisées par **DENNONI et DALI-SAHI en 2015**, sur une population diabétique de type 2 de l'extrême ouest algérien, montre également une augmentation du taux de MDA par rapport aux témoins.

Dans des conditions à haute concentration du glucose la peroxydation lipidique a augmenté significativement (**CERIELLO *et al.*, 2000**).

Nos résultats ne semblent pas s'accorder avec les travaux de **MALGORZATA *et ses collaborateurs en 2007***, qui ont montré une corrélation faiblement positif entre le taux de l'AOPP et le MDA ($r = 0,320$).

D'après **Mahdad et ses collaborateurs en 2010**, une augmentation de la peroxydation lipidique au cours du diabète est due au stress oxydatif résultant de la déplétion des systèmes protecteurs antioxydants. De plus, l'hyperglycémie génère des espèces réactives de l'oxygène (ERO) induisant ainsi l'augmentation des peroxydes lipidiques.

ARROUDJ en 2015, a mis en évidence des modifications de quelques marqueurs du stress oxydatif au niveau des placentas des mères diabétiques de type 1, les résultats indiquent une augmentation de la peroxydation lipidique marquée par les taux élevés du MDA.

III.2.6.2. Evaluation du taux de la catalase :

L'étude de la variation des taux de la catalase a été étudiée dans le but d'évaluer l'état de la défense oxydative endogène chez les diabétiques de type1, et les témoins par le dosage de l'activité de la catalase. Les résultats obtenus sont répertoriés dans le **tableau XIX** et représentés par la **figure 32**.

Tableau XIX : Evaluation du taux de la catalase chez des DT1 et des témoins.

Moyenne \pm SEM	DT1 N=32	Témoin N=32	P value	Significativité
Catalase (U/min/mg de protéine)	0,16152 \pm 0,006	1,016 \pm 0,4165	< 0,0001	****

Valeurs exprimées en moyenne \pm écart type.

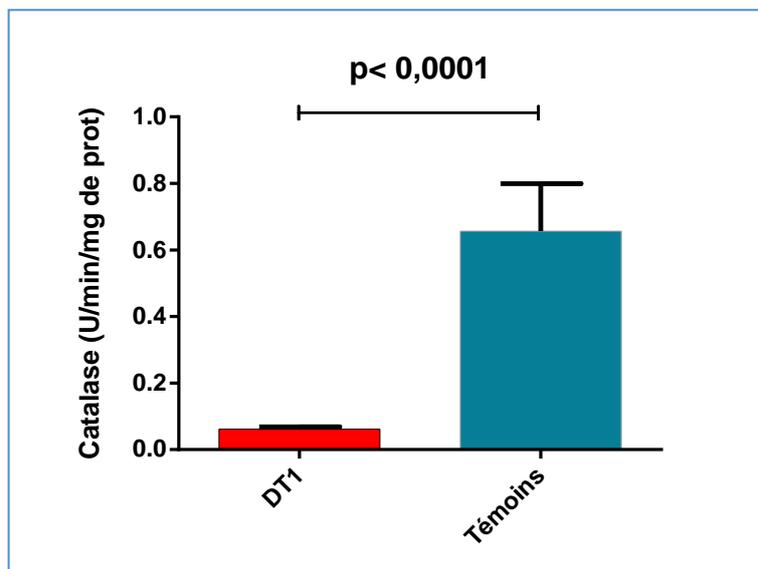


Figure 32: Evaluation du taux moyen de la catalase chez les diabétiques de type1 et les témoins (*La différence est hautement significative à *** $p < 0,001$ vs témoin*).

La **figure 32**, représente le taux moyen de l'activité plasmatique de la catalase chez des DT1 et des témoins. Ces résultats nous a permis de constater que la concentration moyenne de la catalase chez les DT1 est faible par rapport aux témoins (0,16152 \pm 0,006) U/min/mg de protéine et (1,016 \pm 0,4165) U/min/mg de protéine respectivement (**Tableau XIX**). Le test Mann Whitney montre qu'il existe

une différence hautement significative entre les DT1 et les témoins ($p < 0,0001$), ce qui suggère que le système de défense est altéré chez les diabétiques.

L'analyse de régression de l'AOPP chez les DT1 (**Annexes X**) a montré une corrélation faiblement positive avec l'activité de la catalase ($r = 0,06235$).

Nos résultats concordent avec les études réalisés par **GIAMPEIRO et ses collaborateurs en 2002**, où ils ont montré que l'activité antioxydante est réduite alors que le stress oxydatif augmente chez les sujets DT1 par rapport aux témoins.

L'étude réalisée par **ARROUDA en 2015**, révèle que chez des mères diabétiques de type 1, un déséquilibre de balance oxydant/antioxydant au niveau du placenta, celui-ci est marqué par des variations dans le système de défense antioxydant, dont la réduction de l'activité de la catalase.

Selon **JANA et ses collaborateurs en 2001**, la diminution de la protection antioxydante et la surproduction des radicaux libres surviennent aussi chez les enfants diabétiques.

D'après les travaux de **ÖMER et ses collaborateurs en 2000**, où les activités de la superoxyde dismutase et de la catalase ont été mesurées dans les érythrocytes et le plasma de 54 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (21 sans traitement et 33 traités classiquement), et de 33 sujets sains, indiquent qu'une augmentation de l'activité pro-oxydante, pourrait expliquer l'inhibition des activités anti-oxydantes.

Dans des conditions physiologiques, le corps est protégé contre les effets néfastes des radicaux libres par un réseau de système de défense antioxydant. Toutefois, ce système de défense devient douteux dans le diabète sucré. Il semble que les mécanismes d'altération des défenses anti-oxydants peuvent être dus à la glycosylation non enzymatique de ces enzymes par l'hyperglycémie (**OMOTAYO et al., 2012**).

Selon **JOË en 2002**, Chaque individu ne possède pas le même potentiel antioxydant, ce dernier dépend des habitudes alimentaires, du mode de vie, des caractéristiques génétiques ou de l'environnement dans lequel il vit. La

détermination du statut stress oxydant /antioxydant d'un individu devient donc un sujet de priorité en terme de prévention des maladies.

L'équilibre glycémique joue un rôle très important dans la balance pro-oxydants/anti-oxydants. La baisse des défenses anti-oxydantes est variable en ce qui concerne les systèmes enzymatiques et non enzymatiques, (**BONNEFONT-ROUSSELOT, 2004**).

D'après **POPOVICI et ses collaborateurs en 2010**, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise, tenant compte de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants.

Plusieurs autres études montrent le rôle protecteur de la catalase dans le diabète, ainsi la surexpression atténue le stress oxydatif, et le développement du diabète type 1 par la protection des cellules β (**YUNBO, 2011**).

CONCLUSION

L'AOPP est un médiateur potentiel de l'inflammation dans plusieurs pathologies parmi elle, le diabète. Ce dernier, est une pathologie grave liée au développement du stress oxydant. Ce concept de stress oxydant décrit une situation dans laquelle la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques, conduisant à une attaque radicalaire des biomolécules, parmi eux les lipides et les protéines. En effet il existe plusieurs mécanismes d'oxydation des protéines qui conduisent à la formation d'une famille hétérogènes de protéines modifiés tel que les produits protéiques d'oxydation avancée (AOPPs).

Il ressort de ce travail que la population de notre étude constituée de diabétique de type1 d'apparence saine se caractérise sur le plan clinique et pathologique par :

- ✓ des taux de l'AOPP représenté de façon identique chez les sujets diabétiques quel que soit le sexe, qu'il soit un homme ou une femme .
- ✓ des taux de l'AOPP qui augmentent lorsque l'âge du début du diabète est après 40 ans, suggérant une diminution des capacités antioxydantes et une forte oxydation protéique.
- ✓ des taux élevés d'AOPP chez les patients DT1 avec un statut glycémique déséquilibré (HbA1C >7) affirmant ainsi son implication comme médiateur de l'inflammation. L'état inflammatoire est en faveur d'une augmentation de la production des radicaux libres. Qui en conséquence, engendrent des dommages oxydatives des protéines, des glucides, et des acides nucléiques.
- ✓ des taux élevés du MDA chez les patient DT1 témoignant d'un déséquilibre reflétant un état de stress cellulaire et tissulaire.
- ✓ des taux faibles de la catalase chez les DT1 suggérant un déséquilibre dans le système de défense endogène suite à une hyperglycémie chronique en faveur d'une augmentation de la production des radicaux libres.

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

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

- l'étude génétique de gènes de susceptibilité pour les AOPPs.
- l'étude des taux de l'AOPP chez les diabétiques associés à des complications macro et micro-vasculaire.
- l'étude des AOPPs comme facteur de risque préventif des complications chez le diabétique.

Références bibliographiques



ABDUL H.,2002- Copper, zinc and magnesium levels in type 1 diabete mellitus., saudi Med : 539-542.

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

AGNIESZKA P., 2010-Advanced oxidation protein products. Part I mechanism of the formation, characteristics and property., medical university of Wroclaw., : 164-166.

AKYOL Ö, IS N.,TEMEL I, ÖZGÖÇMEN S.,UZ E., MURAT M et BÜYÜKBERBER S.,2000-Relations entre les enzymes anti-oxydantes plasmatiques et érythrocytaires et la peroxydation des lipides chez des patients atteints de polyarthrite Rhumatoïde.,Elsevier SAS :602-608.

ALESSANDR K., DECIOL., 2007- Mediators and mecanismes of pancreatic bete-cell death in type 1 diabetes. Arq Bras Endocrinol Metab.,(2)52 :156-165.

ANNIKA H., JEANNETTE K.,TILMAN G., 2013-Protein oxidation in aging and the removal of oxidised protein., journal of proteomics., :133-149.

ARROUDJA F.,2015-Détermination de quelque paramètre du statut oxydant/antioxydant et des lipides au niveau des placentas lors du grossesse à risque diabete de type 1.Depot Institutionnel de l'université Abou Bekr Belkaid Telemcen(MABI),pp 62.

AUBERVAL N ., 2010- Prévention du stress oxydant dans le diabète et sescomplication pur des antioxydant naturele. Thèse de doctorat., université de STRASBOURG. PP : 69 .

AHMED F.K., ZHIHENG H et ICING G.L., 2005- Molecular targets of diabetic cardiovascular complication., *curr drug targets.*, 6 : 487-494 .

AMERICAN DIABETES ASSOCIATIO .,2010- Diagnosis and classification of diabetes mellitus., *diabete care .*, (33)01 : 562-569.

AUBERVAL N.,2010-Présentatio du stress oxydant dans le diabète et ses complication pour des antioxydant naturele. Thèse de doctorat., université de STRASBOURG. PP : 54, 69.



BAROUKI R ., 2006- Stress oxydant et vieillissement ., *medecine /sciences .*, 22 :266-72 (catalase page 3).

BACHI A., DELLE-DAMME I et SCALONI A.,2013- Redox proteomics : chemical principales methodological approaches and biological/medical promises, *chem .*, (2013)113 :596-698.

BECKAN K.B ., AMES B.V ., 1999- endogeneous oxidative dammage of mt DNA. *MUTAT res .*, 424 : 51-58.

BENJAMIN D ., 2015- implication du stress oxydant dans plusieurs affection du cheral athlète. Thèse de doctorat, université CLAUDE-BERNARD Lyon I ., PP 20-69 .

BOCHI G., TORBITZ V., CAMPOS L., SANGOI M., FERNANDES N et al ., 2016- In vitro oxidation of collagen promotes the formation of advanced oxidatin protein products and the activation of human neutrophils., *inflammation* (39)02 :916-917.

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.

BRAHM K.T ., KANTI B.P., ABIDI A.B et SEYED I.R ., 2013- Markers of oxidative stress during diabetes mellitus. *Journal of biomarkers* ., 2013 : 8-9.

BROWNLEE M., 2001- Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications., *Nature.*, 414 : 813-820.

BRUNO V.,2011- lipid disorders in type 1 diabetes., service endocrinologie diabétologie et maladie métabolique,university hospital.france



CAPEILLERE-BLAUDIN C., GAUSSON V., DESCAMPS-LATSHA B et WIKTO-SARSAT V., 2004- Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidant protein products ., *Biochemica et Biophysica acta.*, 1689 :91-102.

CASSEL R ., 2014- Glucolipototoxicité dans les cellules béta pancréatique . Thèse de doctorat., université de CLAUDE BERNARD Lyon 1 ., PP :11.

CERIELLO A, MOROCUTTI A., MERCURIF., QUAGLIAROL., MORO M., DAMANTE G ET VIBERTI C.,2000- Defective intracellular antioxidant enzyme production in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetic:* 2170-2177.

CHEVENNE D., 2007- Pro-insuline ., EM consult.

CHRISTOPHE M., 2008- Insuline et fonction pancréatique ., *medecine des maladies métaboliques* ., 02 : S130-S136.

COLAS R ., 2010- Syndrome métabolique et diabète chez l'homme, composition lipidique et oxydation des lipoprotéines de basse densité plasmatique en relation avec l'activité des plaquettes sanguines., université de Lyon , institut national des sciences appliquées de Lyon., France ., 1-192

COLOMBO G., GLERICI M., GIUSTARINI D., PROTINARO N et al ., 2015- A central role of intermolecular dityrosin cross-linking of fibrinogen in high molecular weight advanced oxidation protein products formation ., *Biochimica et Biophysica Acta* ., 1850 : 1-12.



DALLE-DONNE I., SCALONI A., GRUSTAIENI D., CAVARRA E., COLOMBO R et ROSSI R., 2005- Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases : the contribution of redox proteomics., *Mass spectrometry* ., (2005) 24 : 55-99 .

DASUM R., DEVARAJ S., ZHAO L., HWANG D.H., JIALAL I., 2008- High glucose induces toll-like receptor expression in human monocytes : mechanism of activation. *Diabetes*., 57 : 3090-3098.

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.

DELMASTRO M., PIGANELLI J., 2011- Oxidative stress and redox modulation potential in type 1 diabetes. *Clinical and Developmental Immunology* : 1-15.

DENIS U., 2002- Etude pharmacologique de la voie de signalisation impliquée dans l'apoptose des péricytes rétinien 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.

DENEMEN D., 2006- Type 1 diabetes. *Lancet*., 367 : 847-858.

DESCAMPS-LATSCHA B., WIKTO-SARSAT V., 2001- Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure., *Kidney Int.*, (2001)59 : S108- S113.

DIANA J., GAHZARIAN L., SIMONI Y et LEHUEN A., 2001- Innate immunity in type 1 diabetes., *Discovery medicine*.

Draper H et Hadley M., 1990-Methods in Enzymology .,Vol.186, pp 421–431.

DRIMALDI A.,2000- Diabétologie. Faculté de médecine pierre et marie curie.,pp149.

DROUIN P., BLICKLE J.F., CHARBONNEL B., ESCHWEGE E., GUILLAUSSEAU P.J., PLOUIN P.F., DANINOS J.M., BALARAC N et SAUVANET J.P. ,19991- diagnostic et classification du diabète sucré les nouveaux critères.*Diabetes & Metabolism.*, 25 :72-83.

DINARELLO A., CANNON G., MIER J.,1986- Multiple biological activities of human recombinant interleukin 1. *Journal of clinical investigation.*, (77)6 :1734-1739.

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

DUSSOL B.,2011 -Methodes d'exploration de la fonction rénale : intérêt et limites des formules permettant d'estimer la fonction rénale. *Immuno-analyse et biologie spécialisée.*, 26 : 6-12



Emma L. Taylor., Armstrong, K R., David P., Hattersley A Tet Paul Winyard G.,2015- Optimisation of an Advanced Oxidation Protein Products Assay: Its Application to Studies of Oxidative Stress in Diabetes Mellitus. *Hindawi.*,pp11.



FAVIER A., 2003- Le stress oxydant Interet conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique., L'actualité chimique :108-115

FERNANDES N et al., 2016- In-vitro oxidation of collagen promotes, the formation of advanced oxidation protein products and the activation of human neutrophils., inflammation., (39)02 : 916-917.

FERNANDEZ F., 2013- Serum protein halogenation and nitrogylation : trait of maintained overstimulation of blood phagocytes in sporadic parkinson's disease., OA medical hypothesis., (1)1 : 1-5.

FIGUEROA-ROMERO C., SADIDI M. et FELDMAN E. L ., 2008- Mechanisms of disease: the oxidative stress theory of diabetic neuropathy., *Rev Endocr Metab Disord* .,(9)4 : 301-314.

FLOCH J.P et KESSLER L., 2015 -Évaluation de nouveaux indices de variabilité glycémique : étude à propos de la mesure continue glucose (CGM) réalisée chez 85 diabétiques insulino-traités. *Diabetes & Metabolism*., pp110.



GALLOU G., RUELLAND A., LEGRAS B., MAUGENDRE D., ALLANNIC H. et CLOAREC L., 1993- Plasma malondialdehyde in type 1 and type 2 diabetic patients. *Clinica Chimica Acta*., 214 (2) : 227–234.

GARDES-ALBERT M ., 2006- Stress oxydant aspect physico-chimiques des ERO . *Ann pharm.*, 64 : 365-371 .

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.

GEOFFREY G., LEGRAUD-PEOLS S ET JACQUES P ., 2006- NFkB activation by reactive oxygen species : fifteen years later., *biochemical pharmacology.*, (2006)72 :1493-1505.

GIAMPIERO MARRA P., COTRONEO DARIO P., ANDREA M.,MAURO A.S. D., RUOTOLOV., CAPUTOS., GIARDINA B.,HIRLANDA G ET A. SANTINI S.,2002- Early Increase of Oxidative Stress and Reduced Antioxidant Defenses in Patients With Uncomplicated Type 1 Diabetes.American Diabetes Association (Diabetes Care):370-375

GILLERY P.,2006-Stress oxydant et glycation des protéines au cours du diabète sucré.John Libbey :309-14.

GRAZIAMO C ., MARCO C ., DENIELA G., NICOLA P ., SALVATORE B., RANIERI R., AED M et ISABELLA D., 2014- A central role for intermolecular dityrosine cross-linking of fibrinogen in high molecular weigh advanced oxidation proteine product ., *biochimica et biophysica acta.*, (2015)1850 :1-12.

GRERORY L ., 2009- Relation entre stress oxydant et homéostasie glucidique au cours du diabète type 2 adaptation de la cellule β pancréatique. Thèse de doctorat , université de paris ., PP.

GRIMALDI A.,2000-Diabétologie. Faculté de médecine Pierre et Marie Curie.,pp 142.

GRONE H., GRONE F et MALLE E., 2002- Immuno-histo chemical detection of hypochlorite modified proteins in glomeruli of human membranous glomerulonephritis., *lab invest.*, (2002)82 :5-14.

GUILHERME V., VENESSA D., LUIZI P., MANUELA B., NATIELI F., PATRICIA G., MARIA BEARTIZ M., FERNANDA B., IVANA B et RAFAEL N., 2016- Invitro-oxydation of collagene promotes the formation of AOPP and the activation of human neutrophils., inflammation., (39)02 : 916-917.

GUILHERME V ., VENESSA D ., LARA P., JISE A., PATRICIA G et RAFAEL N., 2013- An alternative pathway trough the fenton reaction for the formation of AOPP as new class of inflammatory mediators., inflammation., (37)02 :512-521.

Gurlek A, Bayraktar M, Ozaltin N.,1998-Intracellular magnesium depletion relates to increased urinary magnesium loss in type I diabetes. Horm Metab Res., 30: 99-102.

H

HALENG J., PINCEMALL J., DEFRAIGNE J.O., CHARLIER C et CHAPLEILE J.P., 2007- Le stress oxydant. Rev med leige., (10)62 :628-638.

I

Isbir T, Tamer L, Taylor A, Isbir M.,1994-Zinc, copper and magnesium status in insulin-dependent diabetes. Diabetes Res., 26: 41-45.

ISABELLA D., RANIERI R., DANIEL G., ALDO M et ROBERTO C., 2002- Protein carbony groups as biomarkers of oxidative stress., Clinica chimica acta ., (2003)329 : 23-38.

ISLAM M., 2010- The iselets of langerhans,SPRINGER

J

JANA V .,Jaroslav R., Frantis E., Jir S., Ladislav et Renata P.,2001-Parameters of oxidative stress in children with Type 1 diabetes mellitus and their relatives. *Journal of Diabetes and Its Complications.*, pp4.

JANEUL C., 2003- Stress oxydant au niveau des plaquettes sanguine humaines dans le contexte du diabète : étude du glutathion et qlutathion peroxydase 4., Ecole doctoral interdisciplinaire science santé., Lyon France. Thèse de doctorat., PP :1-201.

JEAN-LOUIS B., GENEVIEVE D ., 2011- Biochimie médicale : marqueurs actuels et perspectives., chartal, Arpino.

JI-WON Y., HEEN-SOON J., 2005- Autoimmune destruction of pancreatic betta cells. *Amirican journal of therapeutics.*, 12 : 580-591.

JOEL P.,KARIN B.,KARINE C et JEAN-OLIVIER D.,2002-Mecanismes physiologiques de la défanse antioxydante,physiological action of antioxidant defences.Nutrition clinique et metabolisme.,Vol.16.,pp 233-239.

JUSTIN L., SISHIL K., 2011- Oxidative stress, insulin signaling and diabetes., *Free radical biology and medecine.*, 50/ 567-573.

K

KACATAY U.,2005-Protein oxydation parametrs in type 2diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Diabetes & Metabolism* :551-557.

KALOUSOVA M., SKRHA J., ZIMA T., 2001- Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus .,physiol res., 51 : 597-602.

KARAOUZENE N.K., 2013- Facteurs prédictifs et alternations métaboliques et immunologique de l'obésité : comparaison entre les personnes jeunes et âgées. Thèse de doctorat., université ABOU BAKR BELKAID TLEMCEM.

KIM M.S., POLYCHRONAKOS C., 2005- Immunogenetics of type 1 diabetes. *Horm res.*, 64 :180-188.

KOSTOLANSKA J ., JAKUS V et BARAK L.,2009-HbA1c and serum levels of advanced glycation and oxidation protein products in poorly and well controlled children and adolescents with type 1 diabetes mellitus.*PubMed* :433-42.



LAZO-de-la-vegaMonroy M., FERNANDES MEJIA C.,2013- Oxidative stress in diabetes mellitis and the role of vitamins with antioxidant action., *Open science. Open minds.*, :209-232.

LAEMMLI U., 1970-Cleavage of structural proteins during the assembly of th head of bacteriophage T4., *nature* ., : 680-685.

LECOQ R., 1972- Manuel d'Analyse Médicales et de Biologie Clinique . 3 édition, Tom II,doin :paris .

LEFERRE G., BELJEAM-LEYMARIE M ., BEYERLE F ., BENNEFONT-ROUSSE D et CRISTOL J.P ., 1998- Evaluation de la peroxidation lipidique par le clivage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique . *annale de biologie clinique* ., (56)3 :

LEVESQUE E ., 2006- Oligo élément et stress oxydant ., *Favier lab* ., P : 10-15 .

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

LEVERVEA X .,2009-Stress oxydant et antioxydants ,Oxidative, stress and antioxidants ., Médecine et Nutrition : 220-224.

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.

LOUIS M.,2010- Diabetologie. Elsevier Masson.



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

MAHDAD N., RABEHI H.,BEKKOUCHE L.,BOUKORTT F.,A BEKKARA A.,BELHADJ M ET BOUCHENAK M .,2010- Impact des conseils hygiéno-diététiques sur le profil des lipides et stress oxydatif, chez des patients oranais diabétiques type 2.Nutrition clinique et métabolisme.,Vol.24.,pp 94.

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.

MALGORZATA K.K ., SALMONOWICZ B ., BOEHM ., BERDOWSKA I ., Bogdan ZEILINSKI B., PATRYN E ., NOCZYNSKA A et GAMIAN A ., 2007- Diagnostic potential of oxidative stress markers in children and adolescents with type 1 diabetes ., Clinical biochemistry., (2008) 41 : 48–55.

MARK A.A., GEORGE S.e., AARON W., 2014- Type1 diabete.published online., 383 :69-78.

MARITIM A.C., SANDERS R.A., WATKINS J.B., 2003-Diabetes, oxidative stress and antioxidants. *J Biochem Mol Toxicol.*, Vol. 17, pp 24-38.

MAXWELL S.P., THOMASUN H et CAIDLER D 1997- Antioxydant statuts in patients with uncomplicated insuline dependant and non-insuline dependant diabete mellites ., european journal of clinical investigation ., (06)227 : 484-490.

MAZIERE C., ALIMARDANI G., DANTIN F., DUBOIS F., CONTE M. A et MAZIERE J. C., 1999- Oxidized LDL activates STAT1 and STAT3 transcription factors: possible involvement of reactive oxygen species. *FEBS Lett.*, pp 49-52.

MICHEL R., 2001- Le diabete de type 1. Médecine nucléaire-imagerie fonctionnelle et metabolique.,(2) 25 : 95-101.

MINAMRI K., MIKI T., KADOWAKI T et SEINOS ., 2004- Roles of ATP-sensitive K⁺ channels as metabolic sensors : studies of Kir6 × null mice ., diabète ., 53 :S176-S180.

MIN L., LU-JUN S., XIN-YU Q., 2014- Advanced in the cellular immunological pathogenesis of type 1 diabetes. *J.cell.Mol.Med.*,(5)18 :749-758.

MITTAL M., RIZWAN SIDDIQUI M., TRAN K et REDDY P., 2014- Reactive oxygen species in inflammation and tissu injury., antioxydants and redox signaling., (20)07 :1127-1150.

MIW M., SHOZO Y., TORU Y et TOSHITSUGU S., 2012- Advanced glycation end products induced reactive oxygen species generation is party through NF-kappaB activation in human aortic endothelial cells., journal of diabetes as its complicatons., (2013)27 :11-15 .

MONGENS M ., 2013- Origine et conséquence du stress oxydant . Thèse de doctorat ., Ecole national vétérinaire d'ALFORT . PP :76 .

MOREL Y., BAROUKI R .,1998- Influence du stress oxydant sur la génération des gènes ., medecine/sciences ., 14 :713-721 .

MOSBAH H., ANDREELLI F., 2012- Physiologie de la sécrétion de l'insuline., medecine des maladies métaboliques., (3)6 : 215-219.

MOSAAD A., ABOU-SEIF A., ABD-ALLAH Y., 2003- Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients., (2004) 346 : 161–170

gy

NERUP J.,MANDRUP-POULSEN S ., HELQVIST S et al., 1994- On the pathogenesis of IDDM. Diabetologia.,(2)37 :S82-S89.

NOWOTNY K., GRUNE T., 2014- Degradation of oxidized and glycolized collagen bole of collagen cross-linking ., archives of biochemistry and biophysics ., 542 :56-64 .

N.DENNONI M et DALI-SAHI M.,2015-paramètres du stress oxydant dans le DT2,chez une population de l'extreme ouest algerien.Elsevier Masson.,vol.41.,PP 66.

o

ODETTI P., TRAVERSO N., COSSO L., NOBERASCO G., PRONZATO MA et MARINARI UM.,1996- Good glycaemic control reduces oxidation and glycation end-products in collagen of diabetic rats.PubMed :1440-7.

OHKAWA H., OHISHI N. et YAGI K., 1979- Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Annals of Biochemistry., 95: 351- 358.

OMOTAYO F.,2012- Oxidative stress in diabetes mellitus : is there a role for hypoglycemic drugs and or antioxidants ?. oxidative stress and diseases : 218-246.



IN-GALL´AN P.M ., CARRASCOSA A., GUSSINYE M et DOM´INGUEZ C., 2002- Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications., Biochemistry and Molecular Biology Center and Pediatric Endocrinology Unit, Hospital Universitario Vall d’Hebron, Barcelona, Spain., (34) 12 :1563–1574.

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.

PHILIPS J.C., SCHEEN A., 2003- Essais de prévention du diabète de type 1 : déceptions et espoirs ., REV medecine suisse., 2447.

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

POULSEN L., 2002- Blood pressure and cardiac autonomic function in relation to risk factors and treatment perspectives in type 1 diabetes. JRAAS.,3(4) : 222-242.



QIAN W., ZHAO-MING Z., SI-YUAN Z., CONG-RUI L ., YING P., JI-HUAN Z., SHUAI Z et al., 2015- Advanced oxidation protein products induce chondrocyte apoptosis

via receptor for advanced glycation end products-mediated, redox-dependant intrinsic apoptosis pathway ., apoptosis., (2016)21 : 36-50.



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.

ROBERT B .,2006- Stress oxydant et vieillissement. Médecine /science ., (03)22 :266-272.

ROBAB S .,2013- Diabète and oxydative stress. The mechanism and action. IRABANIAN journal of diabetes and obesity., (01)05 : 40-44.

RODIER M., 2001- Définition et classification du diabète., medecine nucléaire-imagerie fonctionnelle et métabolique ., (02)25 : 91-93.

RODNEY L ., 2002-Carbonul modified proteins in cellular regulation, aging and disease., free radical biology and medecine., (32)09 : 790-796

ROLAND M., GUIARD E., KERRAS A., JACQUOT C., 2011- Pourquoi la clairance da la créatinine doit-elle céder la place aux formules d'estimation du DFG ?. Revue francophone des laboratoires.,429 Bis : 28-31.

RONALD ST-LOUIS M., 2011-Implication des espèces réactives de l'oxygène dans le controle central de l'osmorégulation .Thèse de doctorat de l'Université Paris VI Pierre et Marie Curie., pp116.

RONDEAU P., 2009-Stress oxydant et glycation : relation structurale et activités biologiques de l'albumine in vitro et in viro dans le cadre de pathologie diabétique. Thèse doctorat, Université de la Réunion., PP 25-27-31-47.



SAADA., VIRELLA G et CHASSEREAU C., 2006 – ox-LDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by monocyte cells and human macrophages. *J Lipid Res.*, (47) : 1975-1983 .

SARITA B., AFREEN K., 2013- Antioxydants and diabetes. *Indian journal of endocrinology and metabolism.*, S267-S270 .

SAVINIO I., LATANI M.V., EVANGELISTA D., GASPERI V et AVIGLIANO L., 2013 – Obesity associated oxidative stress : strategies finalized to improve redox state . *Int J Mol Sci.*, (05)04 : 10497-10538.

SESTI G., 2006- Pathophysiology of insulin resistance., *best pract Res Clin Endocrinol Metab.*, 20 : 665-679.

SCHLEIDE ED., WEIGERT C., 2000- Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy., *Kidney Int Suppl.*, (77) : 13-18.

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

STALIN P., MARKLUND S.L., 2000- Multiple cytokines regulate the expressing of extra cellular super oxide dismutase in human vascular smooth muscles cells atherosclerosis ., : 151-433-441.

STOCKER R., KEANEYJR J.F., 2004- Role of oxidative modification in athérosclérose . *Physiologie revue.*, 84 : 1381-1478 .

SUBRATA K.B., 2015 – Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox . oxidative medicine and cellular longevity ., (2016) : P 09.

SUWIMOL J.,2005- Free Radicals in Biology and Medicine :PP11.

SZABO C ., ISCHIROPOULUS H et RADI R ., 2007 – Peroxynitrite : biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics . Nat rev drug discovery ., 06 : 622-80 .



TALIOR I., YARKONI M., BASAHAN N., ELDAR-FINKELMAM H., 2003- Increased glucose uptake promotes oxidative stress and PKC-activation in adipocytes of obese, insulin-resistant mice. Am.J.Physiol.endocrinol.metab.,285 :E295-E302.

THAO N ., MESSERET K ., BRNARD L ., EIAD A et MASSAY ., 2003- Stress oxydant et insuffisance rénale chronique ., Medecine thérapeutique cardiologie ., (01)03.

THEROND P ., 2006- Dommages créés aux biomolécules (lipi, prot, ADN) par le stress oxydant., Ann pharm ., 64 : 383-385.

TIWARI J.L., TERASAKI P.I., 1981- HLA-DR and disease associations. progression clinical and biological research.,58 :151-163.

TRIVIN F., CHEVENNE D et HAUTECOUVERTURE M.,1999-Produits de Maillard et complications chroniques du diabète sucré. John Libbey : 445-54

TSE H ., MILTM J ., SCHREINER S ., PROFOZICH L ., TRUCCO M et PIGANELLI D ., 2007 – Disruption of innate mediated proinflammatory cytokine and ROS third signal leads to antigen specific hyporesponsiveness., *Journal of immunology .*, (02)187 : 908-917.

TOSHIO M., MASAOMI N., KAI-UWE E ., 2011- Studie on renal disorders., Human press. NEW YORK .

Toure Fanta Epouse Rouamba., 1986- Les complications dégénératives du diabète au Mali. These Med, Bamako; N° 3



Vessby J., Basu S., Mohsen R et Berne C.,2002-oxidative stress and antioxidant status in type 1 diabetes mellitus.*Journal of Internal Medecine* :69-76.

VIBHA R ., UMESH C.S., 2015- Free radicals in human health and disease., springer New York .



WEI C., FAN F et JING N., 2014., AOPP and the progression of kidney disease., *Kidney international supplements .*, (2014)4 : 102-106 .

WITKO-SARSAT V., FRIELANDER M., CAPELLERE-BLAUDIN C., NGYN-KHOA T., ZINGRAFF J et JUNGERS P ., 1996- Advanced oxidation protein products as novel marker of oxidative stress in uremia kidney., *int.*, (1996)49 :1304-1313.

WITKO-SARSAT V., FRIELANDER M., CAPELLERE-BLAUDIN C., NGYN-KHOA T.,JUNGERS P et DESCAMPS-LATSCHA B., 1998- Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation ang monocyte activation in chronic renal failure., *Journal immunol.*, (1998)161 : 2524-2532.

WITKO-SARSAT V., NGUYEN-KHOA T., JUNGERS P., BRUEKE B et DESCAMPS-LATXNA B.,1999- Advanced oxidation protein products as a novel molecular basis of oxidative stress in uraemia., *nephrology dialysis transplantation.*, (1999)04 : 76-78.

26

XIAO Y S, HOU F, NIU H X, WANG G B, XIE D, GUO Z J, ZHOU Z M, YANG F, TIAN W J, ZHANG X.,2007-Oxidation Protein Products Promote Inflammation in Diabetic Kidney through Activation of Renal Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase.*Endocrinology* : 1830-1839.

27

YUNBOLI .,2011-Antioxidants in biology and medicine : essentials advances and clinical application., Novascience publishers. New-york., p 422.

YASUNORI I., MAKOTO A., MIKATO H., KEÜCHI K., KEISUKE N., TOSHIYA K ., AYAKA S et MASAKI O ., 2006 –The structural and pharmacokinetic properties of oxidized human serum albumin, advanced oxidation protein products . drug metabolism pharmacokinetic., (02)21 : 140-146.

28

ZENDJABIL M.,2015-L'hémoglobine glyquée : indication, interprétation et limites ., the glycated hemoglobin: Indication, interpretation and limitations. Annales Pharmaceutiques Françaises :336-339.

ZHOU L., HOU F., WANG G et al., 2009- Accumulation of advanced oxidation protein products induces podocyte apoptosis and deletion through NADPH-dependant mechanisms ., *Kidney Int* ., 76 : 1148-1160.

Annexes

Annexe I

Matériel non biologique utilisé

- Micropipettes de 1000 µl, 500 µl, 100 µl, 50 µl, 10 µl
- Congélateur a – 80°C
- Réfrigérateur a + 4°C
- Balance de précision (RADWAG PS 210/C/2)
- Bain marie (MEMMERT)
- Vortex (MS1 Minishaker)
- Centrifugeuse de paillasse (NF 048)
- Spectrophotométrie (SHIMADZU UV-1601)
- Spectrophotométrie de biochimie (Erba MannhElm)

Réactifs

- Kit pour Glucose
- Kit pour l'Hémoglobine glyquée A1c
- Kit Cholestérol
- Kit Triglycérides
- Kit pour l'Urée
- Kit pour la Créatinine
- Kit pour Aspartate Amino-transférase ASAT (GOT)
- Kit pour Alanine Amino-transférase phosphate de pyridoxal ALAT (GPT)
- Kit pour les Protéines totaux
- Kit pour l'Acide urique
- Kit pour le Magnésium

NB : le kit c'est un ensemble de réactifs appropriés pour chaque dosage.

Annexe II

Fiche de renseignement

INFORMATIONS PERSONNELS

Nom Prénom :

Sexe : H / ou F /

Age :

Résidence :

Médecin traitant

:

Externe : ou Hospitalisé :

Hôpital :

Service :

INFORMATIONS CLINIQUES :

Type de diabète suspecté : Type1

Etiologie du diabète : connu non connu

Age de début du diabète:

Durée du diabète :

IMC (Kg/m²) : Poids= taille=

Tension artériel : PAS= PAD= FC=

Traitement actuel :

Equilibre glycémique : Bon : Moyen : Mauvais :

CRITERES D'INCLUSION :

Acidocétose inaugurale ; Autres :

Syndrome cardinal (polyurie , polydipsie , amaigrissement)

HbA1c glycémie

Troubles cardiaques Trouble de la vision

COMPLICATIONS :

• Néphropathie Neuropathie Rétinopathie Microangiopathie Macroangiopathie

Annexe III

Composition des réactifs pour les différents dosages

➤ **Glucose**

Réactif 1 (Tampon)

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

Réactif 2 (Enzyme)

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

Réactif 3 (Standard)

Etalon (glucose).....	100 mg/dl
-----------------------	-----------

Réactif de travail (RT) : Dissoudre une tablette de substrats de Réactif 2 dans 50 ml de Réactif 1, fermer et mélanger doucement, jusqu'à ce que le contenu soit totalement dissout.

➤ **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 pH=6, 5.....	30 mmol/l
Azoture de sodium	0,95 g/l

Réactif 3

Un tampon de phosphate pH=6, 5.....	72 mmol/l
Azoture de sodium.....	0.95 g/l

Microcolonne

Ces microcolonnes contiennent une quantité pré-poids de résine équilibrée avec :

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

Annexe IV

➤ Triglycéride

Réactif 1(Tampon)	
GOOD pH =7,5.....	50mmol/l
P-Chlorophénol.....	2mmol/l

Réactif 2 (Enzyme)	
Lipoprotéine lipase (LPL).....	150000U/l
Glycérolkinase (GK).....	500 U/l
Glycérol-3-oxydase (GPO)	2500 U/l
Péroxydase (POD).....	440 U/l
4-Aminophenazone (4-AP).....	0,1 mmol/l
ATP.....	0,1 mmol/l

Réactif 3	
Standard.....	200 mg/dl

Réactif de travail (RT) : Dissoudre le contenu d'une capsule d'enzymes Réactif 2 dans un flacon de tampon Réactif 1, fermer et agiter doucement jusqu'à ce que le contenu soit homogène.

➤ Cholestérol

Réactif 1 (tampon)	
PIPES, pH= 6,9.....	90 mmol/l
Phénol	26 mmol/l

Réactif 2 (enzymes)	
Cholestérol estérase (CHE).....	300 U/l
Cholestérol oxydase (CHOD).....	300 U/l
Peroxydase (POD).....	1250 U/l
4-Aminophenazone (4-AP)	0,4 mmol/l

Réactif 3 (standard)	
Etalon(CT).....	200mg/dl

Réactif de travail (RT): Dissoudre le contenu d'une capsule d'enzymes Réactif 2 dans un 1 flacon de tampon Réactif 1, fermer et mélanger doucement jusqu'à ce que le contenu soit dissout.

Annexe V

➤ ASAT

Réactif 1(Tampon)

TRIS pH=7,5.....	80mmol/l
L-aspartate	200mmol/l

Réactif 2(Substrat)

NADH.....	0,18mmol/l
Lactate déhydrogéné (LDH).....	800U/l
Malate déhydrogéné (MDH).....	600U/l
α -cétoglutarate	12mmol/l

Réactif de travail : Dissoudre une tablette de substrat de Réactif 2 dans 50 ml de Réactif 1, fermer et mélanger doucement, jusqu'à ce que le contenu soit totalement dissout.

➤ ALAT

Réactif 1(Tampon)

TRIS pH=7,5.....	100 mmol/l
L-Alanine.....	500mmol/l

Réactif 2 (Substrat)

NADH.....	0,18mmol/l
Lactate déhydrogéné (LDH).....	1200U/l
α -cétoglutarate	15mmol/l

Réactif de travail : Dissoudre une tablette de substrat de Réactif 2 dans 50 ml de Réactif 1, fermer et mélanger doucement, jusqu'à ce que le contenu soit totalement dissout.

Annexe VI

➤ Créatinine plasmatique

Réactif 1

Acide picrique (PIC)17.5 mmol/l

Réactif 2

Hydroxyde de sodium (NaOH).....0.29 mol/ l

Etalon (créatinine).....2 mg/dl

Réactif de travail : mélanger un volume équivalent de Réactif 1 et de Réactif 2.

➤ Urée plasmatique

Réactif 1(Tampon)

Phosphate pH= 6,7.....50mmol/l

EDTA.....2 mmol/l

Salicylate de sodium.....400mmol/l

Nitroprussiate de sodium.....10 mmol/l

Réactif 2

Hypochlorite de sodium (NaClO)140 mmol/l

Hydroxyde de sodium.....150 mmol/l

Réactif 3(Enzyme)

Uréase30 000 U/l

Etalon (Urée)50mg/dl

Réactif de travail (RT) : Dissoudre le lyophilisat (Réactif 3) dans un flacon de Réactif 1.
Quant au réactif 2, il est prêt à l'emploi.

Annexe VII

➤ Protéines totaux

Réactif 1 (Chlorure de sodium)

Chlorure de sodium75mmol/l

Réactif 2 (Réactif de biuret)

Hydroxyde de sodium.....370mmol/l

Tartrate-Na-K.....10mmol/l

Iodure de potassium.....3mmol/l

Sulfate de cuivre3mmol/l

Réactif 3 (Etalon)

Etalon60g/l

➤ Acide urique

Réactif 1

Phosphate pH= 7,4.....50mmol/l

2-4-DCPS.....4mmol/l

Réactif 2 (Lyophilisat)

Uricase60U/l

Peroxydase.....660U/l

Ascorbate-oxydase.....200U/l

4-AminoPhénazone.....1mmol/l

Réactif 3 (Standard)

Acide urique6,0mg/dl

Réactif du travail (RT) : verser le contenu du Réactif 1 dans le flacon du Réactif 2, agiter doucement jusqu'à dissolution complète.

➤ **Magnésium**

Réactif 1

Bleu de xylidyle.....	0,1mmol/l
Acide thioglycolique	0,7mmol/l
DMSO.....	3000mmol/l

Réactif 2 (Etalon)

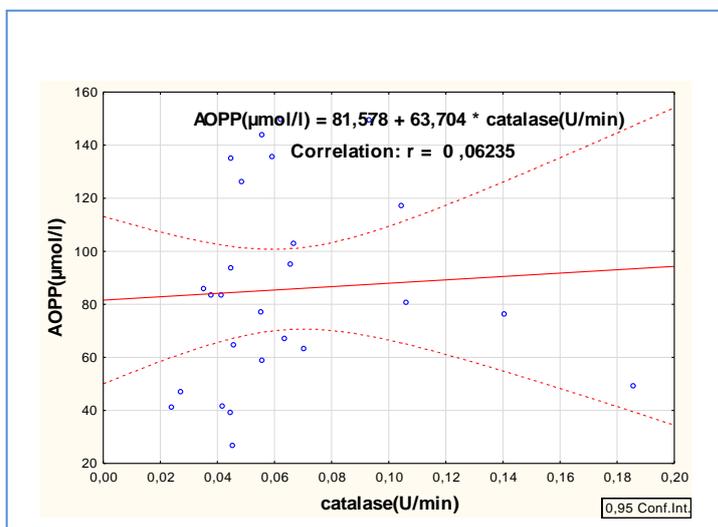
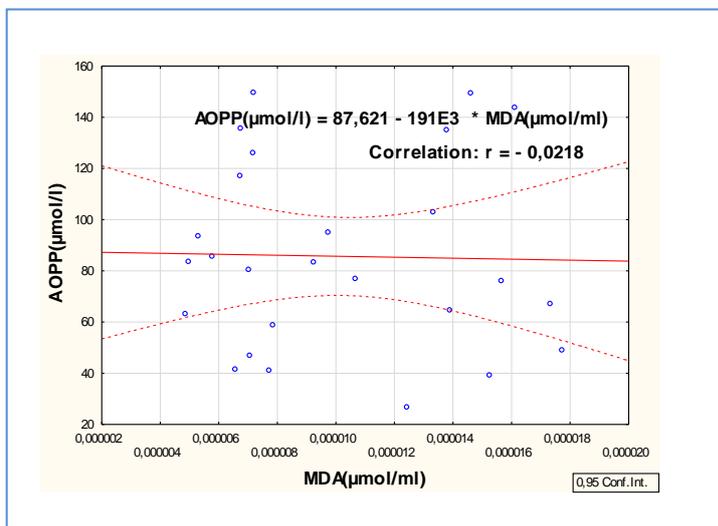
Etalon.....	2mg/dl
-------------	--------

Annexe VIII

durée du diabète	0_5	10_15	15_20	20_25	25_30	30_35	5_10	Témoins
0_5		0,15198202	0,95580593	8,751E-05	0,96270256	0,46555118	0,66449915	0,059818603
10_15	0,151982021		0,25030133	0,00512862	0,49978413	0,09978986	0,32018944	0,000871074
15_20	0,955805933	0,25030133		0,00050127	0,98882248	0,4805884	0,76102893	0,144759866
20_25	8,75102E-05	0,00512862	0,00050127		0,01884922	0,0003926	0,00034585	1,02646E-07
25_30	0,962702558	0,49978413	0,98882248	0,01884922		0,60866043	0,86996202	0,439249678
30_35	0,465551182	0,09978986	0,4805884	0,0003926	0,60866043		0,31859041	0,828733523
5_10	0,66449915	0,32018944	0,76102893	0,00034585	0,86996202	0,31859041		0,021112317
Témoins	0,059818603	0,00087107	0,14475987	1,0265E-07	0,43924968	0,82873352	0,02111232	

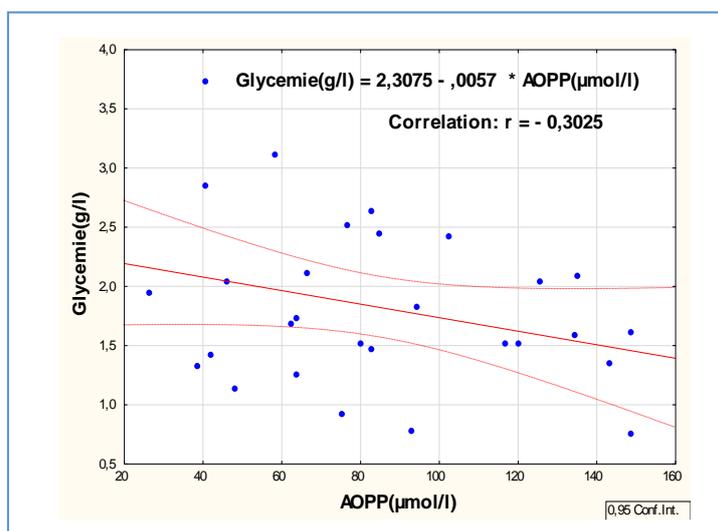
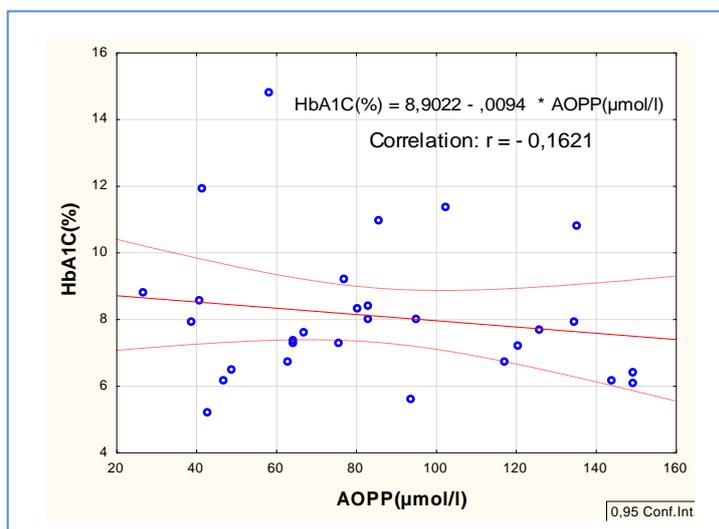
Annexe X

Etude de la corrélation entre le taux de l'AOPP et le statut oxydative :



Annexe IX

Étude de la corrélation entre les taux de l'AOPPs et l'équilibre glycémique :



Glossaire



Glossaire

Aduit Fixation d'une molécule sur une des bases de l'ADN par une liaison covalente pouvant parfois former un pont intra-caténaire entre les deux chaînes de l'ADN.

Acide aminé : molécule organique appartenant à la famille des protides comportant une fonction acide (-COOH), une fonction amine (-NH₂), un hydrogène et un groupement chimique (radical) liés de façon covalente à un même atome de carbone. Les différents acides aminés diffèrent par leur radical. Les protéines de tous les êtres vivants sont formées à partir des mêmes 20 acides aminés.

ADN : acronyme de "acide désoxyribonucléique.

Albumine : Est la protéine la plus importante en quantité dans le sérum humain, fabriquée par le foie et sert à transporter un nombre important de substances dans le sang.

Anthropométrique : Relatif à la mesure physique des caractéristiques humaines

Antioxydant Molécule qui ralentit ou empêche l'oxydation, la dégradation des aliments, de certains composés organiques ou de certains matériaux.

Apoptose : mort cellulaire programmée.

Cancer : processus de prolifération cellulaire incontrôlé .

Cholestase (cholostase) : correspond à une diminution ou disparition de l'écoulement de la bile générant une augmentation du volume de bile dans les voies biliaires.

Cytolyse : désigne une destruction des cellules du foie.

Diabète : affection caractérisée par une polyurie et une polydypsie.

Diurèse : excrétion urinaire.

Dyslipidémie : désigne une concentration trop élevée d'un ou plusieurs lipides présents dans le sang.

Enzyme : biocatalyseur.

Explosion respiratoire : Désignée sous l'appellation « respiratory burst », est la libération rapide et soudaine de dérivés réactifs de l'oxygène ; typiquement lors de la phagocytose d'une bactérie, un des enzyme clef pour cette production est la NADH oxydase

Ferritine : Est la protéine qui permet le stockage de fer à l'intérieur des cellules qui contient environ 20% DU fer de l'organisme.

Glycémie : taux de glucose sanguin.

Granulocyte : catégorie de leucocytes caractérisée par des granulations cytoplasmiques et un noyau polylobé (synonyme : polynucléaire).

HDL : est une lipoprotéine dite de haute densité. Dans la mesure où il intervient dans l'élimination du cholestérol, il est aussi appelé « bon cholestérol », car son augmentation est considérée comme un facteur protecteur de risque cardiovasculaire.

Hème : groupement prosthétique constitué d'un complexe porphyrine- ion ferreux présent dans diverses protéines (hémoglobine, myoglobine, cytochromes).

Hémodynamique : ou dynamique du sang ,est la science des propriétés physiques de la circulation sanguine

Inflammation : réaction de défense non spécifique en réponse à un foyer local d'irritation d'origine biologique ou physico-chimique caractérisée par l'afflux de leucocytes. Elle se traduit par des signes cliniques : chaleur, rougeur, tuméfaction et douleur.

Insuline : hormone protéique hypoglycémiant sécrétée par les cellules b des îlots de Langerhans qui intervient dans la régulation de la glycémie lorsque la concentration en glucose sanguin augmente.

Isoenzyme : enzymes qui diffèrent dans la séquence d'acide aminée mais catalysent la même réaction biochimique .

LDL : est une lipoprotéine dite de basse densité, le corps la produit pour transporter le cholestérol dans l'organisme. il est aussi appelé « mauvais cholestérol » .

Métabolisme : ensemble des réactions chimiques de l'organisme regroupant l'anabolisme (réactions de biosynthèses) et le catabolisme (réactions de dégradation).

Neutrophile : catégorie de granulocytes.

Polydipsie : soif excessive conduisant à l'absorption d'une grande quantité de liquide.

Polyurie : augmentation de la diurèse

Pathogène : qui peut provoquer une maladie.

Protéine : macromolécule informative constituée d'un enchaînement covalent ordonné d'acides aminés

Radical libre Espèce chimique possédant un électron non apparié.

Réaction de Fenton : Réaction d'oxydation avancée, le peroxyde d'hydrogène oxyde le fer ferreux aboutissant à la formation du radical hydroxyle à un pH acide.

Sites abasiques Partie de l'ADN dépourvue d'une base purique ou pyrimidique et ayant perdu l'information génétique par rupture de la liaison entre une base et le désoxyribose.

Transferrine : Est une protéine du sang qui se combine au fer ,et le transporte vers les organes