

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
**Université A. MIRA –Bejaïa**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département Biologie physico-chimique**  
**Spécialité Biochimie fondamentale**



Réf : .....

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**

**Thème**

**Étude de l'impact du diabète non contrôlé sur le stress oxydatif  
généralisé par les érythrocytes**

Présenté par :

**BELABBAS Yasmine Mouna & BELGASSEMI Yasmina**

Soutenue le : **22/09/2021**

**Devant le jury composé de :**

Mme. BEDJOU-NASRI F.	Professeur	Présidente
Mme. BENSALÉM-BOURNINE S.	MCA	Promotrice
Mme. AIT ALI D.	MCB	Examinatrice

**Année universitaire : 2020/2021**

# *Remerciements*

- A l'achèvement de notre modeste mémoire, nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH LE TOUT PUISSANT, qui nous a donné la santé et la volonté pour aller jusqu'à issue.
- Notre sincère gratitude va à notre promotrice, Mme BENSALÉM, en l'occurrence, qui avant tout a bien voulu nous encadrer, nous a guidé tout au long de la réalisation de ce travail et a fait preuve de disponibilité et de patience en dépit de ses responsabilités.
- Nous tenons également à témoigner notre gratitude à Monsieur BOURNINE pour ses précieux conseils et ses encouragements.
- Nous adressons également nos remerciements à Madame BEDDOU, qui a été présente pour nous à chaque sollicitation.
- Nous signifions toute notre reconnaissance aux membres du Jury, Mme BEDJOU et Mme AIT ALI qui nous ont fait honneur de par leur présence à l'effet d'évaluer notre modeste travail
- Nous ne manquons pas d'adresser nos remerciements au professeur IGUER-OUADA pour ses orientations et l'aide qu'il nous a apporté.
- Nous n'oublions pas de remercier l'ensemble du personnel du laboratoire du bloc 12 et 9.
- Nous adressons par la même occasion nos vifs remerciements au collectif des travailleurs (ses) relevant de la clinique des diabétiques de beau séjour de Béjaïa.
- Merci infiniment pour Madame DJOUAD Nassima et Mlle SADELLI Kenza qui nous ont apporté main forte.

*Mille et un merci à toutes et à tous*

# *Dédicaces*

*À ma chère mère Hassina, à mon cher père Boualem*

Qui m'ont doté d'une éducation digne pour leurs efforts,  
Sacrifices, prévenance et magnifique modèle de labeur qui m'ont donné juste pour que je  
Puisse réaliser mes rêves. Mes parents source de vie d'amour et d'affection.

*À mes chers frères Abdnour Abdelghani Lyes Lotfi, à mes chères sœurs Zoubida  
Sabrina Lamia*

Qui m'avez toujours soutenu et encouragé et surtout pour leurs patiences  
Infinies durant ces années d'études.

*À mon futur mari Kamel*

L'homme de mes rêves mon précieux offre de dieu que je trouve toujours  
A mes côtés pour m'aider me motiver et me supporté dans les moments difficiles

*À mes chers neveux et chères nièces Yasser Wassim Ritedj Hichem Abdrahman  
Sidra Djana*

Source de joie et de bonheur votre présence à la demeure me remonte le moral et m'expurge  
la fatigue du jour dieux vous garde pour moi

*À mes chères belles sœurs Razika Wassila Sarah,*

*À mon binôme Yasmine*

Chère amie avant d'être binôme, pour sa patience et sa compréhension tout au long de ce  
projet, pour les moments bons et dure qu'on a passé ensemble

*À mes chères amies Lynda Nicette Lilia Khalida Imene*

*À tous mes voisins voisines cousines et cousins exceptionnellement Abdnour Kadi*

*B. Yasmina*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail,*

*À mon cher papa Djamal Fddine et à ma chère et tendre maman Nadia,*

Qui ont œuvré à l'effet de m'offrir le meilleur pour mon épanouissement et mon bien-être, ils n'ont pas manqué de réunir pour ma réussite, tout au long de mon cursus scolaire et universitaire, les conditions les plus favorables. Pour l'amour dont ils ont fait preuve, les sacrifices, la confiance, leur soutien moral, leur affection, leurs précieux encouragements et conseils, pour toutes les valeurs et les principes qu'ils ont su m'inculquer ainsi que les bonnes manières qu'ils m'ont transmises.

*À mes sœurs adorées Lyna & Saloua*

Pour leur tendresse, leur complicité, leur présence, leur soutien, leurs encouragements et pour toute l'aide qu'elles ont pu m'apporter.

*À mes chers cousins Selma, Kawthar, Amina, Zakaria & Djouhar*

Pour leur soutien et leurs encouragements pour aller de l'avant.

*À mes chères tantes Zohra et Baya*

Qui m'ont soutenu sans faille avec leurs invocations.

*À ma chère amie Kenza*

Pour sa précieuse aide, son soutien, ses encouragements, sa patience et sa présence.

*À ma chère binôme Yasmina*

Pour son travail, sa patience, sa confiance et pour ses efforts.

*À mes chères amies Jhaaldjets et Bouchra*

Pour leurs encouragements, leur présence, leurs conseils et toute l'aide qu'elles ont pu m'apporter

*B. Yasmine Mouna*

## Liste des abréviations

**ABTS** : Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)

**ACD** : Acidocétose diabétique

**AG** : Acide gras

**Ag** : Antigène

**AGE** : Produit final de glycation avancée

**AGPI** : Acide gras poly-insaturés

**AO** : Antioxydant

**CAT** : Catalase

**DAG** : Diacylglycérol

**DHA-3-P** : Dihydroxyacetate-3-phosphate

**DID** : Diabète insulino dépendant

**DNID** : Diabète non insulino dépendant

**EDTA** : Acide éthylène diamine tetraacétique

**EHH** : Etat d'hyperglycémie hyperosmolaire

**ERO** : Espèce réactive de l'oxygène

**F-6-P** : Fructose-6-phosphate

**G-6-P** : Glucose-6-phosphate

**G6PD** : Glucose-6-phosphate déshydrogénase

**GAP** : Glyceraldehyde-3-phosphate

**GAPDH** : Glyceraldehyde-3-déshydrogénase

**GFAT** : Glucosamine fructose 6-phosphate aminotransférase

**GLY-3-P** : Glycérol-3-phosphate

**GPX** : Glutathion peroxydase

**GR** : Globule rouge

**GRX** : Glutathion réductase

**GSH** : Glutathion

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène

**Hb** : Hémoglobine

**AL** : Acide lipoïque

**MetHb** : Méthémoglobine

**NAC** : N-acetylcysteine

**NAD** : Nicotinamide di nucléotide

**NADPH** : Nicotinamide adénine di nucléotide phosphate

**NLRP3** : Domaine d'oligomérisation de liaison de nucléotides

**NOX4** : Nicotinamide adénine nucléotide phosphate oxydase 4

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : Radical anion superoxyde

**•OH** : Ion hydroxyl

**PARP-1** : Poly- ADP-ribose polymérase-1

**PKC** : Protéine kinase C

**Q10** : Coenzyme CoQ10

**RAGE** : Récepteurs d'AGE

**RE** : Réticulum endoplasmique

**RI** : Réaction inflammatoire

**SDH** : Sorbitol déshydrogénase

**SO** : Stress oxydant

**SOD** : Superoxyde dismutase

**TNF**: Tumor necrosis factor

**UDP-GLC NAc** : Uridine diphosphate N acetyl glucosamine

**XO** : Xanthine oxydase

**Liste des tableaux**

**Tableau I** : Les différents types d'espèces réactives de l'oxygène.....9

**Tableau II** : Biomarqueurs du stress oxydant.....14

**Tableau III** : Quelques tests utilisés pour la mesure de la CAG du plasma.....19

**Liste des figures**

**Figure 1 :** Production des ERO lors du transport d'électron au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie.....10

**Figure 2 :** Les différentes voies moléculaires associées au stress oxydant chez les patients diabétiques.....11

**Figure 3 :** Structure moléculaire de l'hémoglobine.....16

**Figure 4 :** Les différentes liaisons de l'Hb.....16

**Figure 5 :** Etats conformationnels de l'hémoglobine.....17

**Figure 6 :** Schéma général de la formation de la MetHb.....18

**Figure 7 :** Protocole de séparation du sang total.....21

**Figure 8 :** Protocole de la mesure du statu antioxydant total chez les patients diabétiques.....22



## **Table des matières**

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>I. Le diabète .....</b>	<b>3</b>
<b>I.1. Généralités sur le diabète .....</b>	<b>3</b>
I.1.1. Définition du diabète .....	3
I.1.2. Type de diabète .....	3
I.1.2.1. Diabète type 1 .....	3
I.1.2.2. Diabète type 2 .....	3
I.1.2.3. Diabète gestationnel.....	3
I.1.2.4. Autres types de diabète .....	4
I.1.3. Complications du diabète .....	4
I.1.3.1. Complications métaboliques aiguës .....	4
I.1.3.2. Complications chroniques .....	5
I.1.4. Méthodes de diagnostic et bilans de patients diabétiques .....	6
I.1.4.1. Glycémie à jeun .....	6
I.1.4.2. Hémoglobine glyquée .....	6
I.1.4.3. Bilan rénal.....	6
I.1.4.4. Bilan lipidique .....	7
I.1.4.5. Acide urique .....	8
<b>II. Stress oxydant et diabète .....</b>	<b>9</b>
<b>II.1. Le stress oxydant .....</b>	<b>9</b>
<b>II.2. Les espèces réactives de l’oxygène .....</b>	<b>9</b>
II.2.1. Sources de production d’espèces réactives de l’oxygène .....	9
II.2.1.1. Sources endogènes de production d’espèces réactives de l’oxygène.....	10
II.2.1.2. Sources exogènes de production d’espèces réactives de l’oxygène.....	10
<b>II.3. Physiopathologie du stress oxydant dans le diabète.....</b>	<b>11</b>
<b>II.4. Voies moléculaires associées au stress oxydant chez les patients diabétiques .....</b>	<b>11</b>
II.4.1. Voie d'oxydation du glucose .....	11
II.4.2. Voie des produits finaux de glycation avancée.....	12
II.4.3. Voie d'activation de la PKC .....	12
II.4.4. Voie des hexosamines .....	13
II.4.5. Voie des polyols.....	13
<b>II.5. Biomarqueurs du stress oxydant dans le diabète sucré .....</b>	<b>14</b>

---

<b>II.6. Modèle d'étude du stress oxydant chez les diabétiques</b> .....	<b>14</b>
II.6.1. Le sang .....	14
II.6.2. Le sérum.....	15
II.6.3. Les érythrocytes .....	15
II.6.3.1. Fonctions des globules rouges.....	15
II.6.3.2. L'hémoglobine .....	15
II.6.3.3. La méthémoglobine.....	17
<b>II.7. Evaluation biologique du stress oxydant en routine clinique</b> .....	<b>18</b>
<b>II.8. Systèmes de défense antioxydants</b> .....	<b>19</b>
II.8.1. Les antioxydants .....	19
II.8.1.1. Mécanismes d'action des antioxydants .....	19
<b>III. Matériel et méthodes</b> .....	<b>20</b>
<b>III.1. Matériel</b> .....	<b>20</b>
III.1.1. Appareils utilisés .....	20
III.1.2. Produits et réactifs utilisés .....	20
III.1.3. Echantillonnage .....	20
<b>III.2. Méthodes</b> .....	<b>20</b>
III.2.1. Sélection et étude clinique des patients diabétiques .....	20
III.2.2. Collecte et séparation du sang total .....	20
III.2.3. Mesure des paramètres hématologiques .....	21
III.2.3.1. Mesure du taux de l'hémoglobine glyquée .....	21
III.2.3.2. Mesure de l'hémoglobine intacte .....	21
III.2.3.3. Mesure de la Méthémoglobine.....	21
III.2.4. Evaluation du statut antioxydant total .....	22
<b>III.3. Analyse statistique</b> .....	<b>23</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>24</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>25</b>



# **Introduction**

## **Introduction**

Le diabète est un trouble de l'assimilation, de l'utilisation et du stockage des sucres apportés par l'alimentation. Cela, se traduit par un taux de glucose élevé dans le sang appelé hyperglycémie. Cette dernière peut à long terme provoquer des lésions de certains tissus à savoir : les yeux, les reins, les nerfs et les vaisseaux sanguins. La pathologie diabétiques se manifeste quand la glycémie à jeun est supérieure ou égale à 1,26 g/l (**Nam 2019**). L'incidence du diabète en Algérie est en progression continue, il touche 14,4 % de la population soit environ 4 millions de personnes atteintes, dont l'âge varie entre 20 et 70 ans (**Belhadj et al. 2019**).

Une glycémie élevée cause la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par la chaîne de transport d'électrons des mitochondries et par plusieurs autres mécanismes. Les ERO sont générées quand les défenses antioxydantes cellulaires de l'organisme sont insuffisantes pour les détoxifier complètement, ce qui engendre un stress oxydant. Ce dernier est un processus d'oxydation cellulaire élevée, engendré par plusieurs agents endogènes et exogènes (**Boucelha et al. 2014**), qui cible principalement les érythrocytes (**Maurya et al. 2015**).

Les érythrocytes humains sont soumis aux divers dommages au cours de leur durée de vie, notamment ceux causés par l'oxygène. Chez les diabétiques, les globules rouges (GRs) sont sujets à des conditions hyperglycémiques en plus de leur contact permanent avec plusieurs agents oxydants qui sont neutralisés grâce à leurs systèmes de défense antioxydante. Ces derniers permettent aux GRs de préserver leur intégrité structurelle et de maintenir leur hémoglobine (Hb) dans un état réduit capable de transporter l'oxygène. Il a été démontré que les GRs présentent des statuts antioxydants différents entre une personne diabétique et non diabétique dans leurs réponses respectives aux oxydants de l'Hb (**Coleman 2000, Javeed et al. 2018**).

L'Hb est le constituant majeur du GR, c'est une chromoprotéine constituée d'une partie protéique (la globine) et d'un groupement prosthétique (l'hème) qui fixe d'une manière réversible une molécule d'O<sub>2</sub> grâce à l'atome du fer (Fe<sup>2+</sup>) qu'il renferme. L'Hb est oxydée dans le sang par divers mécanismes complexes auxquels l'organisme lutte contre la formation de la méthémoglobine (MetHb) (**Bhargava et al. 2018**).

La MetHb est un dérivé oxydé de l'Hb. Elle se forme de manière permanente à l'intérieur du GR, dans lequel elle se retrouve à des taux très faibles, car il existe des systèmes qui assurent sa réduction pour éviter son accumulation dans le sang. La formation de la MetHb par auto-oxydation est plus élevée à partir de l'Hb glyquée qu'à partir de l'Hb intacte. La glycation de

l'Hb entraîne des modifications qui se traduisent par une thermolabilité accrue ainsi que des liaisons hème-globine affaiblies dans l'Hb glyquée par rapport à l'Hb normal (**Faivre 1998**). En effet, il a été démontré, in vitro, que quelques xénobiotiques (acide  $\alpha$ -lipoïque oxydé) augmentent la formation de la MetHb et diminuent les niveaux d'antioxydants (GSH) au niveau des érythrocytes humains diabétiques, ce qui entraîne une exacerbation du stress oxydant (**Coleman 2000**). Néanmoins, l'impact de la pathologie diabétique sur les GRs et plus particulièrement les dommages engendrés à l'intérieur de ces cellules reste mal élucidé.

De là converge l'objectif de ce présent travail qui consiste à démontrer en clinique, l'effet des sérums de diabétiques sur les GRs à travers la mesure du statut oxydant et antioxydant, à la fois, dans le milieu intra et extracellulaire des érythrocytes de patients diabétiques.

Ce manuscrit comprend quatre chapitres, la première porte sur le diabète. Le second chapitre consiste à décrire le stress oxydant et la pathologie diabétique. Quant au troisième chapitre, décrit le matériel et les méthodes utilisées pour cette étude. Le quatrième chapitre comporte des illustrations et discussions des différents résultats obtenus. Enfin nous terminerons ce document par une conclusion et quelques perspectives de recherche.

# **Chapitre I**

## Le diabète

## I. Le diabète

### I.1. Généralités sur le diabète

#### I.1.1. Définition du diabète

Le diabète est une maladie chronique qui survient lorsque le pancréas ne produit pas assez d'insuline ou lorsque l'organisme n'est pas capable d'utiliser efficacement l'insuline qu'il produit. Il en résulte une concentration élevée de glucose dans le sang (hyperglycémie). Le diabète se manifeste lorsque la concentration du glucose à jeun dans le sang veineux est supérieure à 1,26 g/l (Wilson *et al.* 1991).

#### I.1.2. Type de diabète

##### I.1.2.1. Diabète type 1

Le diabète de type 1, anciennement connu sous le nom de diabète insulino-dépendant (DID), est caractérisé par une absence ou une production minimale d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas. C'est une maladie qui apparaît le plus souvent durant l'enfance ou l'adolescence. C'est une maladie auto-immune au cours de laquelle les défenses de l'organisme, en particulier des anticorps produits par des lymphocytes, détruisent les cellules  $\beta$  du pancréas, d'où l'incapacité de l'individu à sécréter de l'insuline. Le traitement de ce type de diabète repose sur des injections de l'insuline afin de compenser le défaut de production de cette hormone par l'organisme (Yaribeygi *et al.* 2020).

##### I.1.2.2. Diabète type 2

Le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant (DNID) est caractérisé par un défaut d'action de l'insuline (insulino-résistance) qui peut évoluer vers une insulino-pénie, c'est-à-dire une faible production d'insuline par le pancréas. Cela est dû à un épuisement des cellules sécrétrices de l'insuline, provoquant ainsi une hyperglycémie chronique. Il s'agit de la forme la plus fréquente du diabète (90% des cas de diabète traités). Plusieurs facteurs sont responsables de l'apparition du diabète de type 2 à savoir : l'obésité, la sédentarité, une alimentation mal équilibrée et les antécédents familiaux (Javeed *et al.* 2018).

##### I.1.2.3. Diabète gestationnel

Le diabète gestationnel se caractérise par la survenue, au cours de la grossesse, d'une hyperglycémie. Les femmes atteintes du diabète gestationnel risquent de développer des



complications pendant la grossesse et l'accouchement. Aussi, leurs enfants risquent de développer un diabète de type 2 à un stade précoce de leur vie (**Nam 2019**).

#### **I.1.2.4. Autres types de diabète**

Il existe plusieurs autres types de diabètes à savoir :

- Diabète provoqué par une atteinte du pancréas exocrine, comme la pancréatite, un traumatisme, une infection, le cancer du pancréas et la pancréatectomie ;
- Diabète dû à des troubles endocriniens engendrant une sécrétion excessive d'hormones qui nuisent à l'insuline ;
- Diabète d'origine médicamenteuse et chimique provoqué par des médicaments qui perturbent la sécrétion de l'insuline ou de son action ;
- Diabète d'origine infectieuse occasionné par une infection virale associée à la destruction des cellules bêta ;
- Formes peu courantes de diabète à médiation immunitaire (ex : troubles immunologiques en dehors de ceux qui entraînent le diabète de type 1) (**Kaser et al. 2019**).

#### **I.1.3. Complications du diabète**

##### **I.1.3.1. Complications métaboliques aiguës**

###### **a) Acidocétose diabétique**

L'acidocétose (ACD) survient lorsque les cellules du corps ne reçoivent pas suffisamment de glucose pour produire de l'énergie. L'organisme commence alors à brûler les graisses, ce qui produit des cétones. L'accumulation de ces cétones acidifie le sang. Une confusion, une perte de connaissance, un coma peuvent se produire lorsque le taux de cétones est trop élevé. Les symptômes initiaux de l'ACD sont : la sécheresse de la bouche et des niveaux élevés de glucose dans le sang. D'autres symptômes ultérieurs peuvent apparaître tels que : difficultés respiratoires, vomissements et peau sèche (**Orban et al. 2008**).

###### **b) Etat d'hyperglycémie hyperosmolaire**

L'état d'hyperglycémie hyperosmolaire (EHH) survient lorsque les niveaux de glucose dans le sang sont extrêmement élevés (> 40 mmol/l). Il peut être le résultat de la combinaison d'une maladie (comme une infection) et d'une déshydratation. Plusieurs symptômes se manifestent tels que : soif intense, peau sèche et désorientation (**Orban et al. 2008**).

**c) Hyperglycémie**

Une hyperglycémie survient lorsque les niveaux de glucose dans le sang sont trop élevés (> 7 mmol/l avant un repas et > 8,5 mmol/l deux heures après un repas). Elle peut être due à une période de stress ou à un excès de glucides. Les symptômes qui peuvent subvenir sont: soif intense, maux de tête et polyurie (**Orban et al. 2008**).

**d) Hypoglycémie**

Une hypoglycémie survient lorsque les niveaux de glucose dans le sang sont trop faibles (< 4 mmol/l). Elle peut être le résultat d'un déséquilibre entre le traitement médicamenteux, l'alimentation et l'activité physique. Les Symptômes de l'hypoglycémie comprennent une transpiration accrue, manque de concentration et tremblements (**Orban et al. 2008**).

**I.1.3.2. Complications chroniques**

Les complications chroniques du diabète, résultent d'une glycémie à des valeurs hors normes à long terme, elles sont courantes dans tous les types de diabète. Elles peuvent entraîner des lésions neurologiques irréversibles ou le décès du malade (**Nam 2019**). Il existe deux types de complications chroniques :

**a) Complications microvasculaires****- Rétinopathie**

La rétinopathie diabétique est la complication oculaire la plus répandue. Ce terme englobe tous les troubles de la rétine dûs au diabète à savoir le glaucome et la cataracte (**Mbanya et al. 2003**).

**- Néphropathie**

La pathologie rénale est la plus fréquente chez les diabétiques. Cette affection se caractérise par une diminution de la fonction des reins causée par une atteinte de leurs vaisseaux sanguins. Des niveaux élevés de glucose dans le sang contraignent les reins à filtrer une quantité importante de sang ce qui engendre par conséquent, une insuffisance rénale terminale (IRT) (**Mbanya et al. 2003**).

**- Neuropathie**

L'atteinte des nerfs est une complication à long terme du diabète. Des niveaux élevés de glucose dans le sang peuvent endommager les petits vaisseaux sanguins alimentant les nerfs, qui sont alors privés de nutriments importants. Cela, est à l'origine d'une atteinte des fibres nerveuses (**Mbanya et al. 2003, Orban et al. 2008**).

## b) Complications macrovasculaires

### - Maladies vasculaires

Le risque de maladies cardiovasculaires chez les diabétiques est doublé, ce qui en fait la première cause de décès dans cette population de patients. Il existe trois grands types de maladies cardiovasculaires : la maladie coronarienne (qui touche les vaisseaux sanguins alimentant le muscle cardiaque), la maladie cérébrovasculaire (qui touche les vaisseaux sanguins alimentant le cerveau) et la maladie artérielle périphérique (qui touche les vaisseaux sanguins alimentant les bras et les jambes). L'artériopathie des membres inférieurs est une complication grave et chronique, elles comprennent des lésions des tissus profonds associés à des troubles neurologiques et à la maladie vasculaire périphérique (MVP) des membres inférieurs (Mbanya *et al.* 2003, Nam 2019).

### I.1.4. Méthodes de diagnostic et bilans de patients diabétiques

Plusieurs analyses ont été mis en œuvre afin d'assurer un bon suivi du patient diabétique.

#### I.1.4.1. Glycémie à jeun

La glycémie est le taux de glucose contenu dans le sang, dont les valeurs usuelles varient entre 0,7 et 1,20 g/l (Frontières 2018). Indispensables aux diabétiques, la glycémie capillaire permet de mesurer quotidiennement le taux de sucre dans le sang (avant et après le repas) et d'adapter le traitement en conséquence. Les patients peuvent lire et interpréter seuls leurs résultats (Rodbard *et al.* 2007).

#### I.1.4.2. Hémoglobine glyquée

L'hémoglobine glyquée (HbA1c) indique le reflet de la glycémie dans le sang sur les trois derniers mois. L'examen est prescrit aux diabétiques pour surveiller l'évolution de leur diabète. La valeur normale se situe entre 4 et 6 %, généralement, un diabète est considéré comme équilibré si le taux d'HbA1c est inférieur ou égal à 7 %. Au-delà, le risque de développer des complications à long terme augmente (Rodbard *et al.* 2007).

#### I.1.4.3. Bilan rénal

Le bilan rénal est pratiqué au moins une fois par an pour évaluer l'atteinte du rein. Il passe par une analyse du sang et une analyse des urines. L'analyse du sang concerne la mesure du taux de créatine qui signale un dysfonctionnement rénal lorsqu'il est élevé. Ce taux sera accompagné par le calcul du débit de filtration glomérulaire (DFG), qui permet de détecter des modifications rénales très précocement. L'analyse des urines recherche la microalbuminurie, il

s'agit d'un examen en laboratoire sur un échantillon d'urine, qui permet de découvrir des atteintes extrêmement précoces du rein (**Rodbard et al. 2007**).

#### a) Albumine

L'albumine est une protéine plasmatique produite par le foie. On la trouve également dans le lait, les muscles et dans le plasma sanguin. Le taux sanguin normal de l'albumine est de 35 à 50g/l (**Frontières 2018**).

Chez le patient diabétique, la microalbuminurie est un marqueur de risque (cardiovasculaire, métabolique, rénal) de développer un diabète d'autant plus important qu'elle est élevée et de mortalité chez les diabétiques de type 1 et 2. Il est recommandé d'effectuer une surveillance de la fonction rénale annuelle (créatininémie et estimation du DFG) chez tous les sujets diabétiques, et, en particulier chez ceux présentant une microalbuminurie élevée (**Halimi et al. 2008**).

#### b) Urée

L'urée est un déchet azoté qui provient de la dégradation des protéines par le foie, il est filtré par les reins et éliminé dans les urines. La concentration normale de l'urée est de 0,15-0,50 g/l chez un adulte et de 0,15 à 0,25 chez l'enfant (**Frontières 2018**).

#### c) Créatinine

La créatinine est un produit de dégradation du phosphate de créatine dans le muscle. La créatine se dégrade spontanément dans nos cellules musculaires et son produit de dégradation est la créatinine (**Frontières 2018**).

### I.1.4.4. Bilan lipidique

Le bilan lipidique est un examen sanguin qui cible les composés lipidiques du sang dont le cholestérol et les triglycérides. Le médecin le prescrit pour déterminer, chez le patient, le risque de développer une maladie cardio vasculaire. Ce bilan permet d'évaluer le risque de complications cardio-vasculaires qui est plus élevé chez les diabétiques. Il est effectué au moins une fois par an. Chez un diabétique de type 2, on constate généralement une élévation des triglycérides et une diminution du HDL. Quant au LDL, il se situe souvent dans les limites de la normale (**Rodbard et al. 2007**).

#### a) Le cholestérol total

Le cholestérol total (CT) un corps gras qui entre notamment dans la composition des membranes cellulaires et qui sert à la synthèse d'hormones stéroïdes. Les valeurs usuelles du CT varient entre 2 et 2,4 g/l.

**b) Le cholestérol-LDL**

Le cholestérol-LDL est considéré comme « mauvais » cholestérol. Ce corps gras est lié à des transporteurs (lipoprotéines) type LDL (*Low-Density Lipoproteins*), transporté du foie vers le reste de l'organisme. Les concentrations usuelles du cholestérol-LDL sont de 1 à 1,6 g/l.

**c) Le cholestérol-HDL**

Le cholestérol-HDL est désigné comme le « bon » cholestérol. Il est lié aux HDL (*High-Density Lipoproteins*) qui circulent vers le foie. Au niveau de cet organe, le cholestérol est stocké. Les valeurs usuelles du cholestérol-HDL varient entre 0,4 et 0,6 g/l.

**d) Les triglycérides**

Les triglycérides (TG) est un type de graisse qui constitue une importante réserve d'énergie et qui provient essentiellement des sucres et de l'alcool ingérés en grande quantité. Les concentrations normales de TG sont de 1 à 1,6 g/l (**Frontières 2018**).

**I.1.4.5. Acide urique**

L'acide urique est une forme de déchet normalement éliminé par l'organisme. Il provient de la dégradation de cellule mortes mais également de la digestion de certains aliments. Les valeurs usuelles varient entre 40 et 60 mg/l (**Frontières 2018**).

Un taux élevé en acide urique peut déclencher plusieurs symptômes parmi lesquels on trouve l'obésité, l'hypertension ou la résistance à l'insuline, d'où le lien entre ces derniers avec le diabète. La régulation du métabolisme de l'acide urique constitue donc une piste thérapeutique contre un syndrome métabolique et les maladies qui y sont associées (**DeBosch et al. 2014**).

# **Chapitre II**

## Stress oxydant et diabète

## II. Stress oxydant et diabète

### II.1. Le stress oxydant

Le stress oxydant (SO) correspond à une agression des cellules par les espèces réactives d'oxygène (ERO), suite à un déséquilibre entre la production de ces derniers et les systèmes de défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des (ERO) (Pincemail *et al.* 2009). Cela entraîne une perturbation de la signalisation et du contrôle redox et/ou des dommages moléculaires (Sies 2015).

### II.2. Les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des molécules hautement réactives générées par le métabolisme de l'oxygène. Il peut s'agir des espèces radicalaires ou non radicalaires (tableau I). Les radicaux libres sont des molécules qui contiennent au moins un électron de valence non apparié au niveau de leur couche périphérique, ce qui les rend très réactifs, instables et à courte durée de vie (Ahmad *et al.* 2017).

**Tableau I.** Les différents types d'espèces réactives de l'oxygène (Ahmad *et al.* 2017).

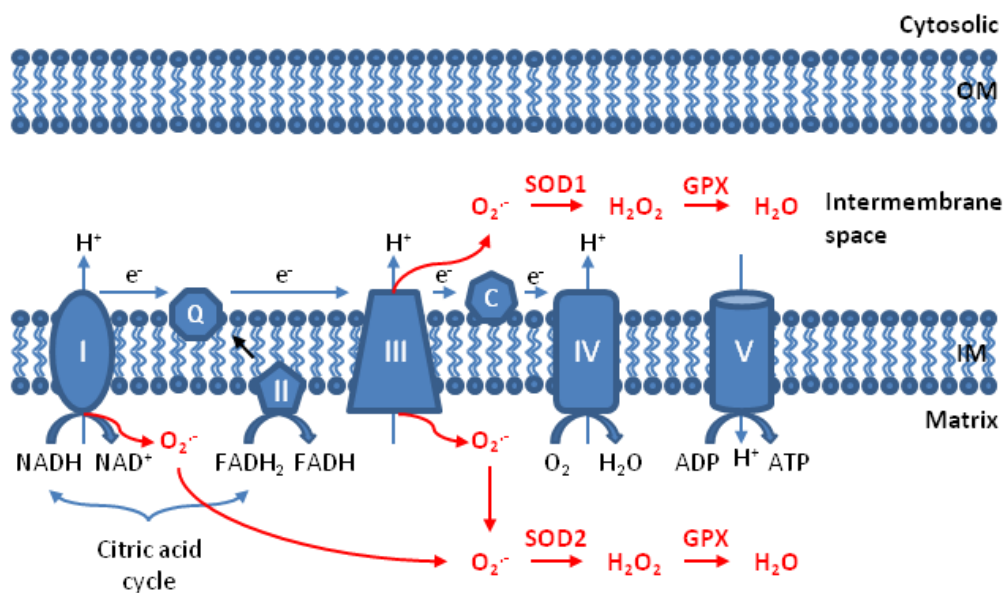
Espèces radicalaires	Espèces non radicalaires	Origine		Cible moléculaire
		Endogène	Exogène	
Radical Hydroxyle ( $\bullet\text{OH}$ )	Peroxyde d'Hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )			
Anion Superoxyde ( $\bullet\text{O}_2^-$ )	Oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ )	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La mitochondrie</li> <li>- Les peroxysomes</li> <li>- Les enzymes</li> <li>- Processus inflammatoires</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Un mode de vie malsain</li> <li>- L'exposition aux produits chimiques et aux rayonnements</li> <li>- Consommation d'alcool, tabac et de certains médicaments</li> <li>- Infection par des virus ou bactéries</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ADN</li> <li>- Protéines</li> <li>- Lipides</li> </ul>
Radical pyroxyde ( $\bullet\text{LOO}^-$ )	Ozone ( $\text{O}_3$ )			
Thiyl ( $\bullet\text{RS}$ )	Peroxyde de lipides ( $\text{LOOH}$ )			
	Peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ )			

#### II.2.1. Sources de production d'espèces réactives de l'oxygène

Les ERO sont générées par différents mécanismes qui sont divisés en deux classes à savoir endogènes et exogènes.

### II.2.1.1. Sources endogènes de production d'espèces réactives de l'oxygène

Il existe diverses sources endogènes productrices d'ERO, notamment la mitochondrie qui génère près de 90 % du nombre total d'ERO (Figure 1) (Kausar *et al.* 2018). Les peroxysomes produisent des quantités importantes d'ERO sous forme de  $H_2O_2$  (Wible *et al.* 2018). Également, plusieurs enzymes sont impliquées dans des voies de production des ERO comme la xanthine oxydase (XO) et les NADPH-oxydases. Les processus inflammatoires jouent également un rôle important dans la genèse des ERO (Ahmad *et al.* 2017). Le phénomène d'ischémique-reperfusion, une activité physique non appropriée, les métaux de transition, sont aussi des sources endogènes productrices d'ERO.



**Figure 1 :** Production des ERO lors du transport d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie (Kausar *et al.* 2018).

### II.2.1.2. Sources exogènes de production d'espèces réactives de l'oxygène

Les facteurs environnementaux sont des agents générateurs du stress oxydant (SO) par excellence, ce qui en résulte une production accrue des ERO, parmi ces éléments :

- Un mode de vie malsain (stress, angoisse, fatigue...) et une alimentation non équilibrée ;
- L'exposition aux pesticides, détergents, produits chimiques, à la pollution, radiations ionisantes, rayonnements (UV, X), le soleil et les sources fortes de lumière,...(Boucelha *et al.* 2014).

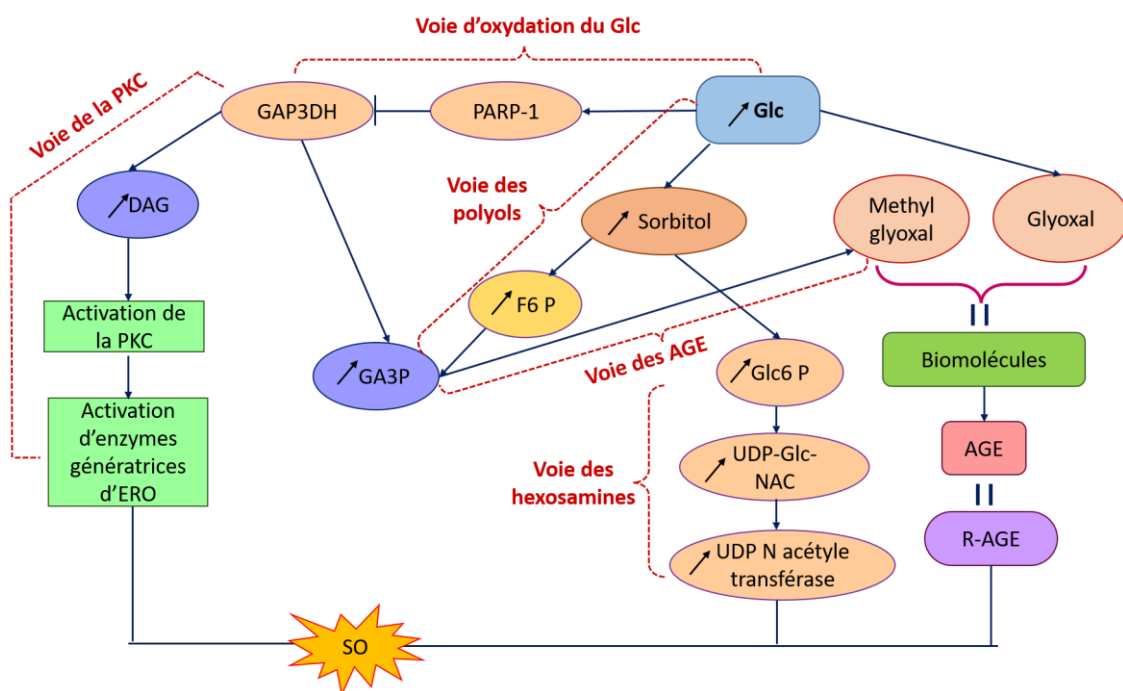


### II.3. Physiopathologie du stress oxydant dans le diabète

Plusieurs études ont pu mettre en évidence le rôle du SO dans la pathogénèse du diabète. La génération des ERO dans la pathologie diabétique se produit suite à une glycation non enzymatique des protéines, à l'oxydation du glucose et à l'augmentation de la peroxydation des lipides. Cela, altère les systèmes enzymatiques, la machinerie cellulaire ce qui provoque également une résistance accrue à l'insuline due au SO (Maritim *et al.* 2003).

### II.4. Voies moléculaires associées au stress oxydant chez les patients diabétiques

Les voies moléculaires qui contribuent à l'amplification du stress oxydant dans le diabète sont soit impliquées dans le métabolisme du glucose soit dans le métabolisme des lipides. Ces voies cellulaires sont illustrées dans la figure 2.



**Figure 2** : Les différentes voies moléculaires associées au stress oxydant chez les patients diabétiques.

#### II.4.1. Voie d'oxydation du glucose

En condition d'hyperglycémie, il y a une production excessive d'anion superoxyde  $O_2^-$  qui altère les systèmes antioxydants (AO) de l'organisme et induit un SO créant ainsi des dommages à diverses biomolécules telles que l'ADN. Une fois cette molécule est endommagée, une enzyme de réparation la poly-ADP-ribose polymérase-1 (PARP-1) est activée, elle inhibe

la glyceraldéhyde déshydrogénase (GAPDH), ce qui augmente les niveaux de certaines molécules dans la cellule, stimule d'autres voies pro-oxydantes comme les voies des produits finaux de glycation avancée (AGE) et la voie de la protéine kinase C (PKC) en raison de l'augmentation du niveau de glyceraldehyde-3-phosphate (GAP). Comme elle stimule les voies de l'hexosamine et les voies des polyols en raison de l'augmentation des taux de fructose 6-phosphate (F-6-P) et de glucose respectivement. L'accumulation de GAP et du glucose provoque leurs auto-oxydations, conduisant à la production de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et du glyoxal qui est un précurseur des produits AGE (figure 2), ce qui favorise ainsi la genèse d'un stress oxydatif (**Ighodaro 2018**).

#### II.4.2. Voie des produits finaux de glycation avancée

La formation des précurseurs d'AGE est principalement associée à l'hyperglycémie et particulièrement aux produits finaux de glycation avancée (AGE). Les protéines intra/extracellulaires modifiées négativement en AGE ayant des fonctions modifiées lorsque les groupes constituants leurs acides aminés interagissent avec des précurseurs d'AGE tels que le glyoxal, le méthylglyoxal et la désoxyglucosone. Une fois formés, les AGE peuvent se lier à différents récepteurs d'AGE, ou interagir anormalement avec des composants de la matrice extracellulaire favorisant la génération des ERO (figure 2). Outre les protéines, les lipides, les acides nucléiques, les glucides et certains composants de la matrice extracellulaire peuvent être modifiés en AGE (**Ighodaro 2018**).

#### II.4.3. Voie d'activation de la PKC

En condition d'hyperglycémie, l'accumulation de glyceraldéhyde-3-phosphate due à l'inhibition de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase conduit à un niveau élevé de dihydroxyacétone-3-phosphate (DHA-3-P), ce dernier est ensuite réduit en glycérol-3-phosphate qui se combine à son tour avec les acides gras pour donner du diacylglycérol (DAG) par l'action de la 1-acylglycérol-3-P-acyl transférase et de la phosphatidate phosphohydrolase (figure 2).

L'augmentation du niveau cellulaire de DAG peut également résulter de l'hydrolyse de la phosphatidylcholine et la phosphatidyl sérine. Des activités élevées de la voie PKC stimulent les enzymes génératrices des ERO telles que les NADPH-oxydases et les lipo-oxygénases qui, toutes ensemble, amplifient l'environnement oxydatif cellulaire (**Ighodaro 2018**).

#### II.4.4. Voie des hexosamines

Dans un état cellulaire hyperglycémique, le taux de fructose-6-phosphate dérivé de la glycolyse est augmenté et la molécule est métabolisée par la glucosamine-fructose amidotransférase en glucosamine-6-phosphate qui est ensuite convertie en UDP-N-acétyl glucosamine (UDP-GlcNAc) via l'activité de l'UDP-Nacétylglucosamine-1-phosphate uridyltransférase. L'accumulation de l'UDP-GlcNAc déclenche l'hyperactivité de la O-glucosamine-N-acétyl transférase, ce qui serait associé à une expression accrue de facteurs de transcription tels que le facteur de croissance transformant (TGF)  $\alpha$  et le TGF- $\beta$  qui inhibent la mitogenèse des cellules mésangiales et activent la prolifération de la matrice de collagène et l'épaississement de la membrane basale (figure 2). Tous ces facteurs sont responsables du rôle toxique et pro-oxydant de la voie de l'hexosamine dans le diabète et de ses complications associées, en particulier la néphropathie (**Ighodaro 2018**).

#### II.4.5. Voie des polyols

En cas de glycémie élevée, l'aldose réductase est activée, ce qui entraîne une augmentation du taux de sorbitol qui est converti par le sorbitol déshydrogénase (SDH) en fructose. Un niveau élevé de fructose provoque une accumulation de GAP et de DHAP, conduisant à un SO via la formation de méthylglyoxal et l'activation de la PKC. En outre, une activité accrue de l'aldose réductase entraîne une diminution significative du niveau de la NADPH, entraînant par la suite une baisse de l'activité de la glutathion peroxydase et du niveau de glutathion.

La SDH, catalyse la conversion du sorbitol en fructose en utilisant le  $\text{NAD}^+$  comme cofacteur. En cas d'hyperglycémie son activité augmente, conduisant à la formation d'une grande quantité de fructose, qui est facilement phosphorylée et hydrolysée en glycéralsehyde-3-phosphates et dihydroxyacétone-3-phosphate. Ces phosphates de triose s'accumulent en raison de l'augmentation du rapport  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  (figure 2). L'accumulation des phosphates de triose favorise la formation de précurseur d'AGE (méthylglyoxal) via l'auto-oxydation et l'activation de la voie PKC via la synthèse du diacylglycérol (DAG). Ces phénomènes favorisent ensemble la suppression du système de défense antioxydant, entraînant un stress oxydant (**Ighodaro 2018**).

## II.5. Biomarqueurs du stress oxydant dans le diabète sucré

Les ERO sont caractérisées par une demi-vie très courte, ce qui explique la difficulté de les mesurer directement, cependant, les produits de dommages causés par ces derniers dans la cellule, à savoir l'ADN, les lipides et les protéines, sont de bons marqueurs du stress oxydatif (tableau II).

**Tableau II :** Biomarqueurs du stress oxydant (Piconi *et al.* 2003, Rehman *et al.* 2017).

Cible des ERO	Biomarqueurs	Technique de mesure des dommages
ADN	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oxydation des bases nucléotidiques ou des sucres.</li> <li>• Formation de réticulations.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La mesure de la 8-hydroxy-2'désoxyguanosine (8-OHdG) et de sa base libre 8-hydroxyguanine (8-OH-G) dans les cellules sanguines ou l'urine par HPLC et GC-MS ou par la méthode ELISA</li> </ul>
Protéines	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Une réticulation</li> <li>• Une fragmentation peptidique</li> <li>• Une conversion d'un acide aminé à un autre</li> <li>• Modification d'un résidu par oxydation de sa chaîne latérale</li> <li>• Désamination</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La détection de la nitrotyrosine par une technique basée sur HPLC et GC-MS ou par la méthode ELISA</li> </ul>
Lipides	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oxydation poussée d'acides gras polyinsaturés (PUFA) et formation d'aldéhydes bioactifs</li> <li>• Formation de radicaux peroxydes lipidiques</li> </ul>	Mesure par spectrophotométrie la formation des MDA avec l'acide thiobarbiturique

## II.6. Modèle d'étude du stress oxydant chez les diabétiques

### II.6.1. Le sang

Le sang est composé de trois types de cellules sanguines, les érythrocytes, les leucocytes et les thrombocytes en suspension dans le plasma. Le volume total du sang d'un adulte humain

est de 5 à 7 litres. Les cellules en suspension représentent 45% du volume total, ce qui correspond à l'hématocrite (**Bhargava et al. 2018**).

### II.6.2. Le sérum

Le sérum est un fluide biologique composé de 90% d'eau et d'électrolytes, permettant le transport des nutriments, gazes, déchets et hormones, via une large gamme de protéines plasmatiques (**Sherwood 2015**). Le sérum est très utilisé en expérimentation pour détecter les biomarqueurs du stress oxydant chez les diabétiques (**Piconi et al. 2003**).

### II.6.3. Les érythrocytes

Les érythrocytes, hématies, ou encore globules rouges, sont des cellules anucléées, ne possédant ni mitochondrie, ni ribosome, ni REG. Elles sont caractérisées par une coloration rouge rosé en périphérie, orangée au centre, sous formes de disques aplatis biconcaves homogènes, dont les deux faces forment une dépression centrale permettant une meilleure fixation de l'O<sub>2</sub>.

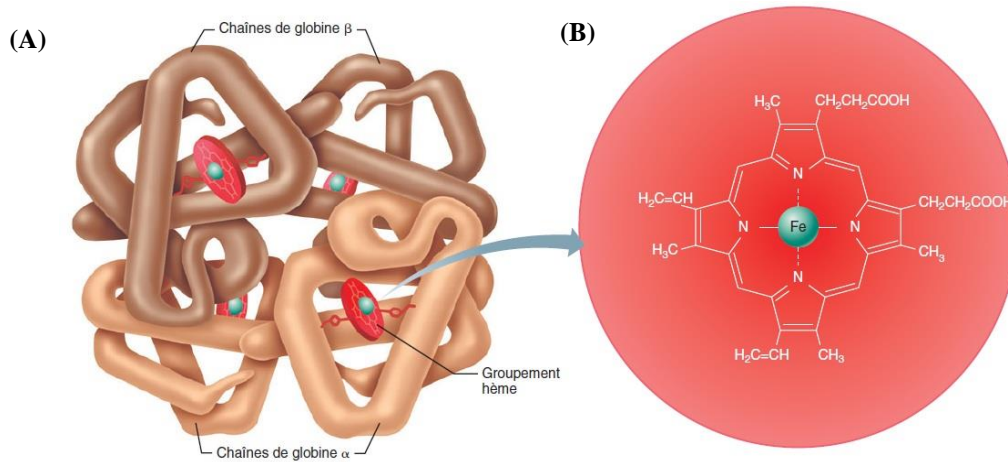
Ces cellules font partie des éléments figurés du sang, qui prennent 7 jours pour se développer au niveau de la moelle osseuse et circulent pendant 120 jours dans le sang avant d'être dégradés dans la rate (**Bhargava et al. 2018**). Le constituant fondamental des hématies est l'hémoglobine (<math>250 \times 10^6</math> molécules de l'Hb/cellule) (**Sherwood 2015**). En effet, les érythrocytes constituent un modèle expérimental *in vitro* très adéquat pour mettre en évidence le stress oxydant chez les diabétiques (**Coleman 2000**).

#### II.6.3.1. Fonctions des globules rouges

Les GR ont un rôle important dans la régulation du pH sanguin et le transport de complexes immuns grâce au CD20 (une molécule présente à la surface des hématies). Chez l'humain, ces cellules portent à leur surface les Ag des groupes sanguins ABO et Rh. Les GR sont les transporteurs d'O<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> par excellence à travers l'hémoglobine (**Gagneux et al. 1999**).

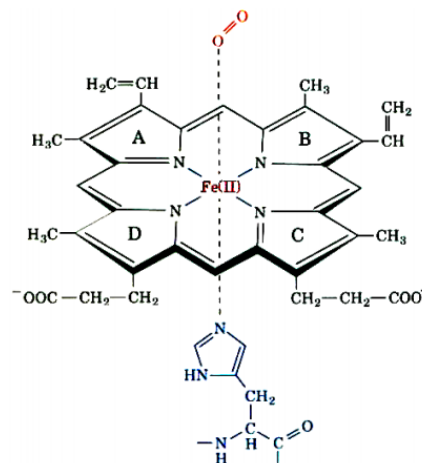
#### II.6.3.2. L'hémoglobine

L'hémoglobine (Hb) est une ferroprotéine stable et hydrophobe, constituée d'une partie protéique : la globine, un hétérotétramère composé de deux chaînes  $\alpha$  et deux chaînes  $\beta$ . Chaque sous-unité possède un groupement prosthétique qui est l'hème, un cycle tétra pyrrolique contenant un atome de fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>), liant de manière réversible de l'oxygène (figure 3) (**Sherwood 2015**).



**Figure 3 :** Structure moléculaire de l'hémoglobine. (A) structure de l'Hb ; (B) structure de la molécule de l'hème contenant du fer (Agourram 2018).

Dans l'Hb, le fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) présente 6 liaisons de coordination à savoir : quatre liaisons avec les quatre noyaux du cycle tétra pyrrolique, une liaison avec l'histidine de la globine et une liaison avec une molécule d' $\text{O}_2$  (figure 4).



**Figure 4 :** Les différentes liaisons de l'Hb (Bouzhir 2006).

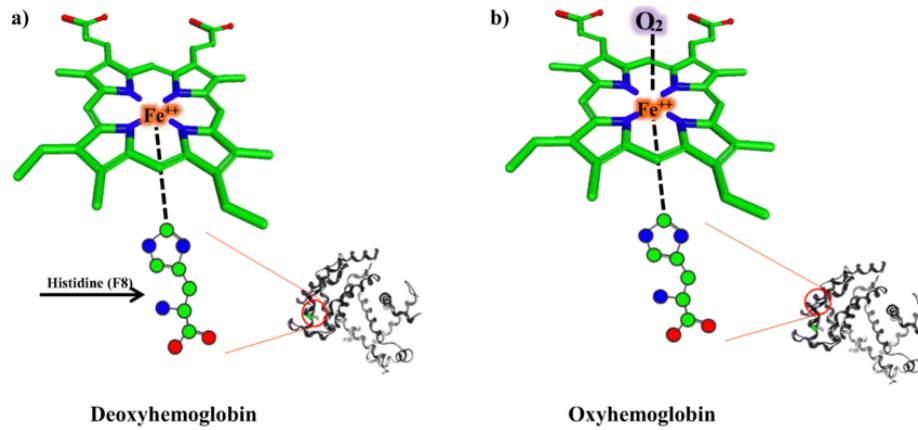
#### a) Types d'hémoglobine

Il existe trois formes d'Hb normale à savoir : l'Hb A (95 – 99% de l'Hb de l'adulte), l'Hb A2 (1 – 3% de l'Hb de l'adulte) et l'Hb F ou fœtale (0 – 2% chez l'adulte et 80 – 100% à la naissance) (Medkour 2008).

#### b) Etats conformationnels de l'hémoglobine

L'Hb existe *in vivo* sous deux formes différentes, représentées par des molécules oxygénées et désoxygénées (figure 5), dont les proportions relatives changent continuellement au cours du cycle d'oxygénation-désoxygénation. En effet, le fer de l'Hb reste sous sa forme

réduite ( $\text{Fe}^{2+}$ ) que ce soit la molécule oxygénée ou désoxygénée. L'Hb est un pigment de couleur rouge quand elle est associée à l' $\text{O}_2$  et bleuâtre quand elle est désoxygénée (Sherwood 2015).



**Figure 5 :** États conformationnels de l'hémoglobine. a) désoxyhémoglobine, b) oxyhémoglobine (Ahmadi *et al.* 2019).

### II.6.3.3. La méthémoglobine

La méthémoglobine (MetHb) est le résultat de l'oxydation de l'atome de fer ferreux de l'Hb (ion  $\text{Fe}^{2+}$ ) en fer ferrique (ion  $\text{Fe}^{3+}$ ) par un agent oxydant. A l'état physiologique, la MetHb existe en très faible quantité dans le sang ( $\approx 1\%$  chez l'adulte,  $\approx 1,5\%$  chez le nouveau-né et  $\approx 2\%$  chez le prématuré). Ces petites quantités de MetHb proviennent de la synthèse d'oxydants ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) au cours du métabolisme normal (Medkour 2008).

#### a) Propriétés physicochimiques de la méthémoglobine

La MetHb possède deux maximums d'absorption de 500 et de 632 nm. Le  $\text{Fe}^{3+}$  de la MetHb réagit avec les ions  $\text{CN}^-$  pour donner de la cyanméthémoglobine qui possède un maximum d'absorption à 540 nm. Les propriétés spectrales de la méthémoglobine sont exploitées pour le dosage et le diagnostic des méthémoglobinémies (Zaher 2011).

#### b) Méthémoglobine et diabète

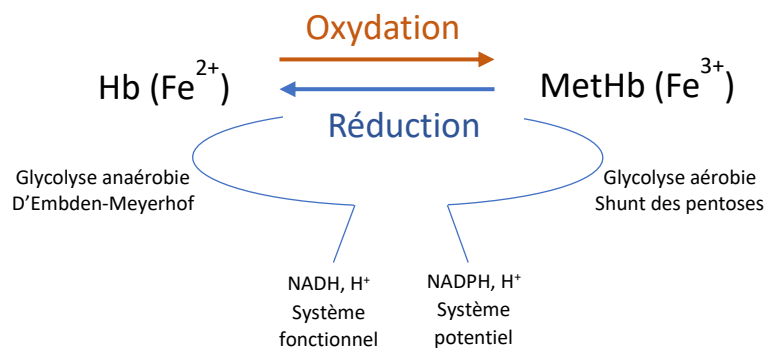
La formation de la MetHb par auto-oxydation est plus élevée à partir de l'Hb glyquée qu'à partir de l'Hb intacte. La glycation de l'Hb entraîne des modifications qui se traduisent par une thermolabilité accrue ainsi que des liaisons hème-globine affaiblies dans l'Hb glyquée (une molécule moins stable que l'Hb intacte) par rapport à l'Hb normale.

L'auto-oxydation de l'Hb glyquée est plus rapide que celle de l'Hb intacte. La méthémoglobinisation est un indicateur important du SO dans le sang des diabétiques. Car leur

sang subit plus facilement la conversion de l'oxyhémoglobine en méthémoglobine que chez les sujets sains, leur sang présente une sensibilité accrue à la formation de MetHb par rapport au sang de personnes non-diabétiques, ces derniers ont des temps d'oxydation d'Hb plus longs que ceux de personnes diabétiques (Tarburton 2019).

### c) Systèmes de réduction de la méthémoglobine

Dans le cas de GR normal, quatre mécanismes interviennent pour maintenir le fer de l'Hb à l'état ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ou de réduire la MetHb pour la maintenir à un taux de  $\approx 1\%$  (figure 6).



**Figure 6:** Schéma général de la formation et de la réduction de la MetHb (Coleman 2000).

## II.7. Evaluation biologique du stress oxydant en routine clinique

Plusieurs laboratoires de biologie clinique ont développé en routine des tests pour l'évaluation de la capacité antioxydante globale du plasma, comme le dosage des vitamines C et E, de la  $\beta$ -carotène, du CoQ10, de la glutathion, des protéines à groupements thiols, de la SOD et de la glutathion peroxydase. Un inconvénient majeur est que le coût de l'analyse individuelle de tous ces antioxydants est assez élevé, c'est pourquoi les laboratoires de biologie clinique proposent aussi la mesure de la capacité antioxydante globale (CAG) du plasma. Plusieurs méthodes ont été développées pour la mesure de la CAG du plasma, mais seules trois d'entre elles ont fait l'objet d'applications dans le cadre d'une routine clinique (tableau III) (Pincemail *et al.* 2014).



**Tableau III** :Quelques tests utilisés pour la mesure de la CAG du plasma (**Pincemail et al. 2014**).

Méthode	Générateur des ERO	Standard utilisé	Mesure
Test ORAC ( <i>Oxygen Radical Antioxidant Capacity</i> )	2,2'-azobis(2-amidinopropane) Dichloro hydrate (AAPH) → radicaux peroxydes de nature hydrophile	Trolox	Diminution de la fluorescence de la fluorescéine f ( $\lambda_{ex} = 485 \text{ nm}$ ; $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$ )
TEAC ( <i>Total Equivalent Antioxidant Capacity</i> )	ABTS + peroxydase + peroxyde d'hydrogène → formation du radical (ABTS <sup>•+</sup> )	Trolox	Décoloration du radical ABTS <sup>•+</sup> ; $\lambda = 734 \text{ nm}$
FRAP ( <i>Ferric Reducing Ability of Plasma</i> )	Réduction du Fe (III)(TPTZ) <sub>2</sub> Cl <sub>3</sub>	Fe(II)	Changement d'absorbance, à $\lambda = 593 \text{ nm}$

## II.8. Systèmes de défense antioxydants

### II.8.1. Les antioxydants

Un antioxydant (AO) est une substance chimique responsable de la régulation de l'état redox en limitant et/ou en retardant l'oxydation d'autres substrats, notamment les graisses, les huiles et les aliments. Ces molécules ont un rôle important dans la défense contre le SO induit par les radicaux libres en empêchant la formation des ERO, l'élimination des ERO et les réparations tissulaires et cellulaires (**Piconi et al. 2003, Rehman et al. 2017**).

#### II.8.1.1. Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes de défense antioxydants impliquent plusieurs stratégies enzymatiques et non enzymatiques, agissant en synergie les uns avec les autres et contre différents types de radicaux libres. Les antioxydants communs comprennent les vitamines A, D, C et E, la glutathion et les enzymes SOD, CAT, GPx et GRx. Les autres antioxydants comprennent l'acide lipoïque, les caroténoïdes mixtes, la coenzyme Q10, plusieurs bio flavonoïdes, les minéraux antioxydants (Cu, Zn, Mn et Se) et les cofacteurs (acide folique, vitamines B1, B2, B6, B12) (**Maritim et al. 2003**).

# **Chapitre III**

## **Matériel et Méthodes**

### III. Matériel et méthodes

#### III.1. Matériel

##### III.1.1. Appareils utilisés

Centrifugeuse (ALC centrifugeuse 4206), Vortex (VTX 300), Agitateur magnétique, Balance analytique, Spectrophotomètre à UV (GENRUI), Réfrigérateur/Congélateur.

##### III.1.2. Produits et réactifs utilisés

Le radical ABTS (acide 2,2'-azino-bis 3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) « Sigma »; persulfate de potassium ( $K_2S_2O_8$ ), chlorure de sodium (NaCl).

##### III.1.3. Echantillonnage

Les échantillons du sang total des patients diabétiques utilisés, ont été tous récupérés dans des tubes EDTA auprès de la maison des diabétiques « Beau Séjour » de Bejaia, après prélèvement et réalisation de l'analyse de l'hémoglobine glyquée (HbA1c).

#### III.2. Méthodes

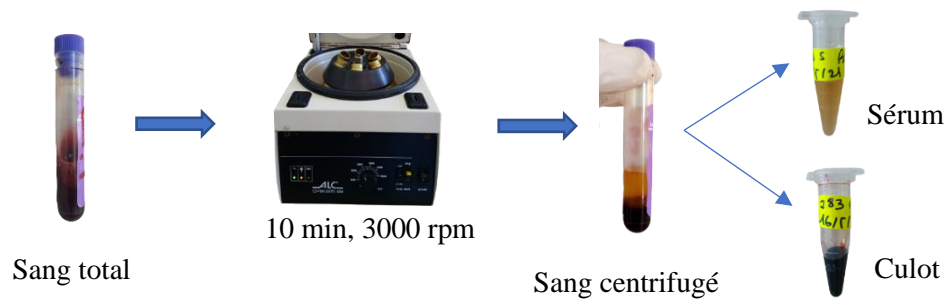
##### III.2.1. Sélection et étude clinique des patients diabétiques

Cette étude a été réalisée chez 68 patients. L'étude a été effectuée après que chaque patient ait donné son consentement et en accord avec le corps médical. De plus pendant leur consultation, nous avons complété une fiche de renseignements (Annexe), celle-ci regroupe les principales données biologiques et cliniques nécessaires pour l'étude à savoir : la glycémie à jeun, HbA1C, bilan lipidique, tension artérielle, TSH, albuminémie, créatininémie.

La collecte des échantillons a été effectuée au niveau de la maison des diabétiques « Beau Séjour » de la wilaya de Bejaia. Tous les patients sont sous suivis médical par les médecins de la clinique, dans le cadre de l'étude BAROMETRE.

##### III.2.2. Collecte et séparation du sang total

Pour cette étude, nous avons collecté du sang total humain des patients diabétiques dans des tubes EDTA. Le sang a été centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min, puis séparé en deux fractions surnageant (sérum), culot (globules rouges) dans des tubes Eppendorf (figure 7). Ces derniers ont été conservés à  $-20\text{ C}^\circ$  jusqu'à la réalisation des tests.



**Figure 7 :** Protocol de séparation du sang total.

### III.2.3. Mesure des paramètres hématologiques

#### III.2.3.1. Mesure du taux de l'hémoglobine glyquée

Le dosage de l'hémoglobine glyquée (HbA1c) du sang collecté a été effectué à l'aide d'un automate (ADAMS A1c HA-8180V). Il s'agit d'un analyseur de glycohémoglobine (HbA1c) entièrement automatisé basé sur une Chromatographie Liquide haute Performance (CLHP). Ce test a été effectué au niveau de la maison des diabétiques de Bejaia, ce qui permet d'obtenir des informations sur la glycémie moyenne du patient. Il est préconisé à intervalles réguliers, tous les 3 mois.

Le dosage de l'HbA1c est donné en pourcentage. Chez des personnes non diabétiques, ce pourcentage est compris entre 4% et 6%. Chez les personnes diabétiques, l'Hb glyquée cible doit généralement être inférieur à 7%.

#### III.2.3.2. Mesure de l'hémoglobine intacte

Pour préparer la solution nécessaire au dosage de l'Hb intacte, nous avons effectué une dilution de 1/5 pour le sérum. Le culot cellulaire a été dilué à 1/200 puis centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min. Une mesure de l'absorbance des échantillons a été réalisée à 412 nm (**Mameri et al. 2021**).

#### III.2.3.3. Mesure de la Méthémoglobine

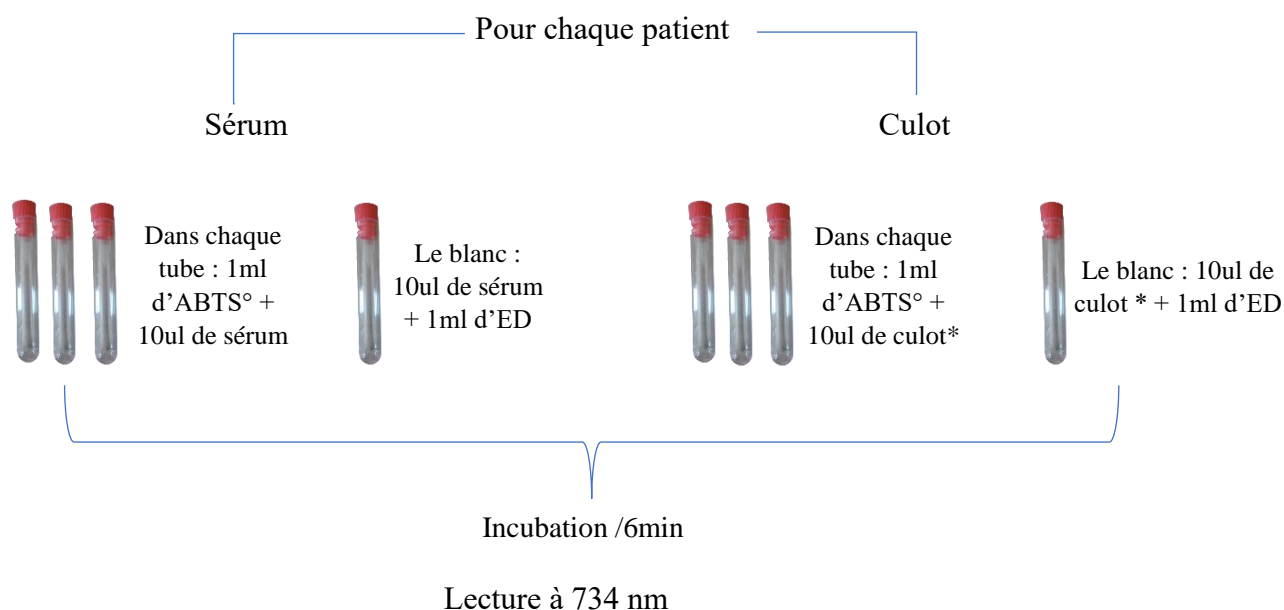
La préparation des échantillons pour mesurer le taux de la MetHb a été effectuée en suivant le protocole décrit précédemment (section III.2.3.2.). La mesure des absorbances des échantillons a été effectuée par spectrophotomètre à 540 nm (**Mameri et al. 2021**).

### III.2.4. Evaluation du statut antioxydant total

Afin de déterminer le statut antioxydant total (test à l'ABTS) dans le milieu intra et extracellulaire, nous avons effectué le test ABTS sur les sérums et les culots cellulaires des diabétiques. Pour cela, la solution d'ABTS a été préparée préalablement en mélangeant un volume d'ABTS (7mM) avec la solution de persulfate de potassium (2,45mM). Ce mélange a été incubé pendant 12-16h à température ambiante dans l'obscurité, ce qui permet la formation des radicaux ABTS° (Re *et al.* 1999).

Une dilution de la solution d'ABTS° a été préparée avec de l'eau distillée afin d'obtenir une solution d'ABTS° de  $0,7 \pm 0,02$  d'absorbance à 734 nm. Puis un volume de 1 ml de cette solution a été incubé avec 10 µl d'échantillon pendant 6 min et une mesure d'absorbance a été réalisée à 734nm (figure 8). Le pourcentage d'inhibition de l'ABTS° a été déterminé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ inhibition ABTS}^\circ = \frac{\text{Abs ABTS} - \text{Abs Ech}}{\text{Abs ABTS}} \times 100$$



**Figure 8** : Protocole de la mesure du statut antioxydant total chez les patients diabétiques.

**III.3. Analyse statistique**

Les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les données expérimentales ont été analysées par le logiciel « STATVIEW : SAS Institute Inc. Version 5 ». L'analyse statistique a été effectuée par le test One-Way ANOVA, pour comparer la différence entre chaque groupe. Les valeurs de  $p < 0,05$  ont été considérées comme significatives.



# **Conclusion**



## **Conclusion**

Les concentrations élevées de glucose observées chez les diabétiques entraînent la formation des espèces réactives de l'oxygène et une réduction des mécanismes de défense cellulaire comme la glutathion réductase et la superoxyde dismutase via la glycation non enzymatique. Cela, engendre un stress oxydant important chez les diabétiques. En effet, plusieurs études ont pu mettre en évidence le rôle du SO dans la pathogenèse du diabète, *in vitro*.

Dans la présente étude, nous avons démontré en clinique, l'effet des sérums de diabétiques sur les GRs à travers la mesure du statut oxydant et antioxydant, à la fois, dans le milieu intra et extracellulaire des érythrocytes de patients diabétiques.

Notre approche expérimentale consiste en premier lieu à évaluer le statut oxydant à l'intérieur et à l'extérieur des globules rouges via la mesure du taux de la MetHb et de l'Hb, ainsi que le statut antioxydant total à travers la mesure du pourcentage d'inhibition du radical ABTS dans le milieu intra et extracellulaire. Également, nous avons effectué une corrélation entre quelques paramètres de la clinique et ceux du SO généré chez les patients diabétiques.

Au terme de cette étude, nous pouvons conclure que chaque progression dans la pathologie diabétique s'accompagne d'une augmentation des taux d'HbA1c et par conséquent une exacerbation du stress oxydant via l'augmentation de l'oxydation de l'Hb en MethHb et une diminution du statut antioxydant total dans le milieu intra et extracellulaire. Les paramètres biochimiques et cliniques tels que : le taux de l'HbA1c, le sexe, le type de traitement ainsi que la durée de la pathologie ont un impact sur la genèse du stress oxydant des patients diabétiques.

Nos résultats obtenus, peuvent expliquer en partie l'implication des GR dans l'amplification du stress oxydant chez les patients diabétiques via l'oxydation de l'Hb et la diminution du statut antioxydant total intracellulaire. Ces résultats prometteurs ouvrent des perspectives intéressantes pour explorer davantage la relation entre le diabète non contrôlé et le stress oxydant ainsi que la prise en charge thérapeutique des patients diabétiques.

# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

- Agourram, T. (2018). La cytologie hématologique cahier N°2. ResearchGate: 31-38.
- Ahmad, G., M. Almasry, A. S. Dhillon, M. M. Abuayyash, N. Kothandaraman and Z. Cakar (2017). "Overview and Sources of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Reproductive System." *Oxidative Stress in Human Reproduction*: 1-16.
- Ahmadi, Z., A. Moradabadi, D. Abdollahdokht, M. Mehrabani and M. H. Nematollahi (2019). "Association of environmental exposure with hematological and oxidative stress alteration in gasoline station attendants." *Environ Sci Pollut Res Int* **26**(20): 20411-20417.
- Belhadj, M., Z. Arbouche, M. Brouri, R. Malek, M. Semrouni, S. Zekri, D. Nadir and S. Abrouk (2019). "BAROMÈTRE Algérie : enquête nationale sur la prise en charge des personnes diabétiques." *Médecine des Maladies Métaboliques* **13**(2): 188-194.
- Bhargava, P., M. J. Ezzell and M. W. Finn (2018). "color atlas of hematology Erythrocytes." **2eme édition**: 50-55.
- Boucelha, L. and R. Djebbar (2014). Les espèces réactives d'oxygène (ROS) : Ou comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?
- Bouzhir, L. (2006). "Study of the bacterial heme-proteins oxygen-sensors FixL and Dos." *ResearchGate*: 8-11.
- Coleman, M. D. (2000). "Use of In Vitro Methaemoglobin Generation to Study Antioxidant Status in the Diabetic Erythrocyte." *Biochemical Pharmacology* **60**: 1406-1416.
- DeBosch, B. J., O. Kluth, H. Fujiwara, A. Schurmann and K. Moley (2014). "Early-onset metabolic syndrome in mice lacking the intestinal uric acid transporter SLC2A9." *Nat Commun* **5**: 46-42.
- Faivre (1998). "Hemoglobine' autooxidation/oxidation mechanisms and methtmoglobine prevention or reduction processes in the bloodstream " *Art. Cells, Bood subs., and Immob. Biotech* **26**: 17-26.
- Frontières, G. d. t. d. l. d. M. S. (2018). "Manuel de laboratoire, Guide pratique à l'usage des techniciens de laboratoire dans des contextes à ressources limitées." *Médecins Sans Frontières*: 408-503.
- Gagneux, P. and A. Varki (1999). "Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function." *Glycobiology* **9**: 747-757.
- Halimi, J. M., S. Hadjadj, V. Aboyans, F. A. Allaert, J. Y. Artigou, M. Beaufils, G. Berrut, J. P. Fauvel, H. Gin, A. Nitenberg, J. C. Renversez, E. Rusch, P. Valensi, D. Cordonnier and N (2008). " Microalbuminuria and urinary albumin excretion. " *Ann Biol Clin (Paris)* **66**(3): 277-284.
- Ighodaro, O. M. (2018). "Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus." *Biomed Pharmacother* **108**: 656-662.
- Javeed, N. and A. V. Matveyenko (2018). "Circadian Etiology of Type 2 Diabetes Mellitus." *Physiology (Bethesda)* **33**(2): 138-150.

Kaser, S., Y. Winhofer-Stockl, L. Kazemi-Shirazi, S. E. Hofer, H. Brath, H. Sourij, G. Vila, H. Abrahamian, M. Riedl, R. Weitgasser, M. Resl, M. Clodi and A. Luger (2019). "Other specific types of diabetes and exocrine pancreatic insufficiency." *Wien Klin Wochenschr* **131**(Suppl 1): 16-26.

Kausar, S., F. Wang and H. Cui (2018). "The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Generation and Its Implications for Neurodegenerative Diseases." *Cells* **7**(12).

Mameri, A., L. Bournine, L. Mouni, S. Bensalem and M. Iguer-Ouada (2021). "Oxidative stress as an underlying mechanism of anticancer drugs cytotoxicity on human red blood cells' membrane." *Toxicol In Vitro* **72**: 105106.

Maritim, A. C., R. A. Sanders and J. B. Watkins (2003). "Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review." *J Biochem Mol Toxicol* **17**(1): 24-38.

Maurya, P. K., P. Kumar and P. Chandra (2015). "Biomarkers of oxidative stress in erythrocytes as a function of human age." *World J Methodol* **5**(4): 216-222.

Mbanya, J. C. and E. Sobngwi (2003). "Diabetes in Africa. Diabetes microvascular and macrovascular disease in Africa." *J Cardiovasc Risk* **10**(2): 97-102.

Medkour, T. (2008). Modélisation Mathématique et Simulation Numérique de la Polymérisation de l'Hémoglobine Drépanocytaire.

Nam, C. (2019). L'ATLAS DU DIABÈTE.

Orban, J. and C. Ichai (2008). "Complications métaboliques aiguës du diabète." *Réanimation* **17**(8): 761-767.

Piconi, L., L. Quagliaro and A. Ceriello (2003). "Oxidative Stress in Diabetes." *Clin Chem Lab Med* **41**: 1144-1149.

Pincemail, J., J. Cillard, J. Neve and J. O. Defraigne (2014). "Determination of the plasma global antioxidant capacity: a critical review." *Ann Biol Clin (Paris)* **72**(4): 413-421.

Pincemail, J., C. L. Goff, C. Charlier, J. Chapelle and J. Defraigne (2009). "Evaluation biologique du stress oxydant Application en routine clinique." *Nutrition & Endocrinologie* 16-23.

Re, O., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-evans (1999). "Antioxydant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." *Free Radical Biology & Medicine* **26**: 1231-1237.

Rehman, K. and M. S. H. Akash (2017). "Mechanism of Generation of Oxidative Stress and Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus: How Are They Interlinked?" *J Cell Biochem* **118**(11): 3577-3585.

Rodbard, H., L. Blonde, S. Braithwaite, E. Brett, R. Cobin, Y. Handelsman and F. Zangeneh (2007). "Endocrin practice." *American association of clinical endocrinologists* **13**: 1-68.

Sherwood, L. (2015). *sherwood Physiologie humaine* 2ed. 2 eme édition: 750.

Sies, H. (2015). "Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine." *Redox Biol* **4**: 180-183.

Tarburton, J. P. (2019). "Methemoglobinization of diabetics blood with ethyl nitrite and hexyl nitrite." *J Clin Endocrinol Res* **1**(1): 24-26.

Wible, D. J. and S. B. Bratton (2018). "Reciprocity in ROS and autophagic signaling." *Curr Opin Toxicol* **7**: 28-36.

Wilson, R., MD, FRCPC and C. E. M) (1991). "Non-insulin-dependent (type II) diabetes mellitus." *Recent advances in pharmacotherapy. Pharmacotherapies nouvelles* **145**: 1571-1581.

Yaribeygi, H., T. Sathyapalan, S. L. Atkin and A. Sahebkar (2020). "Molecular Mechanisms Linking Oxidative Stress and Diabetes Mellitus." *Oxid Med Cell Longev* **2020**: 1-7.

Zaher, Y. (2011). Hemoglobines instables : De la physiopathologie à la thérapeutique. Thèse.

## Résumé

La prévalence du diabète ne fait qu'augmenter dans le monde entier, cette pathologie qui peut être mortelle provoque d'énormes complications chez les personnes atteintes et ce, à cause de la production excessive des espèces réactives de l'oxygène (ERO) générées lors d'un stress oxydatif (SO) important. L'objectif de cette étude consiste à démontrer, pour la première fois en clinique, l'effet des sérums de diabétiques sur les globules rouges (GR) à travers la mesure du statut oxydant et antioxydant, à la fois, dans le milieu intra et extracellulaire des érythrocytes de patients diabétiques. Pour cela, notre étude expérimentale a été réalisée sur 68 patients diabétiques. Les échantillons sanguins de ces patients ont été soumis à différentes analyses, notamment, l'évaluation du statut antioxydant total (test ABTS) et l'estimation du statut oxydant par la mesure des taux de l'hémoglobine intacte (Hb) et oxydée (MetHb) dans le milieu intra et extracellulaire. Parallèlement, nous avons effectué une corrélation entre quelques paramètres de la clinique et ceux du SO généré chez les patients diabétiques. La mesure de la MetHb à l'intérieur des GR a révélé des valeurs très significatives ( $1,7 \pm 0,11$ ) chez les patients présentant une HbA1c élevée. Par contre, nous avons enregistré, chez ce groupe de patient, un statut antioxydant total très faible ( $36 \pm 2,32$  %). Les résultats de l'Hb intacte montrent que le groupe de patients ayant une HbA1c faible ont présenté des teneurs élevées en Hb ( $2,5 \pm 0,009$ ). Nous avons aussi montré que la durée de la pathologie, le taux d'HbA1c, le sexe ainsi que les traitements administrés présentent un impact sur le statut oxydant et antioxydant des patients diabétiques. En conclusion, cette étude a permis de démontrer que le SO commence à l'intérieur des érythrocytes et que le sexe féminin et les patients traités avec de l'insuline sont les plus affectés par le SO et ses complications.

**Mots clés :** Diabète, stress oxydatif, érythrocyte, hémoglobine, méthémoglobine.

## Abstract

The prevalence of diabetes is increasing worldwide, this pathology which can be fatal causes enormous complications in people with the disease due to the excessive production of reactive oxygen species (ROS) generated during significant oxidative stress (SO). The aim of this study is to demonstrate, for the first time in the clinic, the effect of diabetic sera on red blood cells (RBCs) through the measurement of the oxidant and antioxidant status, both in the intra and extra cellular erythrocytes of diabetic patients. For this, our experimental study was carried out on 68 diabetic patients. The blood samples of these patients were subjected to various analyzes, in particular, the evaluation of the total antioxidant status (ABTS test) and the estimate of the oxidative status by the measurement of the levels of intact hemoglobin (Hb) and oxidized (MetHb) in the intra and extra cellular environment. At the same time, we performed a correlation between some clinical parameters and those of the SO generated in diabetic patients. Measurement of MetHb inside RBCs revealed very significant values ( $1.7 \pm 0.11$ ) in patients with high HbA1c. In contrast, this group of patients had a very low total antioxidant status ( $36.232\%$ ). The intact Hb results show that the group of patients with low HbA1c had high levels of Hb ( $2.5 \pm 0.009$ ). We also showed that the duration of the pathology, the level of HbA1c, the sex and the administered treatment have an impact on the oxidant and antioxidant status of diabetic patients. In conclusion, this study demonstrated that SO begins within erythrocytes and that the female sex and insulin-treated patients are most affected by SO and its complications.

**Key words:** Diabetes, oxidative stress, erythrocyte, hemoglobin, methemoglobin.