

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA–  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES  
SCIENCES DE LA TERRE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf : ...../UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2022

## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

### EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

**Domaine :** SNV      **Filière :** Sciences Biologiques

**Spécialité :** Biochimie Appliquée

**Présenté par :**

*M<sup>lle</sup> KAROU Lydia & M<sup>lle</sup> MEDDAHI Nesrine*

*Thème*

**Etude de l'effet cytoprotecteur des antioxydants à l'égard du stress oxydant induit par les sérums des diabétiques**

**Soutenu le:** 07/07/2022

**Devant le jury composé de:**

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>M. ADRAR Nassim Salem</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>M. BOURNINE Lamine</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
<i>M<sup>me</sup> DJENADI Katia</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examinatrice</i>

**Année Universitaire: 2021/2022**

## **Remerciements**

*Avant tout nous remercions le bon Dieu tout puissant de nous avoir donné la volonté et le courage afin de réaliser ce travail.*

*Nous tenons à remercier sincèrement **M. BOURNINE Lamine** qui fut pour nous un promoteur très attentif et très motivé. Nous vous sommes très reconnaissantes d'avoir accordé votre confiance pour la réalisation de ce modeste travail. Sans oublier **M<sup>elle</sup> MAMMERI Amal**, qui nous a assisté durant la réalisation de nos expérimentations au laboratoire. Nos vifs remerciements s'adressent aussi à **M<sup>elle</sup> CHEMLAL Hanane** pour son aide et ses conseils avisés.*

*Nous exprimons nos remerciements aux membres du jury, **M. ADRAR Nassim Salem** qui a honoré de sa présence notre soutenance et **M<sup>me</sup> DJENADI Katia** qui a consacré tout son temps pour examiner notre manuscrit.*

*Nous tenons à remercier le chef de service et les fonctionnaires du centre de transfusion sanguine de l'hôpital Mohamed Boudiaf de Bouira.*

*Nous remercions également tous nos enseignants qui nous ont suivi durant tout le cycle de notre formation universitaire.*

*Nous tenons aussi à remercier vivement tout le personnel de la faculté SNVST. Nous remercions également tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à la concrétisation de ce travail.*

*Merci à vous tous pour votre soutien, votre aide et votre compréhension.*

**Lydia et Nesrine**

## ***Dédicaces***

*A mes très chers parents. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avez pas cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Que DIEU vous protège.*

*A mes très chères sœurs **Fazia** et **Nadia**, frères **Ramy** et **Juba**.*

*A la mémoire de mes grands-parents, je prie ALLAH de les accepter avec sa miséricorde dans son vaste paradis.*

*A mes chères nièces **Ania**, **Nesrine** et **Méline**.*

*A ma chère binôme **MEDDAHI Nesrine** que je remercie vivement pour son aide et soutien avant, durant et après la réalisation de ce travail.*

*A mes chères amies, **BELABBAD Maïssa**, **BELHADJ Chourouk**,  
**HAMMAD Besma** et **LACHACHI Chahinez**.*

*A toutes les personnes qui m'ont apporté leur soutien tant moral que physique et qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.*

*Je dédie ce modeste travail avec un grand amour.*

***Lydia***

## ***Dédicaces***

*A mes très chers parents. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avez pas cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Que DIEU vous protège.*

*A ma très chère sœur **Lila** et son mari, mes belles sœurs **Ryma, Asma** et mes chers frères **Samir, Wahab, Mourad** et **Mohamed**.*

*A mes chères nièces **Léane** et **Ania**.*

*A la mémoire de ma chère nièce **Dina** qui nous a quitté, repose en paix mon petit miracle.*

*A ma demi-sœur, la personne qui compte énormément pour moi  
**MEDJRAS Sonia**.*

*A ma chère Binôme Lydia que je remercie vivement pour son aide et soutien avant, durant et après la réalisation de ce travail.*

*A mes chères amies **BELABBAD Maissa, BELHADJ Chourouk, HAMMAD Besma, HIMOUM Elina** et **LACHACHI Chahinez**.*

*A toutes les personnes qui m'ont apporté leur soutien tant moral que physique et qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.*

*Je dédie ce modeste travail avec un grand amour.*

***Nesrine***

## Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction .....1

## Partie bibliographique

### Chapitre I: Diabète sucré

I.1.Généralités sur le diabète .....3

I.2. Epidémiologie .....4

I.3. Classification du diabète sucré .....5

I.3.1. Diabète de type 1 .....5

I.3.2. Diabète type 2 .....7

*I.3.2.1. Physiopathologie de diabète type 2 .....7*

*I.3.2.2. Développement de l'insulinorésistance .....7*

*I.3.2.3. Signes cliniques de diabète type 2 .....8*

I.3.3. Diabète gestationnel .....9

I.4. Critères de diagnostic .....9

I.5. Complications du diabète .....11

I.5.1. Complications aiguës métaboliques .....11

I.5.2. Complications systémiques tardives .....11

I.6. Stratégie thérapeutique et prise en charge du diabète .....11

### Chapitre II: Stress oxydant induit par le diabète

II.1. Relation entre le diabète et le stress oxydant .....13

II.2. Généralités sur le stress oxydant..... 13

II.3. Systèmes pro-oxydants.....13

II.3.1. Espèces réactives d'oxygène.....13

II.3.2. Rôle physiologique des ERO .....14

II.3.3. Implication pathologiques des ERO .....14

*II.3.3.1. ADN.....14*

II.3.3.2. Protéines.....	15
II.3.3.3. Lipides .....	15
<b>II.4. Les différentes voies de génération du SO .....</b>	<b>16</b>
II.4.1. Oxydation du glucose.....	16
II.4.2. Voie de l'hexosamine.....	16
II.4.3. Protéine kinase C .....	17
II.4.4. Voie des polyols.....	19
II.4.5. Voie avancée des produits finaux de glycation (AGE).....	20
<b>II.5. Biomarqueurs du SO chez les diabétiques .....</b>	<b>22</b>
II.5.1. ADN .....	22
II.5.2. Protéines.....	22
II.5.3. Lipides.....	22
II.5.4. Glutathion.....	23
<b>II.6. Les globules rouges comme modèle d'étude du SO.....</b>	<b>23</b>
<b>II.7. Système de défense antioxydant .....</b>	<b>25</b>
II.7.1. Système antioxydant enzymatique .....	25
II.7.1.1. Superoxyde dismutase (SOD).....	25
II.7.1.2. Glutathion peroxydases (GPxs).....	25
II.7.1.3. Catalase (CAT).....	26
II.7.2. Système antioxydant non enzymatique .....	26
II.7.2.1. Glutathion.....	26
II.7.2.2. Vitamine E.....	26
II.7.2.3. Vitamine C.....	27

Chapitre III: Protection contre le stress oxydant induit par le diabète

<b>III.1. Antioxydants employés dans le traitement adjuvant du diabète.....</b>	<b>28</b>
---	-----------

## Partie expérimentale

### Chapitre IV: Matériels et méthodes

<b>IV.1. Matériels .....</b>	<b>34</b>
IV.1.1. Matériels biologique .....	34
IV.1.2. Produits chimiques et antioxydants utilisés.....	34
IV.1.3. Appareillage .....	35
<b>IV.2. Méthodes .....</b>	<b>35</b>
IV.2.1. Etude de la cytoprotection sur le modèle GR humain .....	35
<i>IV.2.1.1. Prélèvement du sang et préparation de la suspension de GRs .....</i>	<i>35</i>
<i>IV.2.1.2. Préparation de solution d'antioxydants.....</i>	<i>36</i>
<i>IV.2.1.3. Etude de l'effet des SD sur les GRs humains .....</i>	<i>36</i>
IV.2.2. Analyse statistique.....	41

### Chapitre V: Résultats et discussions

<b>V.1. Etude de la cytoprotection des GRs par des antioxydants.....</b>	<b>42</b>
<b>V.2. Effet inhibiteur de la peroxydation lipidique induite par les sérums .....</b>	<b>48</b>
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>51</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>52</b>
<b>Résumé</b>	

## Liste des abréviations

- ADA** : Association américaine du diabète.
- ADN** : Acide désoxyribonucléique.
- ADO** : Anti-diabétiques oraux.
- AGE** : *Advanced glycation end products*.
- ALA** : Acide  $\alpha$ -lipoïque.
- AGPI** : Acides gras polyinsaturés.
- ATCD** : Antécédents.
- CAT** : Catalase.
- DG** : Diabète gestationnel.
- DT1** : Diabète de type 1.
- DT2** : Diabète de type 2.
- DCCT** : *Diabetes control and complications trial*.
- ED** : Acide élagique.
- EDTA** : Acide éthylène diamine tétra acétique.
- ELISA** : *Enzyme-linked immunosorbent assay*.
- ERK** : *Extracellular signal-regulated kinases*.
- ERO** : Espèce réactive d'oxygène.
- FID** : Fédération international du diabète.
- GBs** : Globules rouges.
- GSH** : Glutathion réduit.
- GPx** : Glutathion peroxydases.
- Hb** : Hémoglobine.
- HbA1c** : Hémoglobine glyquée.
- HLA** : *Humanleukocyteantigen*.
- HSA** : Hémorragie sous-arachnoïdienne.
- IA-2** : *Islet antigen 2*.
- HPLC** : *High performance liquid chromatography*.
- MAI** : Maladies auto-immunes.
- MAPK** : *Mitogen-activatedprotein kinases*.
- MDA** : Malondialdéhyde.
- metHb** : Méthémoglobine.



**NAD<sup>+</sup>** : Nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée).

**NADPH, H<sup>+</sup>** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite).

**OMS** : Organisation mondiale de la Santé.

**PKC** : Protéine kinase C.

**RAGE** : Receptor *of advanced glucated end product*.

**SD** : Sérum des diabétiques.

**SO** : Stress oxydant.

**SOD** : *Super oxydes dismutases*.

**TBA** : Acide thiobarbiturique.

**TBARS** : *Thiobarbituric acid reactive substances*.

**TCA** : Acide trichloracétique.

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Structure primaire de l'insuline .....	3
<b>Figure 2:</b> Classification du diabète selon l'OMS .....	5
<b>Figure 3:</b> Physiopathologie du diabète de type 1 .....	6
<b>Figure 4:</b> Origine des ERO .....	14
<b>Figure 5 :</b> Voie de l'hexosamine .....	17
<b>Figure 6:</b> Activation de la protéine kinase C et induction du SO en cas d'hyperglycémie .....	18
<b>Figure 7:</b> La voie des polyols .....	19
<b>Figure 8:</b> Etapes de la formation des produits avancés de glycation.....	21
<b>Figure 9:</b> Structure 3D de l'Hb humaine.....	23
<b>Figure 10:</b> Impact de diabète et ses effets sur les fonctions physiologiques des GRs ..	24
<b>Figure 11:</b> Structure chimique de la vitamine E.....	27
<b>Figure 12:</b> Structure chimique de la vitamine C.....	27
<b>Figure 13:</b> Défenses antioxydantes.....	27
<b>Figure 14 :</b> Protocole expérimental de l'évaluation de l'effet cytoprotecteur de la combinaison des vitamine C et E contre l'oxydation induite pr les SD .....	38
<b>Figure 15:</b> Protocole expérimental de la peroxydation lipidique .....	40
<b>Figure 16:</b> Concentration des GRs exposés à des SD et prétraités avec les vitamines C+E.....	42
<b>Figure 17:</b> Taux de la metHb libéré par les GRs exposés à des SD et prétraités avec les vitamines C+E .....	43
<b>Figure 18:</b> Taux de l'Hb libéré par les GRs exposés à des SD et prétraités avec les vitamines C+E .....	45
<b>Figure 19:</b> Taux de la metHb à l'intérieur des GRs exposés à des SD et prétraités avec les vitamines C+E.....	46
<b>Figure 20:</b> Taux de l'Hb à l'intérieur des GRs exposés à des SD et prétraités avec les vitamines C+E .....	47
<b>Figure 21:</b> Le taux des MDA formés à partir des GRs exposés à des SD et prétraités avec les vitamines C+E .....	49

## **Liste des tableaux**

<b>Tableau 1:</b> Caractéristique des diabètes de type 1 et 2.....	8
<b>Tableau 2:</b> Critères de diagnostic du diabète sucré.....	10
<b>Tableau 3:</b> Les molécules antioxydantes et leurs propriétés biologiques .....	29
<b>Tableau 4:</b> Listes des produits chimiques et antioxydants utilisée lors de l'espérimentation.....	34
<b>Tableau 5:</b> Listes des appareils utilisés lors de l'expérimentation.....	35

# **Introduction**

## Introduction

Le diabète sucré touche environ 2 à 5 % de la population mondiale. Toutes les formes du diabète sont caractérisées par une hyperglycémie, une absence relative ou absolue de l'action de l'insuline et une résistance sélective à l'insuline. Le diabète contribue au développement de certaines complications dans la rétine, le glomérule rénal et les nerfs périphériques. Il est également associé à l'athérosclérose accélérée affectant les artères qui irriguent le cœur et le cerveau ( Giacco and Brownlee, 2010; Ahmad and Haque, 2021).

Il est maintenant admis que des concentrations élevées de glucose observées chez les diabétiques entraînent la formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces dernières sont générées par différentes voies telles que la voie de l'oxydation du glucose, hexosamine, protéine kinase C, polyols et les produits finaux de glycation avancée (AGE). Ces ERO induisent des changements chimiques dans pratiquement tous les composants cellulaires conduisant à la modification de l'ADN, des protéines et à la peroxydation des lipides (Ighodaro, 2018).

Les globules rouges (GRs) constituent les cellules les plus vulnérables aux ERO, et ils sont les principaux composants cellulaires du sang. Les GRs sont des cellules sanguines anucléées, biconcaves, de forme discoïde et sans organites. La membrane des GRs est considérée comme une bicouche lipidique complexe, composée de protéines, telle que l'hémoglobine (Hb) qui est la protéine majoritaire des GRs est qui transporte l'oxygène et le dioxyde de carbone entre les poumons et les tissus (Mameri *et al.*, 2021).

Plus de 90 % du poids d'un GR est constitué de l'Hb et un mauvais control de la glycémie peut entraîner la formation de plus de 10 % de l'Hb sous une forme glyquée, appelée HbA1c. L'Hb est une molécule réactive, capable de capter ou de céder facilement des électrons et être oxydée en méthémoglobine (metHb) au cours du processus de la glycation (Coleman, 2000). La metHb est incapable de transporter l'oxygène aux tissus et qui provoque une hémolyse des GRs en raison de l'incapacité de ces cellules à régénérer leurs composants affectés (Atyabi *et al.*, 2012).

Une variété d'antioxydants neutralisent les ERO et préviennent l'apparition de dommages oxydatifs des structures biologiques. Ils représentent la principale défense contre le stress oxydant (SO) dans la cellule, y compris les vitamines C et E, le glutathion réduit (GSH) et la glutathion peroxydase (GSH-Px) (Naziroğlu and Butterworth, 2005).

La capacité antioxydante est plus faible chez les diabétiques que chez les non-diabétiques d'où l'utilisation d'agents antioxydants exogènes chez ces patients est fortement recommandée afin de compléter la capacité antioxydante endogène et prévenir ainsi le développement des complications diabétiques (Coleman and Walker, 1999).

L'objectif de notre travail consiste donc à évaluer *in vitro* l'effet cytoprotecteur des antioxydants (la combinaison de la vitamine C et E) à l'égard du SO induit par le diabète sur les GRs *in vitro*. Pour cela, nous avons opté pour la mesure de différents paramètres à savoir: la turbidité cellulaire, l'évaluation du SO à travers le dosage des produits de la peroxydation lipidique et la mise en évidence de l'oxydation et la dénaturation de l'Hb par les sérums des diabétiques (SD).

Cette étude est subdivisée en deux parties à savoir une première partie bibliographique et une deuxième partie expérimentale. La synthèse bibliographique comporte des généralités sur le diabète sucré, le SO induit par le diabète et la protection contre ce dernier. La partie expérimentale décrit le matériel et les méthodes utilisés pour déterminer l'effet cytoprotecteur de la vitamine C et E à l'égard du SO induit par les SD sur des GRs *in vitro*. Le second volet de cette partie expérimentale est consacré à l'exposition des résultats obtenus et leurs interprétations. Nous achèverons le manuscrit par une conclusion et des perspectives.

# **Synthèse bibliographique**

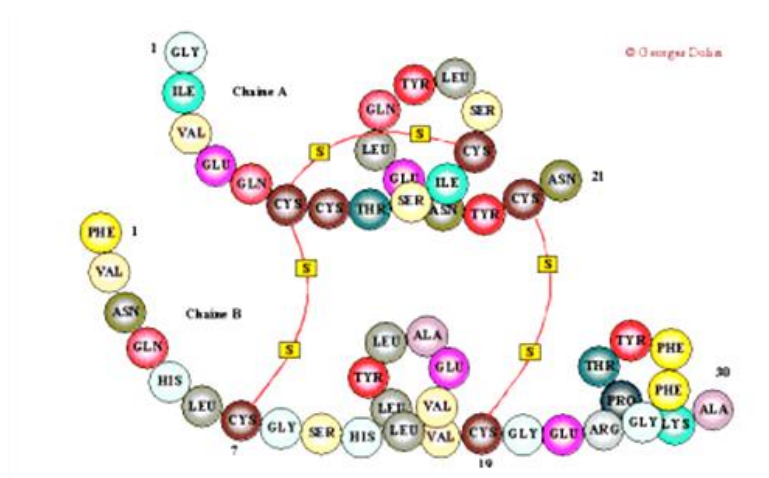
# **Chapitre I: Diabète sucré**



## I.1. Généralités sur le diabète

Le terme « diabète sucré » est dérivé des mots grecs dia (à travers), bainein (aller) et diabète signifie littéralement passer à travers (Kangralkar *et al.*, 2010). Le diabète sucré est un groupe de troubles métaboliques qui se caractérise par des niveaux élevés de glucose dans le sang connu sous le terme « hyperglycémie » (Asmat *et al.*, 2016b) qui se manifeste par une carence en insuline ou une insensibilité à l'insuline ou bien les deux en même temps (Ighodaro, 2018).

L'insuline est une protéine (hormone) synthétisée dans les cellules bêta du pancréas précisément dans les îlots de Langerhans en réponse à divers stimuli tels que le glucose, les sulfonylurées et l'arginine, mais le glucose est le principal inducteur. La structure de l'insuline est complexe, elle est composée de deux brins (figure 01), le premier brin appelé chaîne A contient 21 acides aminés. Le deuxième brin appelé chaîne B contient 30 acides aminés. Ces 2 chaînes sont reliées entre elles par 2 ponts disulfures (Asmat *et al.*, 2016b).



**Figure 01: Structure primaire de l'insuline** (Auberval, 2010).

L'hyperglycémie chronique est associée à des complications organiques spécifiques touchant particulièrement les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux (Drouin, 1999).

## I.2. Epidémiologie

La charge de morbidité liée au diabète est élevée et en augmentation dans tous les pays, stimulée par l'augmentation mondiale de la prévalence de l'obésité et des modes de vie malsains (Forouhi and Wareham, 2010). L'OMS prévoit une croissance mondiale de la prévalence des malades diabétiques de 135 millions en 1995 à 300 millions en 2025 (Gning *et al.*, 2007), ainsi des dernières estimations montrent qu'il y avait une prévalence mondiale de 425 millions de personnes atteintes de diabète en 2017, qui devrait atteindre 629 millions d'ici 2045.

Les estimations de la Fédération internationale du diabète (FID) en 2017 indiquent que plus de 96000 nouveaux cas de diabète de type 1 sont diagnostiqués dans le monde chaque année chez les enfants et les adolescents âgés de moins de 15 ans. Les 10 pays les plus touchés sont les États-Unis, l'Inde, le Brésil, la Chine, le Royaume-Uni, la Russie, l'Algérie, l'Arabie saoudite, le Nigeria et l'Allemagne, représentant près de 60 % de tous les nouveaux cas. Le diabète de type 1 peut survenir à tout âge, mais il est rare au cours de la première année de vie. L'incidence du diabète augmente régulièrement avec l'âge jusqu'à la puberté et est plus élevée chez les sujets âgés de moins de 15 ans.

Environ 425 millions de personnes dans le monde (environ 9 % des adultes de 20 ans- 79 ans) étaient diagnostiqués de diabète type 2 en 2017 (estimations de la FID). Comme dans le cas du diabète de type 1, il existe une variation géographique marquée, mais la tendance est différente. La prévalence la plus faible est enregistrée dans les zones rurales des pays en développement, généralement intermédiaire dans les pays développés et la plus élevée dans certains groupes ethniques, en particulier ceux qui ont adopté des modes de vie occidentaux. Les populations avec la prévalence du diabète la plus élevée ont une forte prévalence de l'obésité. À l'échelle mondiale, environ la moitié (50 %) des personnes âgées de 20 ans - 79 ans atteints de diabète, ignorent leur maladie, bien que cette proportion varie selon les régions du monde et les possibilités de dépistage systématique, allant d'un tiers non diagnostiqué globalement dans les pays à revenu élevé à plus de 75 % non diagnostiqué dans les pays à faible revenu (Forouhi and Wareham, 2019).

### I.3. Classification du diabète sucré

La classification nosologique du diabète publiée en 1997 par un groupe d'experts en collaboration avec l'Association Américaine du Diabète (ADA) remplace celle élaborée en 1979 par le "National Diabetes Data group" et entérinée en 1980 par l'OMS (figure 02).

Cette classification met en évidence les différences de physiopathologie des diabètes de type 1 et 2 (Rodier, 2001).

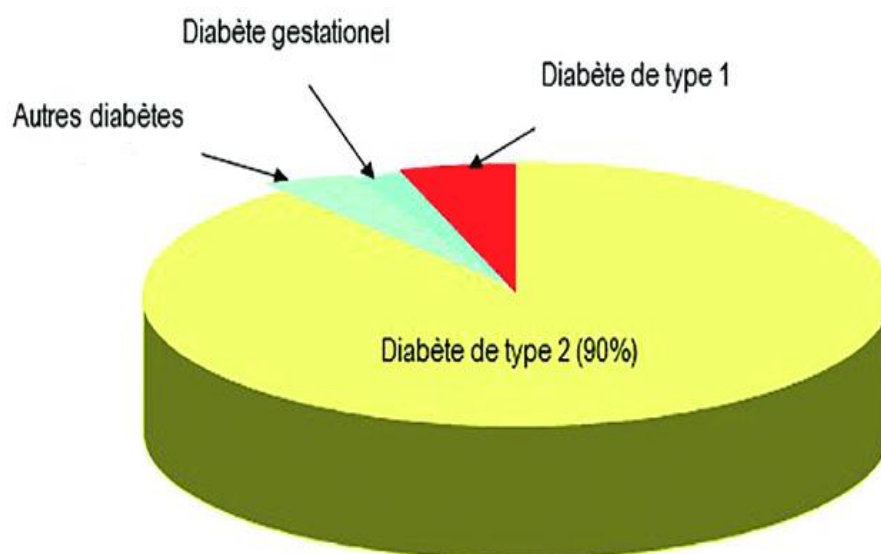


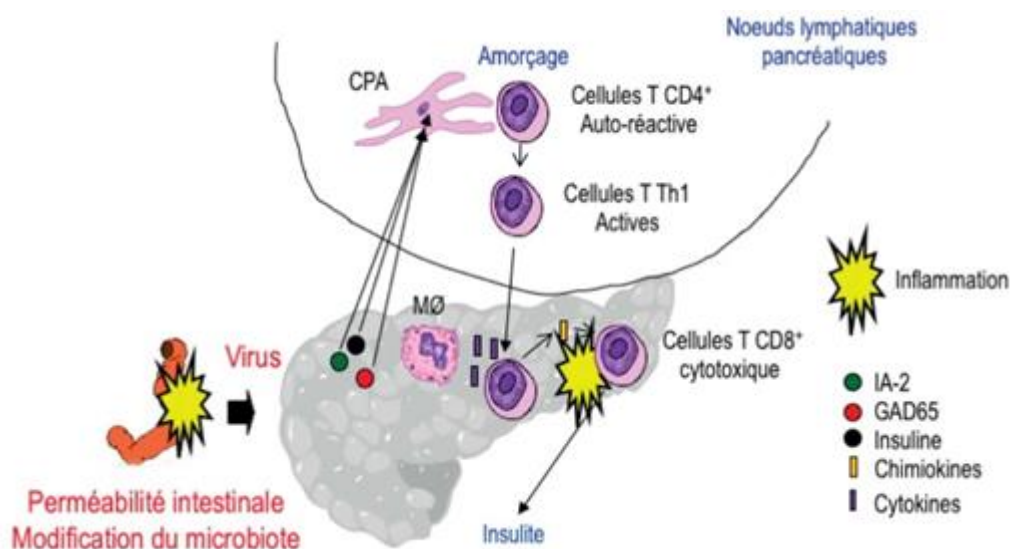
Figure 02: Classification du diabète selon l'OMS (Tenenbaum *et al.*, 2018).

#### I.3.1. Diabète de type 1

Le diabète de type 1 (DT1) représente moins de 10 % des diabètes répertoriés. L'hyperglycémie est la conséquence d'une insulino-pénie absolue résultante de la destruction progressive et sévère (> 80 %) des cellules sécrétrices d'insuline qui est induite par une réaction auto-immune. Dans la chronologie de la pathologie, la production d'anticorps reconnaissent des antigènes de la cellule bêta pancréatique (ex : GAD65, Insuline, IA2) mène à la destruction des cellules bêta et l'apparition de la pathologie. Il a été supposé que la réponse inflammatoire entraîne progressivement l'insulite et l'insulino-pénie (Tenenbaum *et al.*, 2018).

Les facteurs environnementaux jouent un rôle principal dans le développement de la maladie. Les virus, en particulier, les entérovirus comme le Coxsackie B4, comptent parmi les principaux suspects à pouvoir induire le DT1. Une méta-analyse couvrant plus d'une trentaine d'études indépendantes, consolide l'association entre la présence de ces entérovirus dans le sérum des patients et les auto-anticorps (figure03) (Tenenbaum *et al.*, 2018).

Une augmentation de la perméabilité intestinale et la modification de la composition du microbiote intestinal pourraient contribuer à l'infection comme le montrent de nombreuses études réalisées dans des modèles murins de DT1. La diminution de certaines souches de bactéries dans l'intestin pourrait être aussi un facteur déclencheur de la maladie. Cette hypothèse a été émise suite à une étude récente montrant une réduction significative de la bactérie *Akkermansia muciniphila* dans l'intestin des patients et de souris diabétiques. La réintroduction de cette souche retarde considérablement la survenue du diabète chez la souris. Des perturbations de l'alimentation chez l'enfant pourraient provoquer la modification du microbiote, et ainsi contribuer au développement du DT1. En effet, un sevrage précoce, une alimentation trop riche en céréales (riche en gluten), ou une alimentation contaminée par des polluants sont autant des facteurs alimentaires ayant été associés au développement du DT1 (Tenenbaum *et al.*, 2018).



**Figure 03: Physiopathologie du diabète de type 1** (Tenenbaum *et al.*, 2018).

### I.3.2. Diabète type 2

Le diabète type 2 (DT2) est la forme la plus courante de diabète et représente 90 à 95 % des cas. Il est défini comme étant une affection métabolique, caractérisée par une hyperglycémie (une concentration du glucose élevée dans le sang). Ce dernier se développe secondairement à une carence relative en insuline, mais le principal défaut est la résistance à l'insuline (Alam *et al.*, 2014).

#### I.3.2.1. Physiopathologie de diabète type 2

L'étiologie de la maladie est complexe, impliquant à la fois, les facteurs génétiques et environnementaux. L'obésité est le premier facteur de risque de diabète ainsi que l'âge, celle-ci est capable d'induire ou d'aggraver une insulino-résistance. Dans 80% des personnes atteintes de ce type de diabète présentent un excès pondéral.

Une production insuffisante en insuline face à une demande accrue de l'organisme cause la survenue de la maladie, aussi par une augmentation de la résistance à l'insuline des tissus cibles de l'insuline tels que le foie, les muscles et le tissu adipeux.

Cette insulino-pénie est d'abord la conséquence d'une incapacité des cellules béta à sécréter de l'insuline en réponse au glucose. La perte relative ou absolue de la sensibilité de l'insuline précède le dysfonctionnement des cellules béta pancréatiques. Ce défaut fonctionnel serait ensuite accompagné par une réduction de la masse totale des cellules béta, ce qui participe au développement de la maladie. En effet, une réduction de 65 % de la masse totale des cellules béta pancréatiques est associée au DT2 (Tenenbaum *et al.*, 2018).

#### I.3.2.2. Développement de l'insulino-résistance

L'insulino-résistance est définie comme une diminution de l'action de l'insuline au niveau des tissus cibles à savoir les muscles, le foie et le tissu adipeux.

Parmi les médiateurs biologiques de l'insulino-résistance, des substances sécrétées par l'adipocyte, telles que les acides gras libres ou le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Aussi, le cortisol intracellulaire étant un puissant antagoniste de l'action de l'insuline et sa présence en excès favorise l'obésité viscérale et l'insulino-résistance.

### 1.3.2.3. Signe clinique de diabète type 2

La présentation clinique d'un diabète est très variable. Le plus souvent, les sujets sont asymptomatiques et il est découvert à l'occasion d'un bilan de santé systématique. Parfois, au contraire, la clinique est au premier plan, le malade se plaignant alors d'une polyurie, d'une polydipsie, d'une polyphagie et d'un amaigrissement brutal. Des signes digestifs (nausées, vomissements, douleurs abdominales) sont parfois associés. Dans ce cas, le diagnostic ne doit pas être retardé car la cétose fréquente nécessite un traitement.

Les 2 types de diabète ont de nombreuses caractéristiques cliniques et biologiques différentes, sont présentés dans le tableau (01) (Rodier, 2001).

**Tableau 01: Caractéristiques des diabètes de type 1 et 2 (Rodier, 2001).**

	Diabète de type 1	Diabète de type 2
Fréquence relative	10-15%	85-90%
ATCD familiaux	+	+++
Age de début	Avant 30 ans	Après 40 ans
Mode de début	Brutal	Progressif
Surpoids	Absent	Présent
Symptômes	+++	---
Insulinosécrétion	Néant	Persistante
Cétose	Fréquente	Absente
MAI associées	Oui	Non
Auto-anticorps	Présents	Absents
Groupe HLA	Oui	Non
Traitement	Insuline	Régime, exercice, ADO

### I.3.3. Diabète gestationnel

Le diabète gestationnel (DG) est déterminé par l'OMS comme une anomalie de l'homéostasie glucidique conduisant à une hyperglycémie de sévérité variable au cours de la grossesse (Vanderijst *et al.*, 2012). Il se caractérise par une hyperglycémie avec des valeurs supérieures à la normale, mais inférieures à celles posant le diagnostic de diabète. Les femmes développant un DG ont un risque plus élevé (x 7) de développer un DT2. Par ailleurs, les femmes présentant un DG ont un risque accru de complications pendant la grossesse et à l'accouchement (Tenenbaum *et al.*, 2018).

### I.4. Critères de diagnostic

En 2006, l'OMS a publié les critères de diagnostics du diabète qui sont en concordance avec ceux de l'Association Américaine du Diabète (ADA) (Alam *et al.*, 2014). En effet, l'ADA recommande de poser le diagnostic du diabète au moyen de la détermination du glucose plasmatique à jeun et sauf, en situations spéciales, de renoncer au test oral de tolérance au glucose. L'OMS, dans une grande mesure, a adopté les critères de diagnostics recommandés par l'ADA, sans toutefois renoncer de manière aussi péremptoire que l'ADA, au test de tolérance au glucose en faveur de la glycémie à jeun. L'OMS recommande en effet de poser le diagnostic sur la seule base de la glycémie à jeun que lorsque le test de tolérance au glucose s'avère impraticable.

Les critères de diagnostics révisés sont présentés dans le tableau (02) (Spinass and Lehmann, 2001).

**Tableau 02: Critères de diagnostic du diabète sucré** (Spinass and Lehmann, 2001).

Il existe en principe trois possibilités de diagnostiquer en diabète sucré
1. Glucose plasmatique à n'importe quel moment $\geq 11,1$ mmol/l ( $\geq 200$ mg/dl) et symptômes typiques d'un diabète sucré
2. Glucose plasmatique à jeun (c'est-à-dire après période de jeûne de $>8$ heures) $\geq 7$ mmol/l ( $\geq 126$ mg/dl)
3. Glucose plasmatique 2 heures après charge orale de glucose (75 g) $\geq 11,1$ mmol/l ( $\geq 200$ mg/dl)
<b>Glucose plasmatique à jeun</b>
$<6,1$ mmol/l ( $<110$ mg/dl) : pas de diabète sucré
$\geq 6,1$ mmol/l et $<7$ mmol/l ( $\geq 110$ mg/dl et $<126$ mg/dl) : trouble du glucose à jeun (trouble de l'homéostasie du glucose)
$\geq 7$ mmol/l ( $\geq 126$ mg/dl) diabète sucré (diagnostic provisoire, à vérifier par une 2 <sup>ème</sup> détermination)

Le diagnostic doit être confirmé par l'une des trois possibilités citées, le dépistage doit être pratiqué un autre jour. Ceci est particulièrement important pour les personnes asymptomatiques. Une hyperglycémie découverte dans le cadre d'une maladie infectieuse sévère, d'un traumatisme, d'un épisode cardiovasculaire (infarctus du myocarde, apoplexie) ou d'autres facteurs de stress peut être transitoire et il ne s'agit pas d'un diagnostic pour un diabète sucré (Spinass and Lehmann, 2001).

L'ADA a récemment intégré l'HbA1c non seulement comme mesure du contrôle de l'hyperglycémie et de l'efficacité des interventions, mais aussi comme test diagnostique du diabète sucré. Une valeur de  $\geq 48$  mmol/mol ( $\geq 6,5\%$ ) (Certifié et standardisé selon le test DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) est considéré comme un diagnostic de diabète (Alam *et al.*, 2014).



## I.5. Complications du diabète

Le diabète est un trouble dans lequel les patients sont à tout moment à risque de complications. Les complications peuvent être macrovasculaires (maladie coronarienne, maladie vasculaire périphérique et accident vasculaire cérébral), microvasculaires (neuropathie, rétinopathie et néphropathie) et à la fois micro et macrovasculaires (pied diabétique). La mortalité et la morbidité du diabète sont davantage associées à la dégénérescence macrovasculaire par rapport aux risques de complications microvasculaires chez les personnes âgées. En général, les complications du diabète sucré peuvent être classées en deux groupes :

**I.5.1. Complications aiguës métaboliques :** ce sont des complications du diabète de courte durée et comprennent l'hypoglycémie, l'acidocétose et le coma hyperosmolaire non cétonique.

**I.5.2. Complications systémiques tardives :** il s'agit de complications chroniques à long terme qui comprennent la néphropathie diabétique, la microangiopathie, la neuro- et la rétinopathie diabétiques, l'athérosclérose et les infections (Asmat *et al.*, 2016a).

Le SO est actuellement proposé comme mécanisme sous-jacent du diabète et des complications diabétiques (Kangralkar *et al.*, 2010). Il a été suggéré que le SO joue un rôle important dans le développement des complications vasculaires chez les patients diabétiques (Asmat *et al.*, 2016a).

## I.6. Stratégie thérapeutique et prise en charge du diabète

La stratégie thérapeutique de DT1 consiste à compenser l'insulinopénie par de l'insuline exogène ou plus rarement par la transplantation des îlots de Langerhans ou de pancréas (Tenenbaum *et al.*, 2018).

Concernant le DT2, l'objectif thérapeutique est de normaliser la glycémie pour prévenir les complications. La valeur seuil retenue de l'HbA1c se situe entre 6,5% et 7%. La stratégie générale du traitement d'un diabétique de type 2 doit être globale et multifactorielle. D'après les dernières recommandations de la HAS.

Durant le diagnostic du diabète, mise en place des règles hygiéno-diététiques avec un régime alimentaire adapté et la pratique d'une activité physique régulière. En cas d'échec du régime seul ( $HbA1c > 6,5 \%$ ), un passage à la monothérapie orale est exigé par la prescription de la metformine. Dans le cas de résultats insuffisants de la monothérapie, le médecin ait recours à la bithérapie orale (sulfamides + metformine ou metformine + glitazones ou sulfamides + glitazones). En cas d'échec de la bithérapie orale, le médecin recommande la trithérapie orale : sulfamides + Metformine + glitazones. Lorsque la trithérapie se révèle insuffisante pour équilibrer la glycémie, une insulinothérapie en dernière intention est recommandée (Debbab, 2021).

# **Chapitre II: Stress oxydant induit par le diabète**

## II.1. Relation entre le diabète et le stress oxydant

Le déséquilibre entre un antioxydant et un pro-oxydant est dû principalement à l'auto-oxydation du glucose chez les diabétiques, ce qui conduit généralement à la génération des espèces réactives oxygénées (ERO). Dans les cellules, il existe généralement un équilibre entre l'élimination par les antioxydants et le développement des ERO. Le diabète sucré entraîne une augmentation progressive des ERO et la diminution du potentiel des mécanismes de défense antioxydante (Khan *et al.*, 2015).

## II.2. Généralités sur le stress oxydant

Le stress oxydant (SO) se définit comme l'incapacité de l'organisme de se défendre contre les ERO en raison de la perturbation de l'équilibre endogène entre ces derniers et les défenses antioxydantes de l'organisme (AO) (Bensakhria, 2018), en faveur des premières. Notre mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice physique intense) mais aussi notre hygiène alimentaire, augmentent de façon anormale la production des ERO dans notre organisme. A long terme, ceci peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies comme les cancers, les maladies cardiovasculaires et le diabète (Haleng *et al.*, 2007).

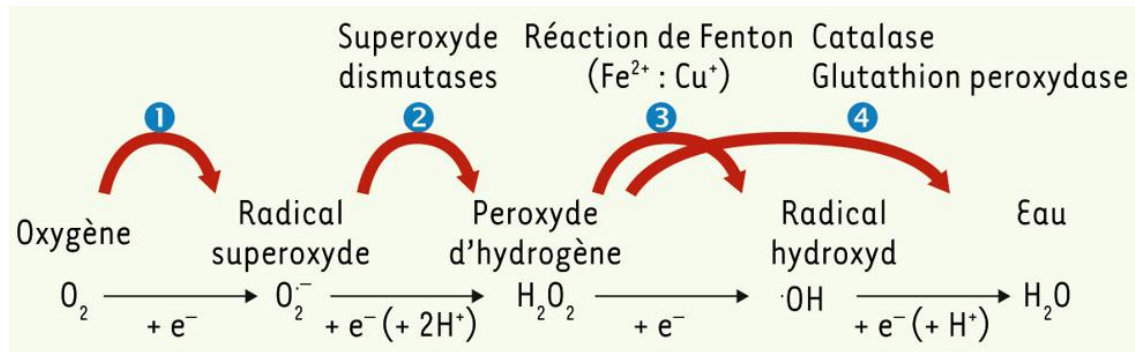
## II.3. Systèmes pro-oxydants

### II.3.1. Espèces réactives d'oxygène

La réduction tétravalente de l'oxygène en eau se fait par plusieurs étapes successives qui donnent naissance à des intermédiaires potentiellement réduits, appelés radicaux primaires ou ERO (figure 04), car ces entités radicalaires et moléculaires sont beaucoup plus réactives que l'oxygène qui leur a donné naissance (Migdal and Serres, 2011).

Les ERO ont longtemps été considérées comme des sous-produits toxiques du métabolisme normal de l'oxygène et impliquées dans de nombreuses pathologies y compris le diabète (Migdal and Serres, 2011). Ce sont des espèces chimiques oxygénées telles que l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), les radicaux hydroxyle ( $OH\cdot$ ) ainsi que le peroxyde

d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Gardès-Albert, 2006). Ces derniers sont des entités chimiques réactives contenant un ou plusieurs électrons non appariés dans l'orbitale la plus externe. L'équilibre est rétabli soit par oxydation (perte de cet électron libre) ou par réduction (gain d'un autre électron), ce qui entraîne l'oxydation des composants et des molécules cellulaires (Bensakhria, 2018).



**Figure 04: Origine des ERO** (Migdal and Serres, 2011).

### II.3.2. Rôle physiologique des ERO

Les ERO sont importantes pour activer différentes voies de signalisation à l'intérieur de la cellule, comme les voies de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK) et de la kinase régulée par le signal extracellulaire (ERK) qui modifie l'expression des gènes, ainsi qu'en coordination avec la superoxyde dismutase initie la mort cellulaire et sont impliqués dans la transcription des gènes, la transduction unique et la régulation d'autres activités de la cellule (Asmat *et al.*, 2016b).

### II.3.3. Implications pathologiques des ERO

La réactivité élevée des ERO détermine les changements chimiques dans tous les composants cellulaires, conduisant à la modification de l'ADN, des protéines et des lipides (Piconi *et al.*, 2003).

#### II.3.3.1. ADN

Des modifications oxydatives de l'ADN peuvent se produire via de nombreuses voies, y compris des modifications oxydatives des bases nucléotidiques ou des sucres,

ou en formant des réticulations. Il est bien connu que de telles modifications peuvent entraîner des mutations, le vieillissement et la mort cellulaire.

Les ERO peuvent provoquer l'oxydation de l'ADN par différents mécanismes, par exemple via un radical hydroxyle (dérivé de la réduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou via des intermédiaires azotés réactifs tels que le peroxy-nitrite. L'ADN endommagé est réparé par des endonucléases et des glycosylases, les désoxynucléotides et les bases respectivement qui sont excrétés dans les urines (Piconi *et al.*, 2003).

### II.3.3.2. Protéines

La modification des protéines peut entraîner une réticulation, une fragmentation peptidique et une conversion d'un acide aminé en un autre ou en un résidu modifié par oxydation de la chaîne latérale de l'acide aminé (Piconi *et al.*, 2003).

Les acides aminés sont susceptibles aux ERO, parmi eux l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine qui sont les plus réactifs. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus par conséquent l'apparition de groupements carbonyles, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes (Haleng *et al.*, 2007). Ces modifications peuvent entraîner l'altération des structures secondaires et tertiaires des protéines. Ces changements conformationnels peuvent exposer des régions précédemment protégées à une oxydation supplémentaire ou à d'autres types de mutations spontanées (Piconi *et al.*, 2003).

### II.3.3.3. Lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés (AGPI) sont la cible privilégiée de l'attaque radicalaire par le radical hydroxyle qui est capable d'arracher un hydrogène du carbone situé entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy. Cette réaction est connue sous le nom de peroxydation lipidique (Favier, 2003). Elle conduit à la formation de nombreux radicaux peroxyde lipidiques, amplifiant l'effet des ERO et modifie les caractéristiques de la molécule ce qui la rend plus hydrophile. Cette caractéristique aboutit à l'altération

de la structure et de la fonction de la membrane car ils sont les constituants de base et majoritaires de la membrane (Piconi *et al.*, 2003) .

## **II.4. Les différentes voies de génération du SO**

Dans les conditions d'hyperglycémie chronique, la production d'ERO est perpétuée et par conséquent les enzymes antioxydantes et les antioxydants non enzymatiques sont sévèrement endommagés dans divers tissus ce qui exacerbe encore le SO. Plusieurs voies moléculaires impliquées dans l'induction du SO sont régulées positivement dans le diabète (Ighodaro, 2018) qui sont activés par un seul évènement en amont et qui est surproduction des ERO (Giacco and Brownlee, 2010) .

### **II.4.1. Oxydation du glucose**

L'oxydation du glucose représente la principale source des ERO. Sous sa forme ènediol, le glucose est oxydé dans une réaction dépendante du métal de transition en un anion radical ènediol qui est convertit en cétoaldéhyde et en radicaux anion superoxyde. Les radicaux anions superoxyde subissent après une dismutation en  $H_2O_2$ . Ce dernier n'est pas dégradé par la catalase ou la glutathion peroxydase et en présence de métaux de transition peut conduire à la production de radicaux hydroxyles extrêmement réactifs ainsi peut également réagir avec l'oxyde nitrique pour former des radicaux peroxy nitrites réactifs (Maritim *et al.*, 2003). Cependant, dans des conditions hyperglycémiques il y a une production excessive des radicaux d'anions superoxydes qui endommagent les systèmes antioxydants de l'organisme cela aboutit à l'installation et à l'apparition du SO tout en infligeant des dommages à l'ADN ainsi qu'à d'autres macromolécules (Ighodaro, 2018).

### **II.4.2. Voie de l'hexosamine**

La voie de l'hexosamine est impliquée dans le métabolisme du fructose-6-phosphate (F-6-P) dérivé de la glycolyse. Le processus implique l'activité d'une enzyme limitant la vitesse, la glucosamine-fructose amidotransférase (GFAT) qui métabolise le fructose-6-phosphate en glucosamine 6-phosphate, un intermédiaire qui est ensuite convertit en uridinediphosphate-N-Acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) sous l'action

d'UDP-N-Acetylglucosaminesynthase. L'UDP-N-Acetylglucosamine est un composé métabolique vital pour la formation de chaînes glycosylées des protéines et des lipides, il est également utilisé dans la modification post-traductionnelle des protéines.

La voie de l'hexosamine associée à des altérations de l'expression génique et à une expression accrue de facteurs de transcription tels que le TGF- $\alpha$  et le TGF- $\beta$  qui à leur tour inhibent la mitogenèse des cellules mésangiales et active la prolifération de la matrice de collagène et l'épaississement de la membrane basale. Ceux-ci sont tous responsables du rôle toxique et pro-oxydant de la voie de l'hexosamine dans le diabète et ses complications associées, en particulier la néphropathie (Ighodaro, 2018).

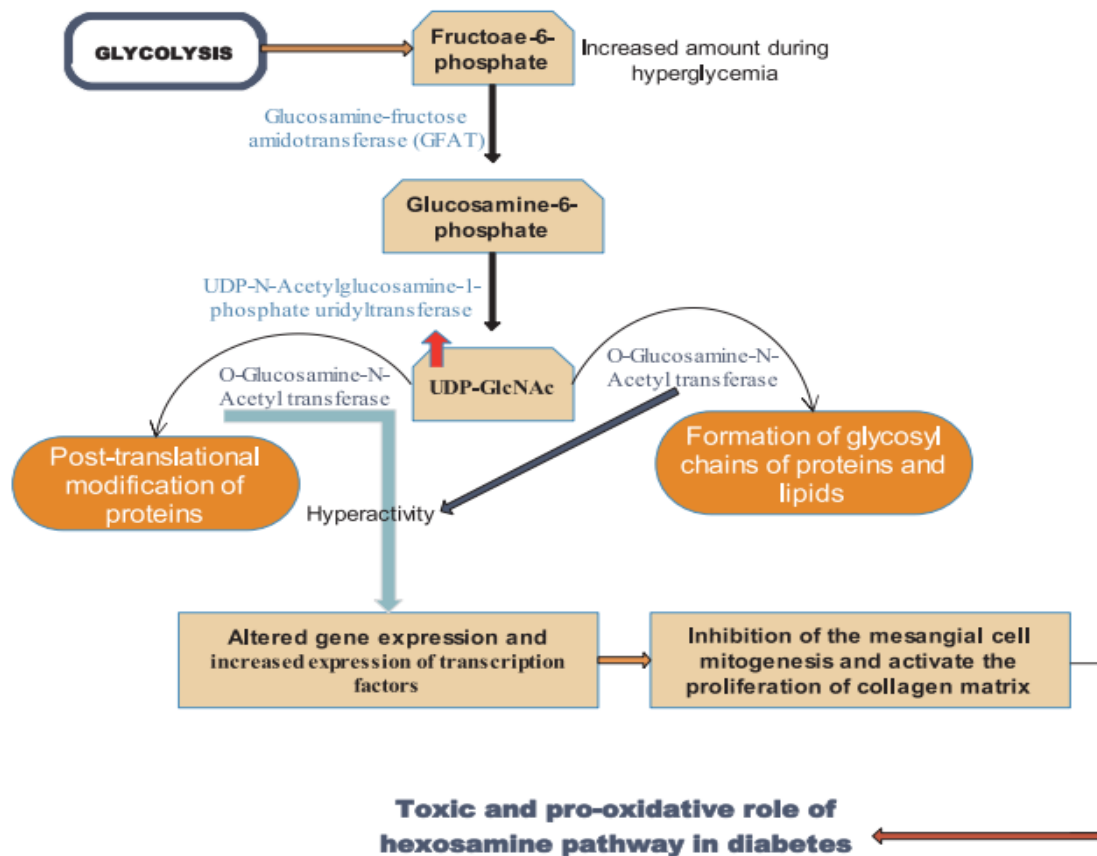


Figure 05 : Voie de l'hexosamine (Ighodaro, 2018).

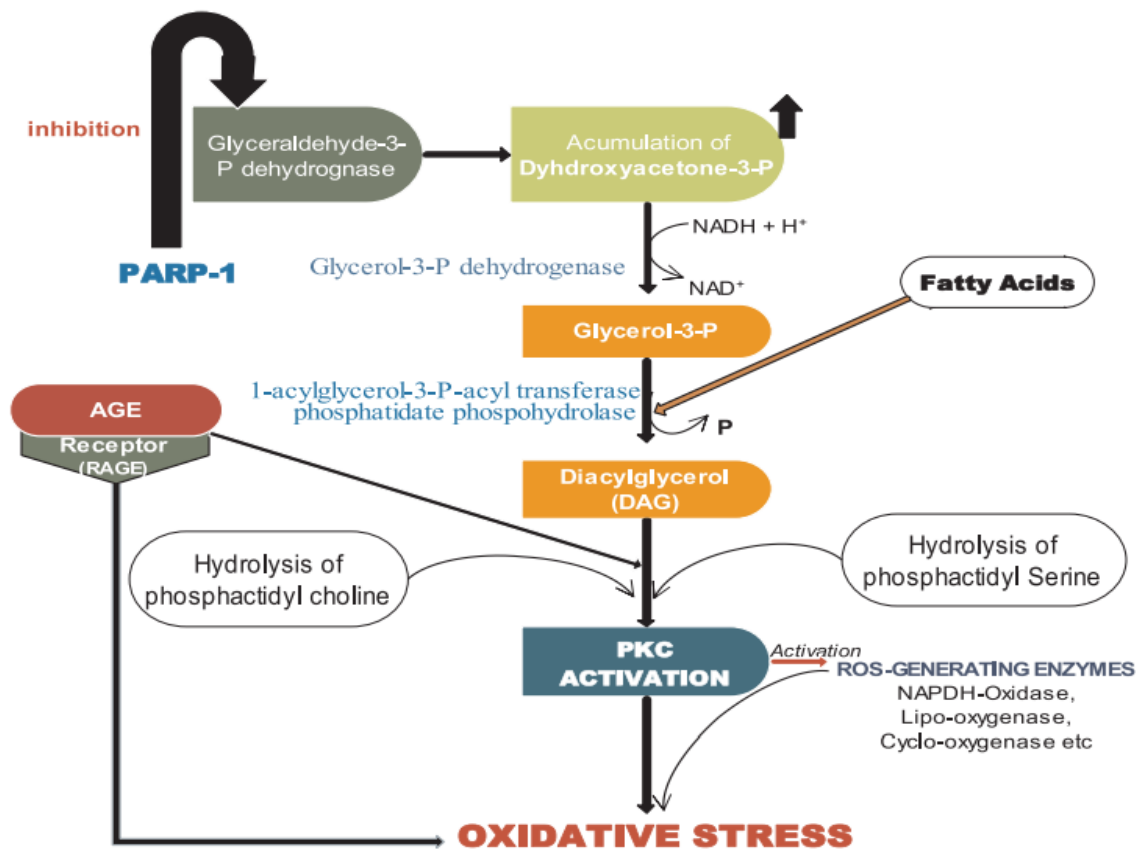
### II.4.3. Protéine kinase C

Les PKC sont une famille d'au moins 11 isoformes qui sont largement distribués dans les tissus de mammifères, cette enzyme phosphoryle diverses protéines cibles. L'activité des isoformes classiques dépend à la fois de calcium et de phosphatidylsérine



et elle est fortement renforcée par le diacylglycérol (DAG) (Giacco and Brownlee, 2010). L'accumulation de glycéraldéhyde-3-phosphate due à l'inhibition de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase en cas d'hyperglycémie conduit à un niveau élevé de dihydroxyacétone-3-phosphate (DHA-3-P) qui est ensuite réduit en glycérol-3-Phosphate qui à son tour se combine avec des acides gras pour conduire à la synthèse du DAG sous l'action de la 1-acylglycérol-3- $\beta$ -acyl transférase et de la phosphatidate phosphohydrolase. L'augmentation du niveau cellulaire de DAG qui se forme également de l'hydrolyse de la phosphatidylcholine et de la phosphatidylsérine, régule la voie des isoformes de la PKC. Aussi, le DAG interagit avec le récepteur AGE pour induire un SO par l'activation de la PKC.

Des activités élevées de la voie PKC stimulent les enzymes génératrices de ERO telles que les NADPH-oxydases et les lipooxygènes qui exacerbent l'environnement oxydatif cellulaire (Ighodaro, 2018).



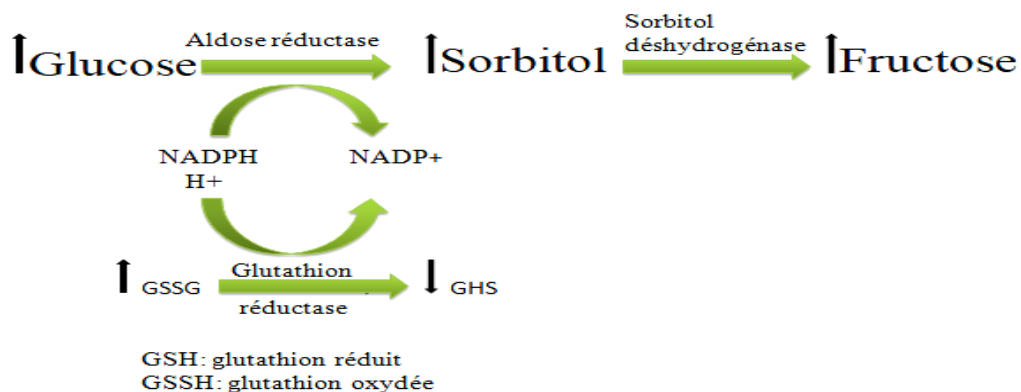
**Figure 06: Activation de la protéine kinase C et induction du SO en cas d'hyperglycémie (Ighodaro, 2018).**

#### II.4.4. Voie des polyols

La voie des polyols est une voie métabolique accessoire en situation normale, transformant le glucose en sorbitol grâce à l'aldose réductase, puis le sorbitol en fructose par la sorbitol-déshydrogénase (Andrès and Bicklé, 1999). En cas d'hyperglycémie chronique, une grande quantité de la molécule est canalisée dans la voie des polyols, entraînant une formation accrue de sorbitol et une consommation excessive de NADPH avec des conséquences néfastes pour la cellule. La première d'entre elles est l'accumulation de sorbitol, substance qui se diffuse peu à travers les membranes cellulaires, à l'origine d'une élévation de la pression osmotique intracellulaire (Andrès and Bicklé, 1999).

Une autre conséquence est l'augmentation du stress redox causé par la consommation de NADPH. Étant donné que le NADPH est un cofacteur nécessaire pour régénérer le glutathion réduit (GSH) et que le GSH est un important piègeur des ERO, cela pourrait induire ou exacerber le SO intracellulaire (Giacco and Brownlee, 2010).

Le déséquilibre des potentiels d'oxydoréduction conduit aussi à la synthèse de DAG et à l'inhibition de la  $\beta$ -oxydation, avec accumulation d'acides gras à longue chaîne. Il en résulte une activation de la voie de PKC, à l'origine d'une augmentation de la production de radicaux libres (anions superoxyde  $O_2^-$ ) et de monoxyde d'azote (NO), enfin d'une diminution de l'activité de la pompe  $Na^+/K^+$ -ATPase (Andrès and Bicklé, 1999).



**Figure 07: Voie des polyols** (Andrès and Bicklé, 1999).

#### II.4.5. Voie avancée des produits finaux de glycation (AGE)

Le terme de «glycation non enzymatique» désigne un ensemble de modifications post-traductionnelles irréversibles des protéines, provoquées par la fixation d'oses simples ou de leurs dérivés sur les fonctions amines. Les sites de glycation sont le plus souvent l'extrémité N-terminale de la protéine, et les fonctions  $\epsilon$ -aminées de résidus lysyl de la chaîne polypeptidique (Gillery, 2001).

Il s'agit d'un mécanisme complexe comprenant plusieurs étapes, dont les phases tardives génèrent un groupe hétérogène de composés appelés « produits de glycation avancée » ou « Advanced glycation end products » (AGE). Les étapes précoces débutent par l'interaction entre l'ose et un groupement aminé de la protéine, ce qui entraîne la formation d'une base de Schiff caractérisée par une liaison aldimine instable. Cette liaison peut être facilement hydrolysée et ainsi libérer l'ose, mais elle peut également subir un réarrangement moléculaire complexe appelé réarrangement d'Amadori, caractérisé par l'établissement d'une liaison céto-amine plus résistante. Les produits formés suite à cette étape sont des intermédiaires stables appelés « produits d'Amadori » (Jaisson and Gillery, 2018), ces derniers sont couramment dosés en biologie clinique au cours du suivi du patient diabétique. Le meilleur exemple en est l'HbA1c, fraction majoritaire de l'HbA1c, dont le dosage permet l'évaluation de l'équilibre du diabète pendant les deux mois qui précèdent le prélèvement (Gillery, 2001).

Avec le temps, les produits d'Amadori subissent des modifications supplémentaires de type oxydation, clivages, pontages qui vont conduire à la formation de multiples AGE nouveaux (Jaisson and Gillery, 2018).

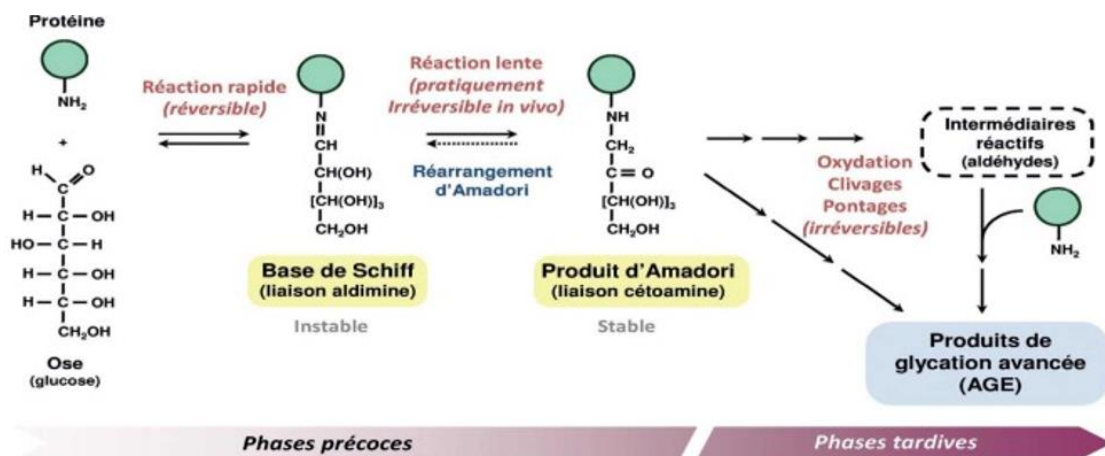
Les AGE, en particulier les protéines modifiées sont présents à la fois dans les compartiments intracellulaires et dans la matrice extracellulaire (Giacco and Brownlee, 2010).

Les précurseurs peuvent endommager les cellules par 3 mécanismes généraux. Premièrement, les protéines intracellulaires modifiées par les AGE ont une fonction altérée. Deuxièmement, les composants de la matrice extracellulaire modifiés par les

précurseurs des AGE interagissent anormalement avec d'autres composants de la matrice et avec les récepteurs matriciels (intégrines) qui sont exprimés à la surface des cellules. Enfin, les protéines plasmatiques modifiées par les précurseurs AGE se lient aux récepteurs AGE sur des cellules telles que les macrophages, les cellules endothéliales vasculaires et les cellules musculaires lisses vasculaires. La liaison au récepteur de l'AGE (RAGE) induit la production des ERO (Giacco and Brownlee, 2010).

La glycation génère des ERO aux stades initiaux intermédiaires et avancés. Il est montré que les protéines glyquées au stade des produits d'Amadori réagissent avec l'oxygène moléculaire pour former l'ion superoxyde  $O_2^-$  à pH physiologique. Elles sont également capables de former d'autres dérivés de l'oxygène comme  $H_2O_2$ . De surcroît, les oses simples comme le glucose peuvent produire des ERO par auto-oxydation (Gillery, 2001).

Les étapes intermédiaires et tardives de la glycation engendrent la formation de nombreux dérivés comme le glyoxal et le méthylglyoxal se lient à différents récepteurs AGE ou interagissent avec des biomolécules pour initier un SO directement ou indirectement par l'activation de la protéine kinase (Ighodaro, 2018).



**Figure 08: Etapes de la formation des produits avancés de glycation** (Jaisson and Gillery, 2018) .

## II.5. Biomarqueurs du SO chez les diabétiques

### II.5.1. ADN

À ce jour, la plupart des intérêts se sont concentrés sur la mesure de la 8-hydroxy-2désoxyguanosine (8-OHdG) et de sa base libre 8-hydroxyguanine (8-OH-G) dans les cellules sanguines ou l'urine. Les méthodes analytiques pour évaluer ces bases sont l'extraction en phase solide et l'HPLC avec détection électrochimique, la chromatographie en phase gazeuse spectrométrie de masse (GC-MS), l'ELISA sandwich et le test COMET. Différentes études ont montré que chez les patients diabétiques, les taux sériques de 8-OHdG sont augmentés (Piconi *et al.*, 2003).

### II.5.2. Protéines

Un bon marqueur des dommages oxydatifs aux protéines et du SO est la nitrotyrosine. Lorsque le superoxyde et l'oxyde nitrique existent à proximité, ils peuvent former spontanément du peroxyde d'azote un puissant oxydant. La nitration en position 3 (ortho) de la tyrosine est le produit majeur de l'attaque du peroxyde d'azote sur les protéines. La nitration de la tyrosine des protéines par le peroxyde d'azote interfère avec les voies de signalisation de la phosphorylation/déphosphorylation et altère la fonction des protéines. La détection de la nitrotyrosine est le plus souvent réalisée par une technique basée sur la HPLC et la GC-MS ou par la méthode ELISA (Piconi *et al.*, 2003).

### II.5.3. Lipides

Le diabète sucré produit des perturbations dans le profil lipidique du corps, rendant les cellules plus sensibles à la peroxydation lipidique qui est un biomarqueur critique du SO. Le malondialdéhyde (MDA) est formé à la suite de la peroxydation lipidique qui peut être utilisé pour mesurer les peroxydes lipidiques après réaction avec l'acide thiobarbiturique (TBA) (Asmat *et al.*, 2016a).

#### II.5.4. Glutathion

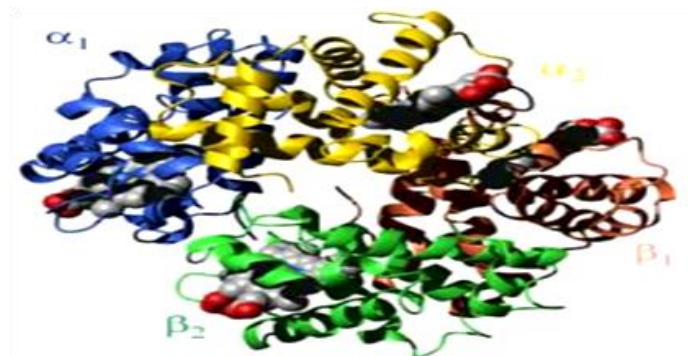
Le diabète induit des altérations de l'activité des enzymes glutathion peroxydase et glutathion réductase, toute altération de leurs niveaux est un biomarqueur significatif du SO (Asmat *et al.*, 2016a).

### II.6. Les globules rouges comme modèle d'étude du SO

Afin d'étudier l'effet des SD, le choix d'un modèle sera idéal s'il arrive à mettre en évidence tous les processus et les paramètres responsables de la cause du stress généré par ces derniers. Les GRs sont considérés comme un excellent modèle d'étude du SO, induit par les SD.

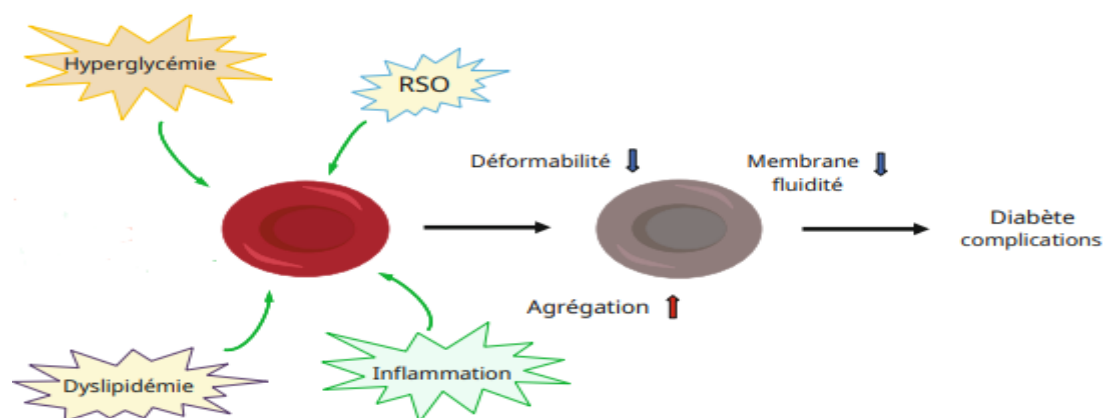
Les GRs sont les cellules les plus abondantes dans le sang, anucléées, biconcaves, sans organites, riches en systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques et ont une membrane constituée des lipides des protéines et des glucides. Leur flexibilité permet de traverser librement les capillaires, transportant l'oxygène vers les tissus et délivrant du dioxyde de carbone aux poumons via l'Hb qui est la principale protéine la plus abondante dans les GRs (Wang *et al.*, 2021).

L'Hb est une hémoprotéine de 64 kDa, chaque molécule est un hétérotétramère formé de 4 chaînes de globine et de 4 molécules d'hème (Gaucher, 2007) qui se lie de manière réversible à l'O<sub>2</sub> à condition que son fer soit maintenu dans un état ferreux (Fe<sup>2+</sup>) (Coleman, 2000).



**Figure 09: Structure 3D de l'Hb humaine.** Une protéine constituée de 4 chaînes de globine (2  $\alpha$  et 2  $\beta$ ) contenant chacune un hème pouvant se lier chacun à une molécule de l'O<sub>2</sub> (Gaucher, 2007).

Comme les GRs sont les cellules les plus consommatrices de glucose, en présence d'une hyperglycémie de longue durée, leur morphologie, leur métabolisme et leur fonction sont inévitablement soumis à une série de changements qui affectent davantage l'hémorhéologie et la microcirculation. C'est pourquoi les GRs des patients diabétiques sont confrontés à de multiples risques tels que l'hyperglycémie, le SO, l'inflammation et les troubles du métabolisme lipidique, qui entraînent une agrégation accrue, une déformabilité cellulaire et une fluidité membranaire réduite. Ces modifications des GRs finissent par entraîner des complications diabétiques (Wang *et al.*, 2021).



**Figure 10: Impact de diabète et ses effets sur les fonctions physiologiques des GRs**  
(Wang *et al.*, 2021).

Un taux élevé du glucose conduit à une glycation non enzymatique progressive de l'Hb, entraîne aussi la formation de l'HbA1c (Coleman, 2000), cette glycation est souvent associée à une génération des ERO et une atteinte des défenses antioxydantes (Coleman, 2001). Ces ERO dont le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène qui peuvent oxydées l'Hb ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en méthémoglobine ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Coleman, 2000) qui est une forme anormale de l'Hb rendant impossible le transport de l'oxygène.

Lors de la dénaturation oxydative, il y aura le détachement des sous unités de l'Hb s'accumulant au niveau de la membrane donnant naissance à la fois aux hémichromes réversibles et irréversibles qui précipitent à l'intérieur de GR formant les corps de Heinz qui déforment le GR (Claro *et al.*, 2006).

Contrairement à d'autres cellules du corps, les GRs peuvent être facilement prélevés pour évaluer la formation de metHb à l'aide d'un co-oxymètre et faire observer la formation du corps de Heinz sous un microscope optique (Coleman, 2001).

## II.7. Système de défense antioxydant

Les antioxydants sont des agents chimiques ou biologiques capables de neutraliser l'action potentiellement dommageable des ERO. Le processus d'oxydation des macromolécules est ralenti par les antioxydants. L'effet destructeur des ERO dans les cellules et les dommages cellulaires causés par les métabolites toxiques sont minimisés ainsi par les antioxydants. Ils peuvent être obtenus à partir de différentes sources alimentaires et sont utilisés pour ne pas développer de SO, améliorant aussi le mécanisme de défense.

Il existe divers mécanismes enzymatique et non enzymatiques (Khan *et al.*, 2015) :

### II.7.1. Système antioxydant enzymatique

Le système antioxydant enzymatique comprend la superoxyde dismutase, les glutathion peroxydases, la catalase qui joue un rôle décisif dans l'élimination des ERO (Leverve, 2009).

#### II.7.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

La superoxyde dismutase fournit une défense de première ligne contre les lésions cellulaires médiées par les ERO (Asmat *et al.*, 2016a), il convertit les radicaux anion superoxyde produits dans le corps en peroxyde d'hydrogène (Maritim *et al.*, 2003), le superoxyde est dismuté à d'autres composés moins toxiques par les SOD (Asmat *et al.*, 2016a) et sont donc essentielles pour protéger la cellule contre ces produits toxiques (Kangralkar *et al.*, 2010).

#### II.7.1.2. Glutathion peroxydases (GPxs)

La GPx est une sélénoprotéine (cinq isoformes) son rôle principal consiste à l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du SO sur les acides gras polyinsaturés (Haleng *et al.*, 2007). La glutathion peroxydase métabolise le peroxyde



d'hydrogène en eau en utilisant du glutathion réduit comme donneur d'hydrogène, donc elle fonctionne comme un piègeur direct des ERO (Maritim *et al.*, 2003).

#### II.7.1.3. Catalase (CAT)

La catalase est une enzyme qui décompose le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>) et eau (H<sub>2</sub>O) (Kangralkar *et al.*, 2010).

### II.7.2. Système antioxydant non enzymatique

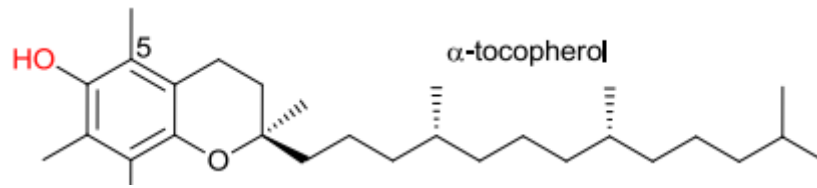
Les antioxydants endogènes non enzymatiques (vitamines E et C), d'autres systèmes antioxydants non enzymatiques présents dans l'organisme humain tel que le glutathion ont pour rôle de canaliser l'électron célibataire afin d'éviter l'oxydation des autres molécules.

#### II.7.2.1. Glutathion

Dans les tissus diabétiques et non diabétiques, les fonctions essentielles du GSH incluent le co-facteur ou le catalyseur dans de nombreuses voies de détoxification, ainsi que la régulation de nombreuses protéines et enzymes. Cependant, son rôle majeur est celui du maintien direct et indirect d'un environnement cellulaire réducteur. Ceci est directement assurée par la neutralisation des ERO qui est médiée par le GSH, le système de maintien du glutathion fournit également le pouvoir réducteur pour maintenir d'autres antioxydants tissulaires dans leurs états réduits, tels que l'ascrobate et le tocophérol (Coleman, 2000).

#### II.7.2.2. Vitamine E

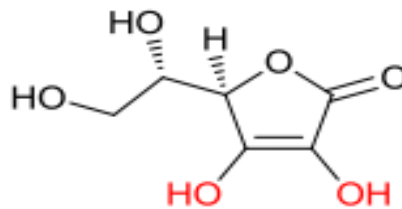
La vitamine E est une molécule liposoluble recouvrant un ensemble de huit molécules organiques, quatre tocophérols et quatre tocotriénols. La forme biologiquement la plus active est l' $\alpha$ -tocophérol, agissant en milieu lipophile sur les radicaux peroxydes pour donner un radical tocophéryle et ainsi empêcher la propagation de la peroxydation lipidique (Lecerf *et al.*, 1994).



**Figure 11: Structure chimique de la vitamine E** (Fabre *et al.*, 2015).

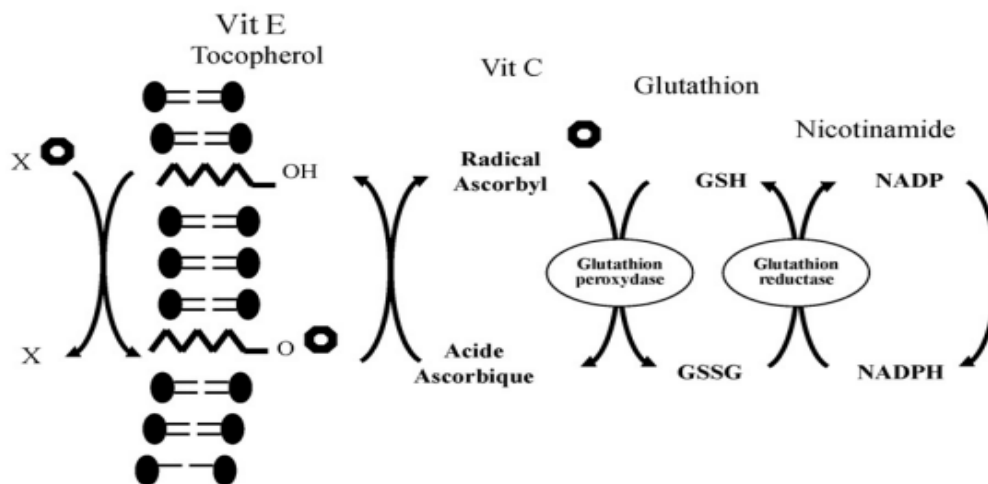
### II.7.2.3. Vitamine C

La vitamine C est une molécule hydrosoluble, elle assure une protection contre les agents oxydants toxiques hydrosolubles ( $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{O}_2^-$ ) (Leverve, 2009).



**Figure 12: Structure chimique de la vitamine C** (Fabre *et al.*, 2015).

Cette vitamine agit en synergie avec la vitamine E car elle protège la vitamine E tissulaire de l'oxydation (figure 13) (Leverve, 2009).



**Figure 13: Défenses antioxydantes « complémentarité entre le systèmes non enzymatiques et enzymatiques »** (Leverve, 2009).

**Chapitre III: Protection contre  
le stress oxydant induit par le  
diabète**

### **III.1. Antioxydants employés dans le traitement adjuvant du diabète**

De nombreuses molécules naturelles notamment les polyphénols, les polysaccharides, les oligoéléments et les vitamines jouent un rôle important dans la protection du corps humain contre le diabète et ses complications, alors ces molécules ont à la fois des propriétés antidiabétiques et antioxydantes donc celles seront d'une grande importance dans le traitement du diabète sucré (Mohan *et al.*, 2013). Ces différentes molécules sont présentées dans le tableau 03.

Tableau 03: Les molécules antioxydantes et leurs propriétés biologiques.

		Généralités	Propriétés
<b>Polyphénols</b>			
Quercétine	La quercétine est un métabolite secondaire présent dans plusieurs plantes. C'est un composé organique de la famille des flavonoïdes, plus précisément du sous groupe des flavonols. Elle se présente à l'état pur comme une poudre jaune au goût très amer (Ramachandran <i>et al.</i> , 2010).	La quercétine a un effet anti-diabétogène agit par de multiples mécanismes tels que l'amélioration de la sensibilité à l'insuline, l'augmentation de la sécrétion du glucose et la stimulation de la régénération des îlots de Langerhans dans le pancréas. Elle réduit le SO par plusieurs mécanismes : la neutralisation des ERO, la réduction d'une manière significative des taux de TBARS et aussi la restauration du statut antioxydant (Ramachandran <i>et al.</i> , 2010).	
Acide ellagique	Acide ellagique (EA) est une molécule phytochimique présent dans de nombreux fruits et légumes ainsi que dans d'autres aliments végétaux (Ahangarpour <i>et al.</i> , 2019).	EA est connu pour avoir des propriétés hypoglycémiantes par la potentialisation de la sécrétion de l'insuline à partir des cellules pancréatiques et l'amélioration du transport du glucose. EA possède une activité antioxydant qui se résulte du piégeage direct des ERO, protège les GRs des dommages oxydatifs induits par le peroxyde d'hydrogène et elle régule l'activité enzymatique (Ahangarpour <i>et al.</i> , 2019).	

## Suite du tableau 03

Tanins	Les tanins sont des composés naturels largement répandus dans le règne végétal, ils sont une famille complexe de composés polyphénoliques (Aguilera-Carbo <i>et al.</i> , 2008).	Les tanins permettent de diminuer le taux de glucose et pourraient potentialiser la sécrétion pancréatique de l'insuline grâce à leur effet antidiabétique, ont une activité antioxydante qui est attribuée à ses propriétés redox qui peuvent agir comme agents réducteurs ainsi ils sont des piègeurs des ERO, protègent l'organisme contre le SO et préviennent les complications associées au diabète (Mohan <i>et al.</i> , 2013).
Curcumine	La curcumine est le composant actif des rhizomes de curcuma qui sont le composant majeur des épices curcuma et curry. Ces épices ont été utilisées en médecine traditionnelle grâce à leurs effets biologiques qui ont été associés à la curcumine, qui prévient nombreuses maladies notamment le diabète (Seo <i>et al.</i> , 2008).	Des études montrent que le supplément alimentaire en curcumine améliore la résistance à l'insuline et réduit les niveaux de glucose dans le sang. Plusieurs études ont indiqué que la curcumine joue un rôle bénéfique en tant qu'agent antioxydant qui normalise les activités des enzymes antioxydantes dans les érythrocytes, diminue le taux de peroxydation lipidique et peut diminuer la production des ERO. Donc, la curcumine contribue à la réduction du SO induit par l'hyperglycémie dans les GRs et étant aussi bénéfique dans la prévention des complications diabétiques (Seo <i>et al.</i> , 2008).
<b>Polysaccharides</b>	Les polysaccharides sont des polymères de la famille des glucides constitués de plusieurs	Des expériences ont montré que les polysaccharides peuvent réduire de manière significative la glycémie par amélioration de l'intégrité structurelle du tissu

A suivre

## Suite du tableau 03

	<p>oses liés entre eux par des liaisons osidiques. Ils représentent des éléments structuraux majeurs de la paroi des végétaux. Ce sont des substrats solides, prenant la forme de fibres, granules ou gels. Les polysaccharides tenant un rôle essentiel dans le stockage de l'énergie (EFSTATHIOU and Christian, 2008).</p>	<p>des îlots pancréatiques, peuvent augmenter les activités des enzymes antioxydantes SOD, GPx et CAT et diminuent le niveau des MDA (Zhang <i>et al.</i>, 2014).</p>
<b>Oligo-éléments</b>	<p>Le zinc joue un rôle majeur dans l'organisme. Les déficits en ce dernier, les altérations de l'homéostasie de cet élément-trace essentiel sont associés à plusieurs pathologies chroniques, dont le diabète et ses complications (Roussel, 2014).</p>	<p>Le zinc est également impliqué dans la fonction insulinique. Il est bien établi que le transporteur de zinc ZnT8 est une protéine-clé pour la régulation de la sécrétion insulinique par les cellules B du pancréas. Le zinc est nécessaire pour le stockage et à la sécrétion d'insuline, stabilise sa structure, augmente l'expression de ses récepteurs. Le zinc est un puissant antioxydant, qui assure la stabilité structurale de la SOD, enzyme de défense antioxydante majeure et aussi il inhibe l'activité de la NADPH oxydase (Roussel, 2014).</p>
Zinc		

A suivre

## Suite du tableau 03

Sélénium	Le sélénium représente l'un des oligo-éléments antioxydants majeurs et il est le cofacteur de la glutathion peroxydase (Faure, 2003).	Le sélénium joue un rôle dans la modulation de l'activité de l'insuline et la diminution de la peroxydation lipidique (Faure, 2003).
<b>Vitamines</b>		
Vitamine E	La vitamine E ou $\alpha$ -tocophérol est une vitamine liposoluble et l'un des antioxydants endogènes les plus puissants (Flora <i>et al.</i> , 2008).	La supplémentation en vitamine E réduit les concentrations de glucose et améliore l'action de l'insuline chez les diabétiques et elle inhibe la glycation de l'Hb (Pazdro and Burgess, 2010). La vitamine E agit comme un antioxydant, protégeant les GRs de l'hémolyse induite par le SO, empêche la formation de la metHb. Elle augmente la concentration de GSH au niveau des GRs et contribue à la diminution de la peroxydation lipidique (Claro <i>et al.</i> , 2006).
Caroténoïdes	Les caroténoïdes sont des molécules liposolubles. Le $\beta$ -carotène, la lutéine et le cryptoxanthine représentent les caroténoïdes les plus abondants dans l'alimentation humaine (Abdul-Hamid and Moustafa, 2014).	Des expériences suggèrent que le $\beta$ - carotène intact a des effets hypoglycémiantes et antioxydants (Abdul-Hamid and Moustafa, 2014).
Acide $\alpha$ lipoïque	L'acide $\alpha$ -lipoïque ALA est un composé dithiol naturel, il est considéré comme antioxydant	Il empêche la destruction des cellules bêta, améliore l'absorption du glucose et réduit également la glycosylation des protéines. Des études <i>in vitro</i> suggèrent que

A suivre



## Suite du tableau 03

	utilisé dans la gestion des complications diabétiques (Laher, 2011).	l'ajout d'ALA a entraîné une réduction de la peroxydation lipidique induite par l'hyperglycémie. L'ALA est un puissant antioxydant réduit le SO dont les fonctions comprennent : l'extinction des ERO, la régénération des antioxydants exogènes et endogènes tels que les vitamines C et E et le GSH, donc ses effets antioxydants peuvent être particulièrement utiles pour ralentir les complications diabétiques telles que la neuropathie diabétique (Laher, 2011).
Vitamine C	La vitamine C ou L-ascorbique est une vitamine hydrosoluble sensible à la chaleur et à la lumière. Elle a diverses fonctions dans le corps humain (Bendich <i>et al.</i> , 1986).	Plusieurs études démontrent que la vitamine C améliore la sensibilité à l'insuline (Poitout <i>et al.</i> , 2001). D'autre part cette vitamine est l'antioxydant le plus puissant qui est capable de piéger les radicaux, dont le radical hydroxyle. L'ascorbate peut donner des électrons à la methHb-NADH réductase qui à son tour réduit la methHb et joue un rôle important dans la protection du groupe thiol des protéines contre l'oxydation (Claro <i>et al.</i> , 2006).

# **Partie expérimentale**

# **Chapitre IV: Matériels et méthodes**

## IV. Matériels et méthodes

Ce travail ayant pour but d'évaluer l'effet antioxydant de la combinaison des vitamines C et E sur des GRs co-incubés avec le SD à HbA1c élevé. Pour cela, différents paramètres ont été mesurés à savoir: la turbidité cellulaire, le taux de l'Hb, le taux de la metHb libérée et intracellulaire après 48 heures d'incubation. Ce travail de recherche a été réalisé au niveau du laboratoire de Biochimie, de la faculté SNV-ST de l'université Akli Mohand Oulhadj de Bouira en collaboration avec l'Hôpital Mohamed Boudiaf de Bouira.

### IV.1. Matériel

#### IV.1.1. Matériel biologique

Tous les tests ont été effectués sur des GRs provenant du sang frais humain. Le sang a été prélevé à partir des donneurs sains et non-fumeurs, auprès du centre de transfusion sanguine de l'Hôpital Mohamed Boudiaf de Bouira. Ces échantillons ont été recueillis sur héparinate de lithium.

Les SD ont été récupérés au niveau de différents laboratoires d'analyses médicales en concertation avec le corps médical et les patients diabétiques.

#### IV.1.2. Produits chimiques et antioxydants utilisés

Le tableau 04 illustre les différents produits chimiques et antioxydants utilisés pour la réalisation des différentes expérimentations ainsi que leurs firmes.

**Tableau 04: Liste des produits chimiques et antioxydants utilisés lors de l'expérimentation.**

Produits chimiques/antioxydants utilisés	Firme
Chlorure de sodium	Sigma-Aldrich USA
Acide trichloracétique	Biochem
Acide thiobarbiturique	Biochem
Acide éthylène diamine tétraacétique	Biochem
Hydroxyle de sodium	Sigma-Aldrich
L-acide ascorbique	Sigma-Aldrich
Vitamine E	Sigma-Aldrich

### IV.1.3. Appareillage

Le tableau 05 illustre les différents appareils utilisés pour la réalisation du travail pratique ainsi que leur firme.

**Tableau 05: Liste des appareils utilisés lors de l'expérimentation.**

<b>Appareil</b>	<b>Firme</b>
Balance analytique	Ohaus
Bain marie	Daihan scientifique
Spectrophotomètre à UV	Optima
Vortex	Nahita
Etuve	Memmert
Centrifugeuse	Sigma
Micropipette	Dragon
Agitateur électro-magnétique	Lab Tech

## IV.2. Méthodes

### IV.2.1. Etude de la cytoprotection sur le modèle GR humain

Notre travail nécessite l'utilisation des GRs sains, afin d'étudier l'effet oxydant SD, puis l'emploi d'agents protecteurs associés à ces sérums.

#### IV.2.1.1. Prélèvement du sang et préparation de la suspension de GRs

Un volume du sang de 5ml a été centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min, ensuite les érythrocytes ont été séparés du plasma et de la couche leucocytaire.

Les GRs ont ensuite été lavés deux à trois fois avec la solution NaCl et une suspension d'hématocrite à 20 % a été préparée (sang isotonique).

#### IV.2.1.2. Préparation de solution d'antioxydants

Les antioxydants utilisés sont : la vitamine C et E. Ces vitamines ont été préparées en solutions, afin d'évaluer leurs effets protecteurs à l'égard de la toxicité induite par les SD *in vitro*. Ces antioxydants ont été testés à des concentrations de 0,1mg/ml pour la vitamine C et de 0,25mg/ml pour la vitamine E (Mameri *et al.*, 2021).

#### IV.2.1.3. Etude de l'effet des SD sur les GRs humains

Le principe de base de cette méthode consiste à traiter les GRs avec les différents SD à HbA1c élevée. Ensuite, déterminer la concentration cellulaire, le taux de l'Hb libérée et intracellulaire ainsi que le taux de la metHb libérée et intracellulaire.

##### a. Test de la turbidité cellulaire

Des volumes du sang isotonique ont été incubés avec des volumes prédéterminés des vitamines C et E seuls ou associés pendant 30 min à 37°C. Un volume du SD a été par la suite ajouté. Le témoin négatif contient du sang isotonique co-incubé avec du sérum des sujets sains. Les mélanges réactionnels ont été incubés pendant 48 heures à 37°C. Après incubation, un volume du mélange a été prélevé puis dilué avec du NaCl afin de mesurer l'absorbance des différents échantillons à 620 nm (Mameri *et al.*, 2021).

##### b. Dosage de l'Hb libérée

L'Hb libérée correspond à l'Hb évacuée par les GRs suite à une lyse spontanée provoquée par un SO exercé sur leurs membranes. Après centrifugation à 4000 rpm pendant 10 min, les absorbances ont été mesurées par spectrophotométrie à 412 nm (Mameri *et al.*, 2021).

##### c. Dosage de l'Hb intracellulaire

Le culot cellulaire contenant des GRs intacts, est complètement lysé afin de libérer l'Hb intracellulaire après centrifugation à 4000 rpm pendant 10 min, les absorbances des surnageants ont été mesurées par spectrophotométrie à 412 nm (Mameri *et al.*, 2021).

*d. Test de l'hémolyse et dosage de la metHb libérée*

La metHb contenant dans le surnageant correspond à la metHb qui a été libérée suite à une lyse spontanée des GRs.

La génération de la metHb a été évaluée dans les différents échantillons par spectrophotométrie après centrifugation à 4000 rpm pendant 10 min en mesurant les absorbances des surnageants à 540 nm.

Le taux de la metHb libérée a été déterminé selon l'équation suivante :

$$\text{Taux de metHb\%} = (\text{Abs de l'échantillon} / \text{Abs de la metHb totale}) \times 100$$

*e. Dosage de la metHb intracellulaire*

La metHb intracellulaire a été mesurée à 540 nm, suite à une lyse cellulaire par l'eau distillée.

La figure 14 illustre le protocole expérimental utilisé dans l'étude de l'effet cytoprotecteur de la combinaison des vitamines C et E contre l'oxydation induite par les SD.

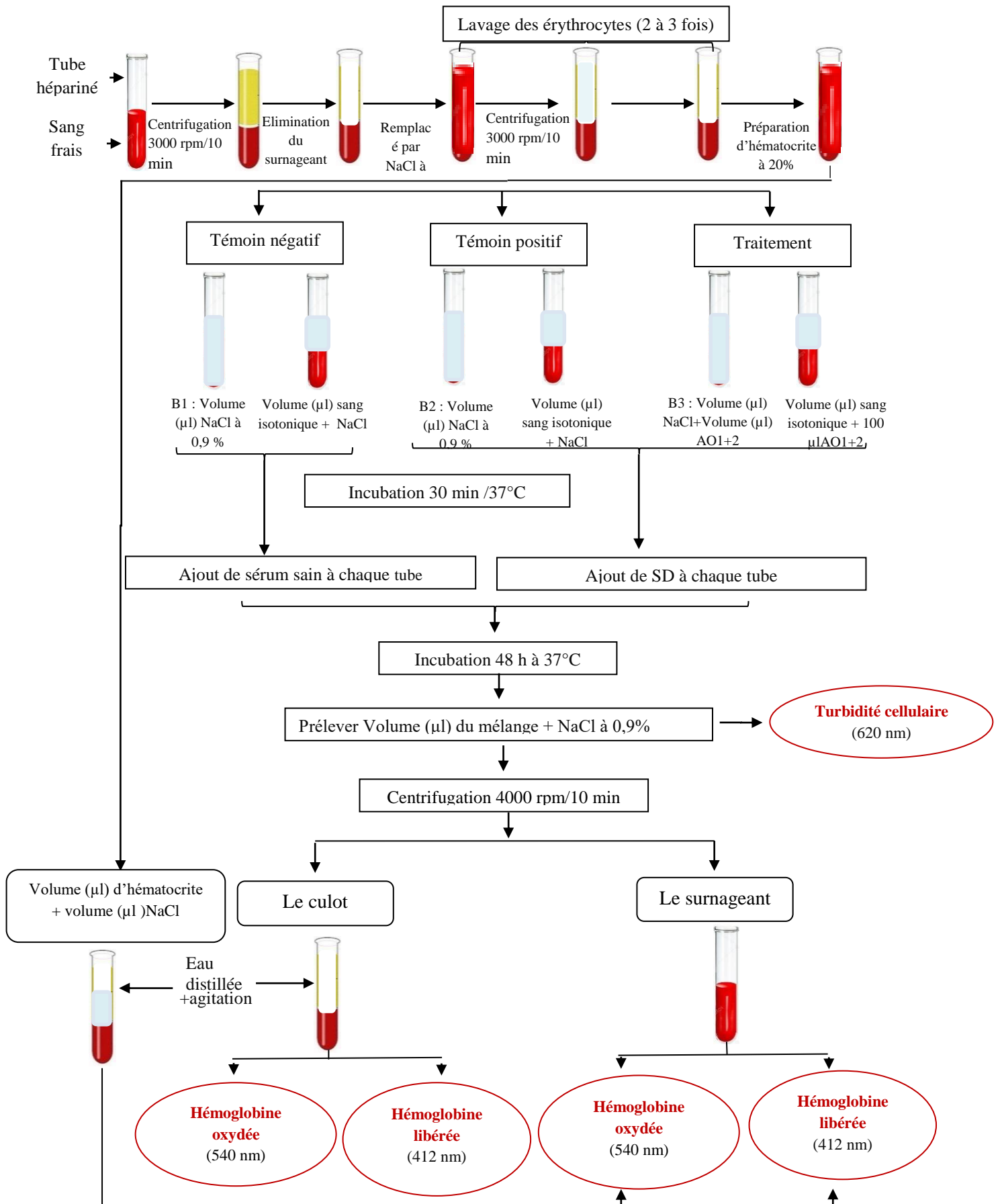


Figure 14: Protocole expérimental de l'évaluation de l'effet cytoprotecteur de la combinaison des vitamines C et E contre l'oxydation induite par les SD (Mameri *et al.*, 2021).



*f. Test de la peroxydation lipidique*

Ce test a pour but de mettre en évidence l'effet des SD sur la membrane phospholipidique des GRs, qui est riche en AGPI produits sensibles à l'action des ERO. Cela, provoque la dégradation des lipides membranaires ce qui induit la formation des aldéhydes toxiques appelés malondialdéhydes (MDA).

La protection contre la peroxydation lipidique a été mise en place après le test de la turbidité, pour mettre en évidence le mécanisme moléculaire par lequel les antioxydants induisent une protection de la membrane des GRs à l'égard du SO provoqué par les sérums et illustrer ainsi les modifications et les changements induits dans ces cellules.

Le protocole expérimental de l'inhibition de la peroxydation des lipides, est résumé comme suit :

Les différents échantillons ont été préparés en suivant les étapes décrites dans la section IV.2.1.3. Après incubation, un volume de l'acide trichloracétique (TCA) a été ajouté puis le mélange a été incubé à 0°C pendant 2 heures. Les tubes ont été ensuite centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min, puis un volume de TBA et de l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) est ajouté au surnageant. Ensuite un chauffage des différents échantillons à 95°C a été réalisé pendant 15 min. Après refroidissement des tubes, les absorbances des échantillons ont été mesurées à 535 nm.

La figure 15 illustre le protocole expérimental de la peroxydation lipidique :

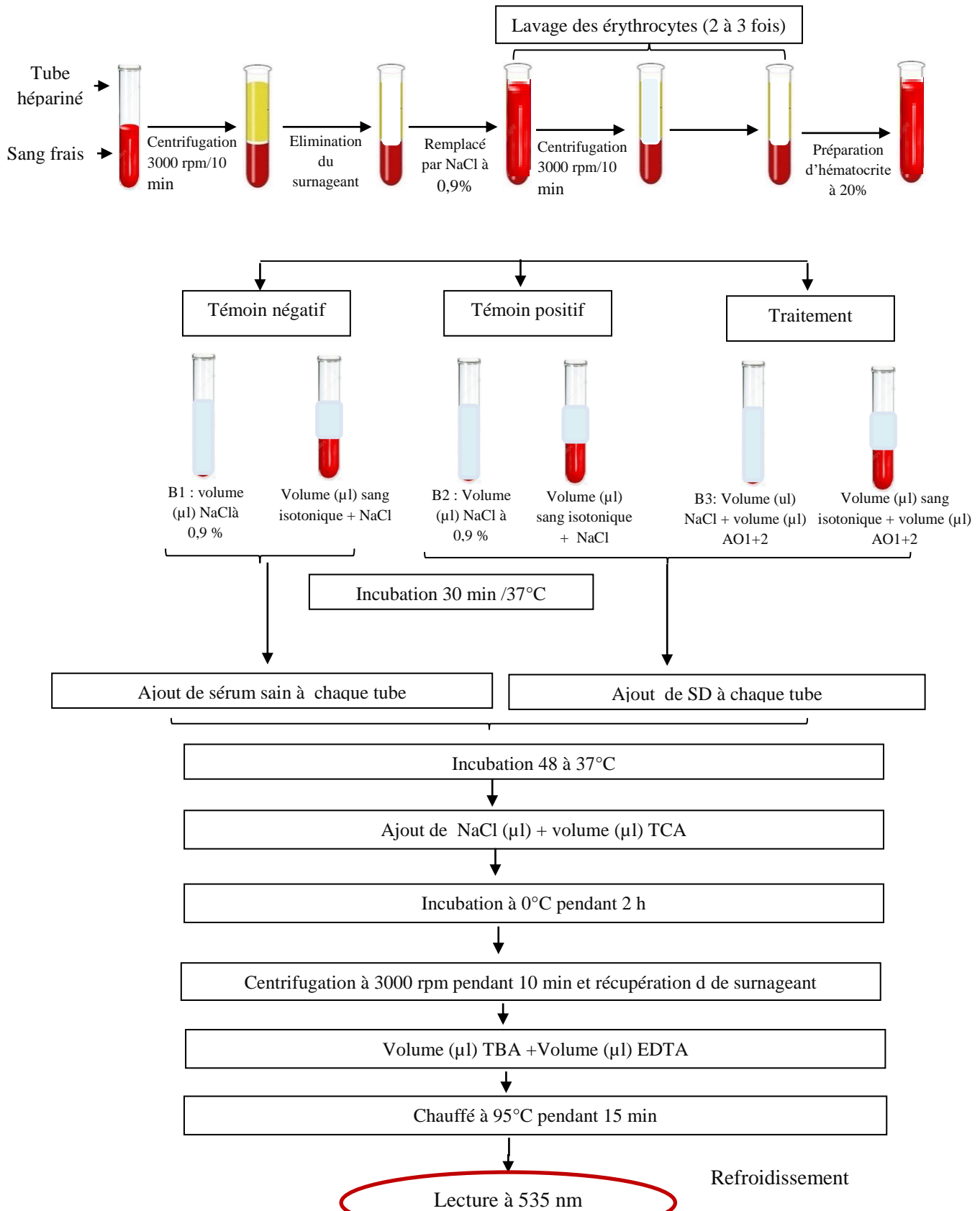


Figure 15: Protocole expérimental de la peroxydation lipidique (Mameri *et al.*, 2021).

#### IV.2.2. Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée avec le logiciel Graph Pad Prism 8, les résultats sont présentés comme moyenne  $\pm$  écart type (n = 3). Les valeurs sont données en \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001(ou bien en # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001). Le test ANOVA One-Way a été utilisé pour comparer la différence entre chaque groupe. Les valeurs de p<0,05 ont été considéré comme significatives.

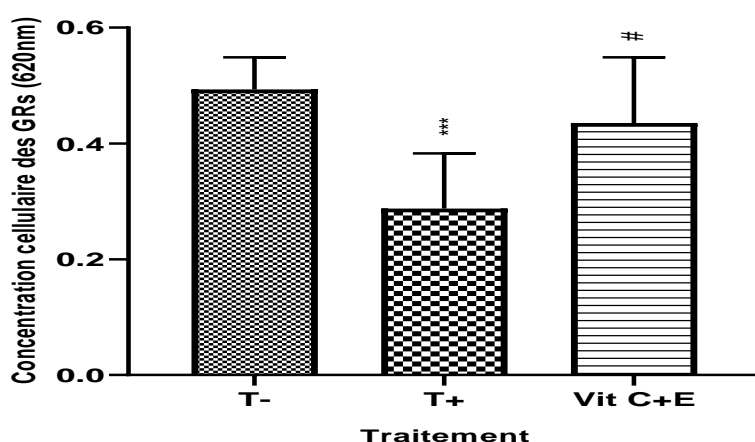
## **Chapitre V: Résultats et discussion**

## V. Résultats et discussion

### V.1. Etude de la cytoprotection des GRs par des antioxydants

Afin d'évaluer l'effet cytoprotecteur des antioxydants associés (vitamine C+E), des SD ont été introduits pour induire une altération des membranes des GRs.

La figure 16 représente les variations de la turbidité cellulaire des GRs suite à leur exposition aux SD, ainsi qu'aux vitamines C+E.



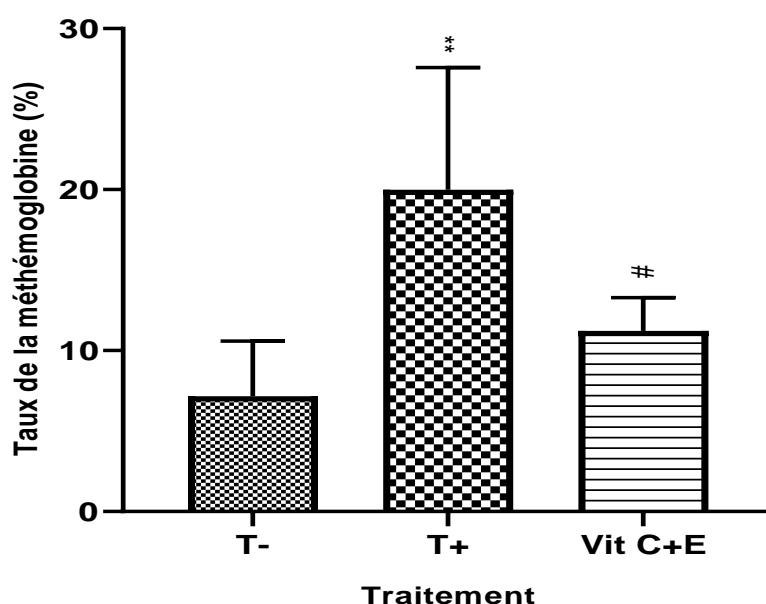
**Figure 16: Concentration des GRs exposés à des SD et prétraités avec les vitamines C+E.** T<sup>-</sup>: témoin négatif ; T<sup>+</sup>: témoin positif (SD); Vit C+E: vitamine C (0,1mg/ml), E : vitamine E-cyclodextrine (0,25mg/ml). \*: comparaison avec le T<sup>-</sup>. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD des différentes expérimentations (\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001). # : Comparaison avec le témoin positif. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD des différentes expérimentations (# p < 0,05 ; ## p < 0,01 ; ### p < 0,001).

Les résultats montrent que la valeur de concentration cellulaire du témoin positif diminue très significativement après l'ajout des SD (0,28±0,09) en comparaison avec le témoin négatif (0,49±0,05), ce qui révèle que les SD ont exercé un effet cytotoxique sur les GRs en induisant une hémolyse cellulaire. Cependant, un effet cytoprotecteur significatif (0,43±0,11) a été enregistré par les GRs prétraités avec les vitamines C+E, cela indique que l'association des vitamines C et E diminue l'effet délétère causé par les SD. Des études ont été réalisées par (Claro *et al.*, 2006), ont démontré que les vitamines C+E exercent un effet protecteur des GRs à l'égard du SO induit par le chlorhydrate de phénylhydrazine.

Il est à noter que l'hyperglycémie est considérée comme un facteur principal dans le développement des complications chroniques du diabète. Certains changements produits dans les GRs sont la glycation de l'Hb et des protéines membranaires. Aussi, l'un des facteurs contribuant à l'apparition des complications potentielles (macro et microvasculaires) est l'anomalie dans les propriétés physiques et biologiques des cellules sanguines (Pretorius *et al.*, 2015).

La figure 17 représente le taux de la metHb libérée par les GRs exposés à des SD et prétraités avec la combinaison des vitamines C+E. Les résultats montrent que ces sérums induisent une production de la metHb significativement élevée par rapport au témoin négatif qui atteint les (19,99%  $\pm$ 7,58). Cela indique que les SD ont exercés un dommage oxydatif important sur les GRs.

Le prétraitement par la combinaison des vitamines C+E, a révélé que ces molécules ont exercé un effet cytoprotecteur significatif par rapport au témoin positif, avec une inhibition de la formation de la metHb qui est de (11,23% $\pm$ 2,05).



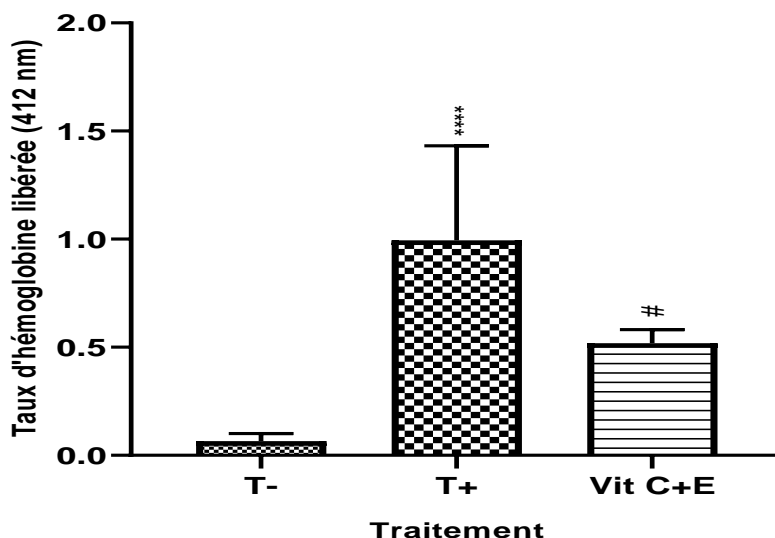
**Figure 17: Taux de la metHb libérée par les GRs exposés à des SD et prétraités avec les vitamines C+E.** T<sup>-</sup>: témoin négatif ; T<sup>+</sup>: témoin positif (SD) ; Vit C+E: vitamine C (0,1mg/ml), E : vitamine E-cyclodextrine (0,25mg/ml). \* : comparaison avec le T<sup>-</sup>. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD des différentes expérimentations (\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001). # : Comparaison avec le témoin positif. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD des différentes expérimentations (# p < 0,05 ; ## p < 0,01 ; ### p < 0,001).

Des études ont révélé que le SO provoque l'oxydation de l'Hb ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en metHb ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ce qui induit une dissociation des sous unités  $\alpha$  et  $\beta$ , avec la formation des inclusions appelées, corps de Heinz (Mameri *et al.*, 2021). Cela provoque la déformation de la membrane et contribue ainsi à la destruction importante des GRs (Claro *et al.*, 2006).

Aussi, une autre étude réalisée par Sadighara (2009) sur les GRs, a démontré que l'interaction des ERO avec l'Hb peut induire sa dénaturation. Cette dernière forme alors des agrégats qui se lient à la membrane cellulaire pour donner naissance aux corps de Heinz (Sadighara, 2009).

D'autres études ont démontré que les vitamines C et E peuvent réduire la formation de la metHb dans les GRs humains grâce à leurs potentiels de piéger les ERO et de protéger ainsi les cellules des dommages oxydatifs. De plus la vitamine C permet de recycler la vitamine E, donc la combinaison de vitamines C et E sont capables de protéger la membrane des GRs en atténuant le risque de l'hémolyse induite par la formation de la metHb (Atyabi *et al.*, 2012).

La figure 18 représente le taux de l'Hb libérée par les GRs exposés à des SD prétraités avec les vitamines C+E. Les résultats montrent que les valeurs de l'Hb libérée sont significativement élevées après traitement des GRs avec les SD ( $0,99\pm 0,43$ ). En effet les résultats obtenus après prétraitement des GRs avec les vitamines C+E montrent une protection significative contre la libération du contenu cellulaire en Hb induite par les SD ( $0,51\pm 0,06$ ).



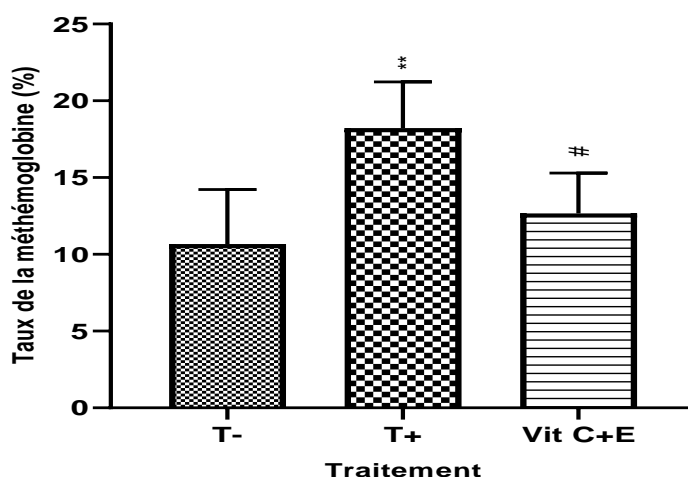
**Figure 18: Taux de l'Hb libérée par les GRs exposés à des SD et prétraités avec les vitamines C+E.** T<sup>-</sup>: témoin négatif ; T<sup>+</sup>: témoin positif (SD); Vit C+E: vitamine C (0,1mg/ml), E : vitamine E-cyclodextrine (0,25mg/ml). \*: comparaison avec le T<sup>-</sup>. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD des différentes expérimentations (\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001). # : Comparaison avec le témoin positif. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD des différentes expérimentations (# p < 0,05 ; ## p < 0,01 ; ### p < 0,001).

La figure 19 représente le taux de la metHb intracellulaire suite à l'exposition des GRs aux SD et co-incubés avec les vitamines C+E. Les résultats montrent que le taux de la metHb dans le témoin positif a été significativement élevé (18,21% $\pm$ 2,99) en comparaison au résultat obtenu avec le témoin négatif (10,66% $\pm$ 3,54), ce qui indique une exacerbation du SO à l'intérieur des GRs.

Il a été démontré qu'un taux élevé du glucose conduit à une glycation non enzymatique progressive de l'Hb formant ainsi de l'HbA1c (Coleman, 2000). Cette glycation est souvent associée à une génération des ERO et une atteinte des défenses antioxydantes (Coleman, 2001). En effet, le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène peuvent oxydées l'Hb (Fe<sup>2+</sup>) en metHb (Fe<sup>3+</sup>), qui est une forme anormale de l'Hb, rendant impossible le transport de l'oxygène par les GRs (Coleman, 2000).

Cependant, le prétraitement avec les vitamines C+E a prouvé que ces derniers ont exercé un effet cytoprotecteur significatif par rapport au témoin positif, avec une inhibition de la formation de la metHb qui est de (12,66% $\pm$ 2,62).





**Figure 19: Taux de la metHb à l'intérieur des GRs exposés à des SD et prétraités avec les vitamines C+E.** T<sup>-</sup> : témoin négatif ; T<sup>+</sup> : témoin positif (SD); Vit C+E: vitamine C (0,1mg/ml), E : vitamine E-cyclodextrine (0,25mg/ml). \*: comparaison avec le T<sup>-</sup>. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD des différentes expérimentations (\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001). # : Comparaison avec le témoin positif. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD des différentes expérimentations (# p < 0,05 ; ## p < 0,01 ; ### p < 0,001).

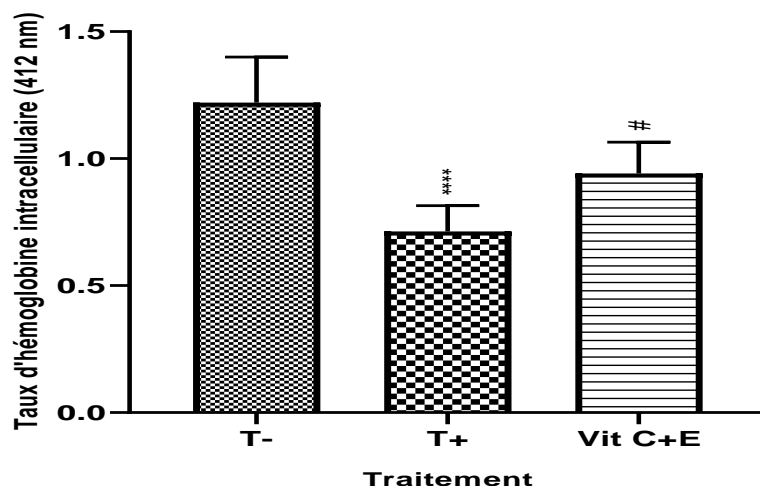
Ces résultats montrent une production importante de la metHb à l'intérieur des GRs après leurs expositions aux SD, ce qui indique un dommage oxydatif important et une oxydation de l'Hb en metHb par les ERO.

Les vitamines C et E agissent en synergie pour neutraliser les ERO. En effet, la vitamine E s'installe sur la membrane des GRs et empêche ainsi l'entrée des ERO tandis que, la vitamine C protège le milieu extracellulaire et garde la vitamine E sous sa forme réduite. Cela aboutit à la diminution de la formation de la metHb à l'intérieur de GR et par conséquent, la réduction du SO (Leverve, 2009; Landrier, 2011).

La figure 20 représente le taux de l'Hb à l'intérieur des GRs exposés à des SD et prétraités avec les vitamines C+E. Les résultats montrent que les valeurs de l'Hb intracellulaire s'opposent à celles de l'Hb libérée, une réduction très significative de l'Hb intracellulaire a été observée après traitement des GRs avec les SD ( $0,71 \pm 0,10$ ) en comparaison au témoin négatif ( $1,22 \pm 0,17$ ).

Le prétraitement des GRs avec les vitamines C+E révèle une cytoprotection très significative avec une teneur en Hb de ( $0,94 \pm 0,12$ ).

Contrairement aux résultats obtenus avec l'Hb libérée, les valeurs de l'Hb intracellulaire sont en corrélation avec les valeurs de concentrations cellulaires. En effet, les molécules à faible turbidité cellulaire ont enregistré une faible teneur en Hb intracellulaire et vice-versa.



**Figure 20 : Taux de l'Hb à l'intérieure des GRs exposés à des SD et prétraités avec les vitamines C+E.** T<sup>-</sup> : témoin négatif ; T<sup>+</sup> : témoin positif (SD) ; Vit C+E: vitamine C (0,1mg/ml), E : vitamine E-cyclodextrine (0,25mg/ml). \*: comparaison avec le T<sup>-</sup>. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD des différentes expérimentations (\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001). # : Comparaison avec le témoin positif. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD des différentes expérimentations (# p < 0,05 ; ## p < 0,01 ; ### p < 0,001).

Les quantités de l'Hb intracellulaire ajoutent une mesure supplémentaire au test de la metHb. D'ailleurs, des valeurs faibles en Hb intracellulaire indiquent une cytotoxicité membranaire sévère tandis qu'elles semblent être très importantes lorsque les cellules sont intactes.

Il est admis que le SD ayant un taux d'HbA1c élevée exerce un effet oxydant sur l'Hb et sur la membrane lipidique. Cela est justifié par la corrélation positive entre l'HbA1c et la glycémie (Alyassin, 1981).

Une étude réalisée par Moussa (2008) sur le SO chez les diabétiques, a démontré que ces patients subissent un SO important par rapport au contrôle (patients normoglycémiques). Ceci est expliqué par la production importante de la metHb chez ces patients diabétiques (Moussa, 2008). Par ailleurs, nos résultats obtenus du dosage de l'Hb et de la metHb intracellulaire sont en concordance avec les résultats de l'étude portée par Moussa (2008).

Le prétraitement des GRs avec les vitamines C+E montre une cytoprotection importante qui est révélée par des taux élevés en Hb. Cela suggère que ces molécules antioxydantes ont protégé l'Hb contre l'oxydation induite par les SD, ce qui a permis de garder les cellules sous leurs formes intactes (pas de lyse).

## V.2. Effet inhibiteur de la peroxydation lipidique induite par les sérums

Pour mieux comprendre l'effet oxydant des SD, nous avons utilisé un test qui détermine le degré de la peroxydation des lipides membranaires des GRs, à travers le dosage du taux des MDA.

La figure 21 représente le taux des MDA formé à partir des GRs exposés à des SD et prétraités avec les vitamines C+E. Les résultats montrent des taux de MDA significativement élevés après traitement des GRs avec le SD ( $0,33\pm 0,03$ ) en comparaison avec le témoin négatif ( $0,22\pm 0,03$ ). A partir de ces résultats, nous avons constaté un potentiel effet oxydant des SD sur la membrane des GRs (cytotoxicité membranaire). Cela peut être expliqué par l'oxydation des AGPI à travers les ERO produits suite à l'hyperglycémie chronique. Ce qui conduit finalement à une lyse membranaire libérant ainsi les constituants cellulaires des GRs.

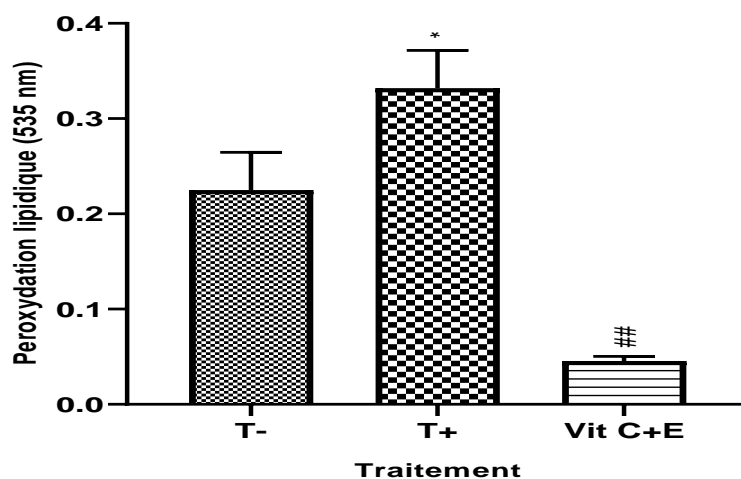
Il est admis que les GRs sont les cellules les plus vulnérables à l'oxydation à cause de leurs compositions membranaires très riches en AGPI, leurs environnements saturés en oxygène ainsi que la présence de métaux de transition tels que le fer et le cuivre (Çimen, 2008). En effet, l'attaque radicalaire des ERO capables d'arracher un hydrogène du carbone conjugué pour former un radical diène conjugué. Cette réaction est connue sous le nom de la peroxydation lipidique (formation de MDA), amplifiant ainsi l'effet des ERO et modifie les caractéristiques de cette molécule ce qui la rend plus hydrophile. Cette caractéristique aboutit à l'altération de la structure et de la fonction de la membrane (Piconi *et al.*, 2003). Ce phénomène se traduit cliniquement par l'apparition d'une anémie (Kabamba, 2016).

En effet, Il a été démontré que l'hyperglycémie induit une érythrocytotoxicité en engendrant des dommages considérables sur la membrane (Varashree and Bhat, 2011), ces résultats ont révélé que la peroxydation des lipides (taux de MDA) chez les

diabétiques était significativement plus élevée que celle enregistrée chez les personnes non diabétiques (groupe témoin).

En outre, des études antérieures ont signalé que certains phospholipides érythrocytaires sont modifiés chez des patients diabétiques. Ces altérations se traduisent par une agrégation des GRs, qui est un facteur risque indépendant dans le développement des complications vasculaires chez les patients diabétiques (Pretorius *et al.*, 2015).

Les résultats du prétraitement avec les vitamines C+E montrent un effet cytoprotecteur exprimé par une diminution très significative de la production des MDA ( $0,04 \pm 0,004$ ) en comparaison au résultat du témoin positif ( $0,33 \pm 0,03$ ).



**Figure 21: Le taux des MDA formés à partir des GRs exposés à des SD et prétraités avec les vitamines C+E.** T<sup>-</sup> : témoin négatif ; T<sup>+</sup> : témoin positif ; Vit C+E: vitamine C (0,1mg/ml), E : vitamine E-cyclodextrine (0,25mg/ml). \* : comparaison avec le T<sup>-</sup>. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD des différentes expérimentations (\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001). # : Comparaison avec le témoin positif. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD des différentes expérimentations (# p < 0,05 ; ## p < 0,01 ; ### p < 0,001).

Des études antérieures ont démontré que les vitamines C+E contribuent à la diminution de la peroxydation lipidique dont la vitamine E possède un caractère hydrophobe lui permettant de s'insérer dans la membrane où elle joue un rôle protecteur efficace en empêchant la formation des MDA induits par les ERO. Cependant, la vitamine C considérée aussi comme un donneur d'hydrogène aux radicaux tocophéroxyles, permet la régénération de la vitamine E (Landrier, 2011). Ces résultats

peuvent expliquer en partie les différentes observations obtenus dans notre étude et de soutenir l'intérêt de l'utilisation de l'association de ces deux vitamines.

## **Conclusion et perspectives**

## Conclusion et perspectives

Le diabète est une maladie métabolique qui est étroitement lié à un éventuel développement d'un SO, ce phénomène décrit une situation dans laquelle la cellule ne contrôle plus la présence excessive des ERO. Le but principal de ce travail consiste donc à évaluer *in vitro* l'effet cytoprotecteur de la combinaison des vitamines C et E sur les GRs humains, à l'égard du SO induite par les SD.

Notre approche expérimentale consiste, d'une part, à évaluer l'effet des SD sur les GRs humains et d'autre part, à étudier l'effet cytoprotecteur de la combinaison des vitamines C et E.

Au terme de notre travail, nous pouvons conclure que les SD sont responsables de l'induction d'un SO, qui exerce des effets délétères très remarquables sur les GRs conduisant à l'oxydation de l'Hb en metHb qui est considérée comme un nouveau biomarqueur et amplificateur du SO. En plus le SO favorise la perte de l'intégrité membranaire des GRs à travers la peroxydation lipidique.

Le prétraitement avec la combinaison des deux vitamines antioxydantes C et E a permis de protéger les GRs par la réduction de la formation de la metHb et de minimiser la peroxydation des lipides membranaires.

La découverte de nouvelles propriétés de combinaison de vitamines à savoir l'effet cytoprotecteur à l'égard du SO induit par le diabète, présente un intérêt majeur non seulement pour la mise au point de nouvelles thérapies conduisant au contrôle de la glycémie et d'autres complications mais aussi conduira à anéantir les dégâts oxydatifs engendrés sur les cellules et les biomolécules (Hb et lipides membranaires). De cette manière, nous allons vers l'amélioration de l'hygiène de vie des patients diabétiques. Il serait donc intéressant d'approfondir cette étude en testant d'autres antioxydants et aussi étudier leur effet notamment sur la machinerie enzymatique antioxydante des GRs.

# **Références bibliographiques**



## Références bibliographiques

- Abdul-Hamid, M., and Moustafa, N. (2014). Amelioration of alloxan-induced diabetic keratopathy by beta-carotene. *Experimental and toxicologic pathology*, 66(1), 49-59.
- Aguilera-Carbo, A., Augur, C., Prado-Barragan, L. A., Favela-Torres, E., and Aguilar, C. N. (2008). Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Applied microbiology and biotechnology*, 78(2), 189-199.
- Ahangarpour, A., Sayahi, M., and Sayahi, M. (2019). The antidiabetic and antioxidant properties of some phenolic phytochemicals: A review study. *Diabetes and metabolic syndrome: clinical research and reviews*, 13(1), 854-857.
- Ahmad, R., and Haque, M. (2021). Oral health messiers: Diabetes mellitus relevance. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*, 14, 3001.
- Alam, U., Asghar, O., Azmi, S., and Malik, R. A. (2014). General aspects of diabetes mellitus. *Handbook of clinical neurology*, 126, 211-222.
- Alyassin, D. (1981). A minor haemoglobin fraction and the level of fasting blood glucose. *Journal faculty medcin university. Baghdad*, 23, 373-380.
- Andrès, E., and Bicklé, J. (1999). Microangiopathie diabétique: de la physiopathologie au traitement. *Metabolismes hormones nutrition 1*, 4-10.
- Asmat, U., Abad, K., and Ismail, K. (2016a). Diabetes mellitus and oxidative stress. *Saudi pharmaceutical journal*, 24(5), 547-553.
- Asmat, U., Abad, K., and Ismail, K. (2016b). Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi pharmaceutical journal*, 24(5), 547-553.
- Atyabi, N., Yasini, S. P., Jalali, S. M., and Shaygan, H. (2012). *Antioxidant effect of different vitamins on methemoglobin production: An in vitro study*. Paper presented at the Veterinary research forum.
- Auberval, N. (2010). *Prévention du stress oxydant dans le diabète et ses complications par des antioxydants d'origine naturelle*. Strasbourg.
- Bendich, A., Machlin, L., Scandurra, O., Burton, G., and Wayner, D. (1986). The antioxidant role of vitamin C. *Advances in Free Radical Biology & Medicine*, 2(2), 419-444.
- Bensakhria, A. (2018). Le stress oxydatif. *Toxicologie générale*, 70-86.
- Çimen, M. B. (2008). Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica chimica acta*, 390(1-2), 1-11.

- Claro, L. M., Leonart, M. S. S., Comar, S. R., and do Nascimento, A. J. (2006). Effect of vitamins C and E on oxidative processes in human erythrocytes. *Cell biochemistry and function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, 24(6), 531-535.
- Coleman, M. D. (2000). Use of in vitro methaemoglobin generation to study antioxidant status in the diabetic erythrocyte. *Biochemical pharmacology*, 60(10), 1409-1416.
- Coleman, M. D. (2001). Monitoring diabetic antioxidant status: a role for in vitro methaemoglobin formation. *Environmental toxicology and pharmacology*, 10(4), 207-213.
- Coleman, M. D., and Walker, C. L. (1999). Effects of oxidised a-lipoic acid and a-tocopherol on xenobiotic-mediated methaemoglobin formation in diabetic and non-diabetic human erythrocytes in-vitro. *Environmental toxicology and pharmacology*, 8(2), 127-132.
- Debbab, L. (2021). Le diabète de type 2 à l'île de la Réunion: un enjeu majeur de santé publique.
- Drouin, P., Blicke, F., Charbonnel, B., Eschwege, E., Plouin, F and Sauvanet, J. (1999). Diagnostic et classification du diabète sucré les nouveaux critères. *Diabetes and metabolism (Paris)*, 25, 72-83.
- Efstathiou, T., and Christian, N. (2008). Analyse des polysaccharides.
- Fabre, G., Bayach, I., Berka, K., Paloncýová, M., Starok, M., Rossi, C., Duroux, J.-L., Otyepka, M., and Trouillas, P. (2015). Synergism of antioxidant action of vitamins E, C and quercetin is related to formation of molecular associations in biomembranes. *Chemical communications*, 51(36), 7713-7716.
- Faure, P. (2003). Protective effects of antioxidant micronutrients (vitamin E, zinc and selenium) in type 2 diabetes mellitus.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108(10), 863-832.
- Flora, S., Mittal, M., and Mehta, A. (2008). Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. *Indian journal of medical research*, 128(4), 501.
- Forouhi, N. G., and Wareham, N. J. (2010). Epidemiology of diabetes. *Medicine*, 38(11), 602-606.
- Forouhi, N. G., and Wareham, N. J. (2019). Epidemiology of diabetes. *Medicine*, 47(1), 22-27.

- Gardès-Albert, M. (2006). *Aspects physico-chimiques des espèces réactives de l'oxygène*. Paper presented at the Annales pharmaceutiques françaises.
- Gaucher, C. (2007). *Relations cellules endothéliales/substituts sanguins: implication des contraintes de cisaillement ou de l'hypoxie, et évaluation de la cytotoxicité d'hémoglobines de nouvelle génération*. Université Henri Poincaré-Nancy 1.
- Giacco, F., and Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research*, 107(9), 1058-1070.
- Gillery, P. (2001). Produits avancés de glycation (AGE), radicaux libres et diabète. *Journal de la société de biologie*, 195(4), 387-390.
- Gning, S., Thiam, M., Fall, F., Ba-Fall, K., Mbaye, P., and Fourcade, L. (2007). Le diabète sucré en Afrique subsaharienne. Aspects épidémiologiques, difficultés de prise en charge. *Médecine tropicale*, 67(6), 607-611.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., Charlier, C., and Chapelle, J.-P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-638.
- Ighodaro, O. M. (2018). Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomedicine and pharmacotherapy*, 108, 656-662.
- Jaisson, S., and Gillery, P. (2018). Les produits de glycation avancée des protéines. *Revue francophone des laboratoires*, 2018(502), 48-55.
- Kabamba, A. (2016). *Profil du stress oxydatif chez les diabétiques de type 2 à Lubumbashi: Paramètres biologiques de routine indicateurs du stress oxydatif*: Éditions universitaires européennes.
- Kangralkar, V., Patil, S. D., and Bandivadekar, R. (2010). Oxidative stress and diabetes: a review. *Journal international des applications pharmaceutiques*, 1(1), 38-45.
- Khan, A. N., Khan, R. A., Ahmad, M., and Mushtaq, N. (2015). Role of antioxidant in oxidative stress and diabetes mellitus. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*, 3(6), 217-220.
- Laher, I. (2011). Diabetes and alpha lipoic acid. *Frontiers in pharmacology*, 2, 69.
- Landrier, J.-F. (2011). Vitamine E et physiologie du tissu adipeux. *Oléagineux, corps gras, lipides*, 18(2), 83-87.
- Lecerf, J., Luc, G., and Fruchart, J. (1994). Vitamine E, antioxydants et athérosclérose. *La Revue de médecine interne*, 15(10), 641-649.
- Leverve, X. (2009). Stress oxydant et antioxydants? *Cahiers de nutrition et de diététique*, 44(5), 219-224.

- Mameri, A., Bournine, L., Mouni, L., Bensalem, S., and Iguer-Ouada, M. (2021). Oxidative stress as an underlying mechanism of anticancer drugs cytotoxicity on human red blood cells' membrane. *Toxicology in vitro*, 72, 105-106.
- Maritim, A., Sanders, a., and Watkins Iii, J. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 17(1), 24-38.
- Migdal, C., and Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27(4), 405-412.
- Mohan, Y., Jesuthankaraj, G. N., and Ramasamy Thangavelu, N. (2013). Antidiabetic and antioxidant properties of *Triticum aestivum* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Advances in pharmacological sciences*, 2013.
- Moussa, S. (2008). Oxidative stress in diabetes mellitus. *Biophysics group, department of biochemistry, national research centre, dokki, Cairo, Egypt, romanian J. biophys*, 18(3), 225-236.
- Naziroğlu, M., and Butterworth, P. J. (2005). Protective effects of moderate exercise with dietary vitamin C and E on blood antioxidative defense mechanism in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Canadian journal of applied physiology*, 30(2), 172-185.
- Pazdro, R., and Burgess, J. R. (2010). The role of vitamin E and oxidative stress in diabetes complications. *Mechanisms of ageing and development*, 131(4), 276-286.
- Piconi, L., Quagliari, L., and Ceriello, A. (2003). Oxidative stress in diabetes.
- Poitout, V., Tanaka, Y., Reach, G., and Robertson, R. (2001). Stress oxydatif, insulinosécrétion, et insulinoresistance. *Journées annuelles de diabetologie de l'hotel dieu*, 75-86.
- Pretorius, E., Bester, J., Vermeulen, N., Alummoottil, S., Soma, P., Buys, A. V., and Kell, D. B. (2015). Poorly controlled type 2 diabetes is accompanied by significant morphological and ultrastructural changes in both erythrocytes and in thrombin-generated fibrin: implications for diagnostics. *Cardiovascular diabetology*, 14(1), 1-20.
- Ramachandran, S., Asokkumar, K., Uma Maheswari, M., Ravi, T., Sivashanmugam, A., Saravanan, S., Rajasekaran, A., and Dharman, J. (2010). Investigation of antidiabetic, antihyperlipidemic, and in vivo antioxidant properties of *Sphaeranthus indicus* Linn. in type 1 diabetic rats: an identification of possible biomarkers. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2011.

- Rodier, M. (2001). Définition et classification du diabète. *Médecine nucléaire-imagerie fonctionnelle et métabolique*, 25(2), 91.
- Roussel, A.-M. (2014). Éléments-trace (zinc, sélénium, chrome, fer), syndrome métabolique et diabète de type 2. *Médecine des maladies métaboliques*, 8(5), 489-493.
- Sadighara, P. (2009). RBC: Tool for oxidant agents screening test. *Australian journal of basic and applied science*, 3(3), 2970-2973.
- Seo, K. I., Choi, M. S., Jung, U. J., Kim, H. J., Yeo, J., Jeon, S. M., and Lee, M. K. (2008). Effect of curcumin supplementation on blood glucose, plasma insulin, and glucose homeostasis related enzyme activities in diabetic *Molecular nutrition and food research*, 52(9), 995-1004.
- Spinas, G., and Lehmann, R. (2001). *Diabète sucré: Diagnostic, classification et pathogénèse*. Paper presented at the Forum Med Suisse.
- Tenenbaum, M., Bonnefond, A., Froguel, P., and Abderrahmani, A. (2018). Physiopathologie du diabète. *Revue francophone des laboratoires*, 2018(502), 26-32.
- Vanderijst, J.-F., Debiève, F., Doucet, F., Emonts, P., Haumont, S., Hubinont, C., Kirkpatrick, C., Philips, J.-C., Pintiaux, A., and Rousseau, P. (2012). Stratégie de dépistage et critères diagnostiques du diabète gestationnel. Propositions du GGOLF. *Rev Med Brux*, 33, 97-104.
- Varashree, B., and Bhat, G. P. (2011). Correlation of lipid peroxidation with glycated haemoglobin levels in diabetes mellitus. *Online journal of health and allied sciences*, 10(2).
- Wang, Y., Yang, P., Yan, Z., Liu, Z., Ma, Q., Zhang, Z., Wang, Y., and Su, Y. (2021). The relationship between erythrocytes and diabetes mellitus. *Journal of diabetes research*, 2021.
- Zhang, T., Gao, J., Jin, Z.-Y., Xu, X.-M., and Chen, H.-Q. (2014). Protective effects of polysaccharides from *Lilium lancifolium* on streptozotocin-induced diabetic mice. *International journal of biological macromolecules*, 65, 436-440.

## Résumé

Le diabète sucré se caractérise par des niveaux élevés du glucose dans le sang connu sous le terme d'hyperglycémie. Cette hyperglycémie est associée à long terme à des complications dont le stress oxydant (SO). Ce SO est le résultat d'une production excessive des espèces réactives de l'oxygène (ERO) via différentes voies. L'objectif de notre travail consiste, d'une part, à étudier l'impact des SD sur les globules rouges (GRs) humains *in vitro*, d'autre part, à évaluer l'effet cytoprotecteur de la combinaison des vitamines C et E. Pour cela, la cytotoxicité a été évaluée par la détermination de l'hémolyse par la mesure de la concentration cellulaire ainsi que le dosage de l'hémoglobine (Hb) et de la méthémoglobine (metHb) libérée et intracellulaire. Aussi l'évaluation du SO à travers le dosage des produits de la peroxydation lipidique, les malondialdéhydes (MDA). Les SD ont exercé un effet délétère très significatif ( $0,28 \pm 0,009$ ) sur les GRs traduit par une hémolyse. Cependant, les vitamines C et E exercent un effet cytoprotecteur à l'égard des SD avec une concentration cellulaire qui est de ( $0,43 \pm 0,11$ ). Le taux de la metHb a été significativement réduit ( $11,23\% \pm 2,05$ ) dans la condition de vitamines C et E. Le taux des MDA produits suite à l'oxydation des lipides membranaire des GRs par les SD a été amplifié ( $0,33 \pm 0,03$ ). Cette peroxydation des lipides a été réduite à un taux de ( $0,04 \pm 0,004$ ) suite au prétraitement des GRs par la combinaison des vitamines C+E. A l'avenir, il serait intéressant d'explorer davantage cette étude en utilisant d'autres antioxydants qui permettront d'assurer une meilleure protection des globules rouges afin de prévenir les complications liées au diabète (notamment le SO) et de minimiser ainsi le SO. Il serait aussi intéressant d'étudier leur effet notamment sur la machinerie enzymatique antioxydante des GRs.

**Mots clés:** Diabète, globules rouges, stress oxydant, méthémoglobine, peroxydation lipidique, cytoprotection, vitamines C+E.

## Abstract

Diabetes mellitus is characterized by high blood glucose levels known as hyperglycemia. This hyperglycemia is associated with long-term complications including oxidative stress (OS). This OS is the result of excessive production of reactive oxygen species (ROS) through different pathways. The objective of this work is, on the one hand, to study the impact of DS on human red blood cells *in vitro*, on the other hand, to evaluate the cytoprotective effect of combined vitamins C and E. For this, the cytotoxicity was evaluated by the determination of hemolysis by measurement of cellular concentration, released and intracellular hemoglobin (Hb) and methemoglobin (metHb). Also the evaluation of OS through the quantification of lipid peroxidation products, malondialdehydes (MDA). The DS exerted a very significant deleterious effect ( $0.28 \pm 0.009$ ) on the RBCs resulted in a hemolysis. However, the vitamins C and E induce a cytoprotective effect against the DS with cell concentration value ( $0.43 \pm 0.11$ ). The metHb rate was significantly reduced ( $11.23\% \pm 2.05$ ) in the vitamin C and E condition. The MDA level produced following the oxidation of lipids membrane of RBCs by the DS was amplified ( $0.33 \pm 0.03$ ). This lipid peroxidation was reduced to ( $0.04 \pm 0.004$ ) after RBC pretreatment with the combined vitamin C and E. In the future, it would be interesting to further explore this study using other antioxidants that will ensure better protection of RBCs in order to prevent diabetes complications (especially the OS) and thus minimize OS. Also it would be interesting to study their effect, in particular on the antioxidant enzymatic machinery of RBCs.

**Key words:** Diabetes, red blood cells, oxidative stress, methemoglobin, lipid peroxidation, cytoprotection, vitamins C+E.

## ملخص

يتميز داء السكري بارتفاع مستويات الجلوكوز في الدم المعروف باسم ارتفاع السكر في الدم، ويرتبط هذا الارتفاع بمضاعفات طويلة الأمد بما في ذلك الإجهاد التأكسدي (OS). هذا SO هو نتيجة الإنتاج المفرط لأنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) عبر مسارات مختلفة. الهدف من عملنا، من ناحية، هو دراسة تأثير SD على خلايا الدم الحمراء البشرية في المختبر، من ناحية أخرى، لتقييم التأثير الوقائي الخلوي لمزيج من فيتامينات C و E. لهذا الغرض، السمية الخلوية تم تقييم انحلال الدم عن طريق قياس التركيز الخلوي وكذلك فحص الهيموغلوبين (Hb) والميثيموغلوبين (metHb) المنطلق وداخل الخلايا وكذلك تقييم SO من خلال منتجات فحص بيروكسيد الدهون (MDA)، أثرت SDs تأثيراً ضاراً معنوياً ( $0.28 \pm 0.009$ ) على كرات الدم الحمراء المترجمة عن طريق انحلال الدم، ومع ذلك، فإن مضادات الأكسدة C و E لها تأثير واقٍ للخلايا ضد SD بتركيز خلوي يبلغ ( $0.43 \pm 0.11$ ). تم تخفيض مستوى metHb بشكل كبير ( $11.23\% \pm 2.05$ ) في حالة مضادات الأكسدة C و E. تم تضخيم مستوى MDAs الناتج بعد أكسدة دهون غشاء كرات الدم الحمراء بواسطة ( $0.33 \pm 0.03$ ). تم تقليل بيروكسيد الدهون هذا إلى معدل ( $0.04 \pm 0.004$ ) بعد المعالجة الأولية لـ RBC مع تركيبة C + E. في المستقبل، سيكون من المثمر للاهتمام مواصلة استكشاف هذه الدراسة باستخدام مضادات الأكسدة الأخرى التي ستضمن حماية أفضل لخلايا الدم الحمراء من أجل منع المضاعفات المرتبطة بمرض السكري (خاصة SO) وبالتالي تقليل SO. سيكون من المثمر للاهتمام أيضاً دراسة تأثيرها، لا سيما على الآلية الأنزيمية المضادة للأكسدة لكرات الدم الحمراء.

**الكلمات المفتاحية:** داء السكري، كريات الدم الحمراء، الإجهاد التأكسدي، ميثيموغلوبين، بيروكسيد الدهون، حماية الخلايا، فيتامينات C + E.

## Résumé

Le diabète sucré se caractérise par des niveaux élevés du glucose dans le sang connu sous le terme d'hyperglycémie. Cette hyperglycémie est associée à long terme à des complications dont le stress oxydant (SO). Ce SO est le résultat d'une production excessive des espèces réactives de l'oxygène (ERO) via différentes voies. L'objectif de notre travail consiste, d'une part, à étudier l'impact des SD sur les globules rouges (GRs) humains *in vitro*, d'autre part, à évaluer l'effet cytoprotecteur de la combinaison des vitamines C et E. Pour cela, la cytotoxicité a été évaluée par la détermination de l'hémolyse par la mesure de la concentration cellulaire ainsi que le dosage de l'hémoglobine (Hb) et de la méthémoglobine (metHb) libérée et intracellulaire. Aussi l'évaluation du SO à travers le dosage des produits de la peroxydation lipidique, les malondialdéhydes (MDA). Les SD ont exercé un effet délétère très significatif ( $0,28 \pm 0,009$ ) sur les GRs traduit par une hémolyse. Cependant, les vitamines C et E exercent un effet cytoprotecteur à l'égard des SD avec une concentration cellulaire qui est de ( $0,43 \pm 0,11$ ). Le taux de la metHb a été significativement réduit ( $11,23\% \pm 2,05$ ) dans la condition de vitamines C et E. Le taux des MDA produits suite à l'oxydation des lipides membranaire des GRs par les SD a été amplifié ( $0,33 \pm 0,03$ ). Cette peroxydation des lipides a été réduite à un taux de ( $0,04 \pm 0,004$ ) suite au prétraitement des GRs par la combinaison des vitamines C+E. A l'avenir, il serait intéressant d'explorer davantage cette étude en utilisant d'autres antioxydants qui permettront d'assurer une meilleure protection des globules rouges afin de prévenir les complications liées au diabète (notamment le SO) et de minimiser ainsi le SO. Il serait aussi intéressant d'étudier leur effet notamment sur la machinerie enzymatique antioxydante des GRs.

**Mots clés:** Diabète, globules rouges, stress oxydant, méthémoglobine, peroxydation lipidique, cytoprotection, vitamines C+E.

## Abstract

Diabetes mellitus is characterized by high blood glucose levels known as hyperglycemia. This hyperglycemia is associated with long-term complications including oxidative stress (OS). This OS is the result of excessive production of reactive oxygen species (ROS) through different pathways. The objective of this work is, on the one hand, to study the impact of DS on human red blood cells *in vitro*, on the other hand, to evaluate the cytoprotective effect of combined vitamins C and E. For this, the cytotoxicity was evaluated by the determination of hemolysis by measurement of cellular concentration, released and intracellular hemoglobin (Hb) and methemoglobin (metHb). Also the evaluation of OS through the quantification of lipid peroxidation products, malondialdehydes (MDA). The DS exerted a very significant deleterious effect ( $0.28 \pm 0.009$ ) on the RBCs resulted in a hemolysis. However, the vitamins C and E induce a cytoprotective effect against the DS with cell concentration value ( $0.43 \pm 0.11$ ). The metHb rate was significantly reduced ( $11.23\% \pm 2.05$ ) in the vitamin C and E condition. The MDA level produced following the oxidation of lipids membrane of RBCs by the DS was amplified ( $0.33 \pm 0.03$ ). This lipid peroxidation was reduced to ( $0.04 \pm 0.004$ ) after RBC pretreatment with the combined vitamin C and E. In the future, it would be interesting to further explore this study using other antioxidants that will ensure better protection of RBCs in order to prevent diabetes complications (especially the OS) and thus minimize OS. Also it would be interesting to study their effect, in particular on the antioxidant enzymatic machinery of RBCs.

**Key words:** Diabetes, red blood cells, oxidative stress, methemoglobin, lipid peroxidation, cytoprotection, vitamins C+E.

## ملخص

يتميز داء السكري بارتفاع مستويات الجلوكوز في الدم المعروف باسم ارتفاع السكر في الدم، ويرتبط هذا الارتفاع بمضاعفات طويلة الأمد بما في ذلك الإجهاد التأكسدي (OS). هذا SO هو نتيجة الإنتاج المفرط لأنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) عبر مسارات مختلفة. الهدف من عملنا، من ناحية، هو دراسة تأثير SD على خلايا الدم الحمراء البشرية في المختبر، من ناحية أخرى، لتقييم التأثير الوقائي الخلوي لمزيج من فيتامينات C و E. لهذا الغرض، السمية الخلوية تم تقييم انحلال الدم عن طريق قياس التركيز الخلوي وكذلك فحص الهيموغلوبين (Hb) والميثيموغلوبين (metHb) المنطلق وداخل الخلايا وكذلك تقييم SO من خلال منتجات فحص بيروكسيد الدهون (MDA)، أثرت SDs تأثيراً ضاراً معنوياً ( $0.28 \pm 0.009$ ) على كرات الدم الحمراء المترجمة عن طريق انحلال الدم، ومع ذلك، فإن مضادات الأكسدة C و E لها تأثير واقى للخلايا ضد SD بتركيز خلوي يبلغ ( $0.43 \pm 0.11$ ). تم تخفيض مستوى metHb بشكل كبير ( $11.23\% \pm 2.05$ ) في حالة مضادات الأكسدة C و E. تم تضخيم مستوى MDAs الناتج بعد أكسدة دهون غشاء كرات الدم الحمراء بواسطة ( $0.33 \pm 0.03$ ). تم تقليل بيروكسيد الدهون هذا إلى معدل ( $0.04 \pm 0.004$ ) بعد المعالجة الأولية لـ RBC مع تركيبة C + E. في المستقبل، سيكون من المثير للاهتمام مواصلة استكشاف هذه الدراسة باستخدام مضادات الأكسدة الأخرى التي ستضمن حماية أفضل لخلايا الدم الحمراء من أجل منع المضاعفات المرتبطة بمرض السكري (خاصة SO) وبالتالي تقليل SO. سيكون من المثير للاهتمام أيضاً دراسة تأثيرها، لا سيما على الآلية الأنزيمية المضادة للأكسدة لكرات الدم الحمراء.

**الكلمات المفتاحية:** داء السكري، كريات الدم الحمراء، الإجهاد التأكسدي، ميثيموغلوبين، بيروكسيد الدهون، حماية الخلايا، فيتامينات C + E.