

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Biologiques de
l'Environnement - Spécialité : Biologie Animale



Réf

.....

Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Thème

**Impact du sérum de personnes diabétiques sur les globules
rouges**

Présenté par :

MIMOUNE Siham et BOUFENICHE Saadia

Soutenu le : **2 Juillet 2019**

Devant le jury:

Mr : AYAD Abdelhanine

Président

Mr : IGUER OUADA Mokrane

Encadreur

Mr : NAIT MOULOUD Mohamad

Examineur

Année universitaire : 2018 / 2019

REMERCIEMENTS

Nous remercions notre grand Dieu le tout Puissant. Dieu nous a garanti la foi, la volonté, la patience, la santé et la confiance afin de mener ce travail à terme.

*Nous tenons à remercier notre promoteur monsieur **IGUER-OUADA MOKRANE**. Il est difficile de résumer en quelques mots tout ce qu'il nous a apporté par son implication tout au long de notre mémoire. Au-delà de ses multiples compétences scientifiques et de son excellente capacité pédagogique, et son écoute. Il a été un promoteur de mémoire attentionné et disponible malgré ses nombreuses charges. Nous apprécier non seulement votre côté scientifique, mais aussi humain, par votre gentillesse, votre humour, votre générosité, et votre optimisme.*

*Nous souhaitons aussi adresser nos remerciements les plus sincères à M. Professeur **AYAD Abdelhanine**, d'avoir accepté de présider le jury et de juger notre travail ; et à monsieur **Nait mouloud** pour l'intérêt qu'il a porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.*

*Nous remercions tout particulièrement **M. Bournine** et **Mme Bournine née Bensalem** pour leur aide durant la réalisation de notre travail, Ils ont été de tout temps disponible avec nous pendant la préparation jusqu'à la finalisation de ce mémoire. Ils ont été et restera un modèle exemplaire dans notre formation.*

*Nous tenons à remercier le chef de service et les fonctionnaires du **la maison des diabétique** et du laboratoire d'analyses médicales Dr **Lalaoui kamel** de Bejaia, Qu'ils veuillent bien recevoir ici l'expression de nos gratitude et notre profond respect.*

*Nous tenons aussi à adresser toute notre gratitude à notre ingénieur de labo **Mme Inouri Ahlem** et tous les doctorants qui ont été montrés toujours présent pour nous donner de l'aide en matière de matériels nécessaires pour effectuer notre pratique dans les bonnes conditions.*

*Enfin, nous tenons également à remercier Mlle **chemlal hanane** pour son aide et ses conseils.*

Merci 

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A ma très chère mère et à la mémoire de mon très cher père

ALLAHYARAHMOU ainsi qu'à ma sœur Haloma

Ma mère, qui a ouvert pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail, aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude

A toute ma famille pour leurs encouragements infaillibles.

A toutes les amies (ma deuxième famille à Bejaia) qui ont rendu mes séjours à la cité si agréables et qui m'ont aidée à supporter l'éloignement de la famille et avec lesquelles j'ai réalisé mon travail où j'ai toujours su entretenir une ambiance chaleureuse et amicale, surtout Saadia, Asma, Amira, Soraya, Hanane et ChahrazedAmira. Je tiens à leur exprimer toute mon amitié et mon respect.

A Dr NEKHOUL Malika pour son soutien et encouragement.

A mes chers Nehla, Meriem et Chimo pour leurs gentillesse et leurs soutien.

A ma collègue de travail Saadia

A ceux et celles qui me souhaitent toujours le bonheur dans ma vie

A tous mes enseignants

En témoignage du respect et de la profonde et éternelle gratitude que je leurs porte.

A tous ceux qui m'aiment.

A tous ceux que j'aime.

Sihoma

Dédicaces

*Je dédie ce mémoire, étant le point final de nombreuses
années d'études :*

A Ma mère que Allah vous protège et vous garde pour nous.

*A mon future marie Tahar qui a été d'une grande patience
avec ses encouragements inépuisables, que Allah le garde à
mes côtés et le prête une longue et heureuse vie*

*A mes chères sœurs : Lamai ; Nadia ; Kahina ; Hamida ; Sarah
et leur maris Ahsen ; Nassim : Ilyas ; Amara .*

A mes adorables amies pour leur fidélité: Sihoma ; Cilia ;

Fatiha ; Horia ; Kenza ; Soraya; Amira ;

Asma ; Kahina ; Hanan; Amira chahrazed.

A mes chers beaux-parents Nadia et Ferhat pour leur soutien.

*A ma collègue de travail binomti (Sihoma), qu'elle trouve ici
mon respect le plus profond.*

saadia

Liste des tableaux

Tableau I: Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Sies <i>et al.</i> , 2017).....	7
Tableau II : Tableau regroupant les appareilles utilisées lors de l'expérimentation.....	16
Tableau III : Les différent taux d'HbA1c des échantillons utilisés lors des expérimentations. (anexe1)	

Liste des figures

Figure1 : Le stress oxydant induit par un déséquilibre entre pro-oxydant et système antioxydat (Bonnefont-Rousselot,2004).....	6
Figure 2 : Principaux sites cellulaires de productions des ERO (Sekli, 2011).....	8
Figure 3 : Représentation selon la projection de Fischer du glucose et de sa forme ène-diol (Thornalle et <i>al.</i> , 1999).....	10
Figure 4 : Relations entre hyperglycémie et stress oxydant (Bonnefont et <i>al.</i> ,2004).....	12
Figure 5 : Protocole de dénaturation et d'oxydation d'hémoglobine (Oprea, 2006) avec modification.....	18
Figure 6: Protocole expérimental d'étude du potentiel oxydatif des sérums des diabétiques sur les globules rouges. (Aad et <i>al.</i> , 2012, Rizvi and Pandey, 2010, Tsuchiya et <i>al.</i> , 2002) avec modification.....	21
Figure7 : Protocole expérimental de la peroxydation lipidique (Devasagayam et <i>al.</i> , 2003) avec modification	24
Figure 8 : La concentration en hémoglobine après 2h et 24h d'incubation.	25
Figure 9 : La turbidité cellulaire après 24 et 48h d'incubation, des différents échantillons étudiés sous l'effet de différent taux d' HbA1c.....	26
Figure 10: l'hémoglobine libérée après 24 et 48h d'incubation, correspondant aux différents échantillons étudiés sous l'effet de différent taux d' HbA1c....	27
Figure 11: l'hémoglobine intracellulaire après 24 et 48h d'incubation, correspondant aux différents échantillons étudiés sous l'effet de différent taux d' HbA1c.....	28
Figure 12: l'hémoglobine intracellulaire oxydée après 24 et 48h d'incubation, correspondant aux différents échantillons étudiés sous l'effet de différent taux d' HbA1c.. ..	29
Figure13 : images représentatives de la morphologie des globules rouge.....	30
Figure 14 : La concentration des MDA après 48h d'incubation, correspondant aux différents échantillons étudiés sous l'effet de déférent taux d' HbA1c.	31

Liste des abréviations

AAPH : 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride

ADA : Association Américaine du diabète

ADN mt : L'ADN mitochondriale

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNn : ADN nucléaire

AVC : accident vasculaire cérébral

DAG : diacylglycérol

DID : diabètes insulino-dépendants

DNID : diabètes non insulino-dépendants

DT1 : Diabétique de type 1

DT2 : Diabétique de type 2

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

ERO : espèces réactives de l'oxygène

GR : globule rouge

GSH : Glutathion réduit

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

Hb : Hémoglobine

HbA1c : Hémoglobine glyquée

HO₂ : Hydroperoxyl

HOCl : Acide hypo-chlorure

LDL : Lipoprotéines de basse densité

MDA : Malondialdéhyde

metHb : méthémoglobine

MODY : diabète de type adulte chez le jeune

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NO : monoxyde d'azote

NO₂ : dioxyde d'azote

NOS : oxyde nitrique synthase

O[•] : Oxygène singulet

O₂^{•-} : anion superoxyde

O₃ : Ozone

OH : Hydroxyl

OMS : Organisation mondiale de la santé

ONOO : anion peroxyinitrite

PKC : la protéine kinase C

RCIS : Chloride Reactive Species

RO: Alkoxy

RO₂ :Peroxy

ROS : radical oxygene species

TBA :Thiobarbituric acid

TBARS:Thiobarbituric acid reactive substances

TCA:Trichloroacetic acid

UV : ultra violet

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

LISTE DES ABREVIATIONS

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I.	Diabète.....	2
	1. Définition	2
	2. Classification	2
	2.1. Les diabètes primaires.....	2
	2.1.1. Le diabète de type 1	2
	2.1.2. Le diabète de type 2.....	2
	2.1.3. Le diabète gestationnel.....	3
	2.2. Les diabètes secondaires	3
	3. Complications du diabète	4
	3.1. Complications aiguës	4
	3.1.1. L'Acidose lactique.....	4
	3.1.2. Le coma hyperosmolaire	4
	3.2. Les complications chroniques.....	4
	3.2.1. Microangiopathie	4
	3.2.2. Neuropathie.....	5
	3.2.3. Rétinopathie	5
	3.2.4. Néphropathie.....	5
	3.2.5. La Macroangiopathie diabétique.....	5
II.	Stress oxydatif	
	1. Définition	6
	2. Les principaux radicaux libres.....	6

3. Formation des dérivés actifs de l'oxygène	7
4. Les cibles des radicaux libres	8
4.1. Dommages de l'ADN	8
4.2. Oxydation des protéines.....	9
4.3. Peroxydation lipidique.....	9
5. Défenses anti-oxydantes.....	9
III. Diabète et stress oxydatif	
1. L'auto-oxydation du glucose	10.
2. La voie des polyols.....	10
3. La voie de la PKC.....	11
4. La glycosylation non enzymatique ou glycation.....	11
IV. Modèles d'étude du stress oxydant	
1. Modèles cellulaires.....	13
1.1. Le globule rouge.....	13
1.2.L'hémoglobine	14

MATERIEL ET METHODES

I Matériels.....	15
I.1. Matériels biologiques.....	15
I.1.1. Sérums des diabétiques.....	15
I.1.2. Globules rouges	15
I.2. Produits chimiques	16
I.3. Appareillages	16
II METHODES	17
II.1. Etude de l'effet oxydant sérum des diabétiques sur l'oxydation et la dénaturation de l'hémoglobine.....	17
II.1.1. La préparation des sérums des diabétiques	17
II.1.2. Prélèvement et préparation de l'Hb.....	17
II.1.3. Protocole de la dénaturation et de l'oxydation de l'Hb	17

II.2. Etude de la cytotoxicité membranaire de sérum des diabétiques sur les globules rouges humains.....	19
II.2.1. Prélèvement et préparation du sang.....	19
II.2.2. Etude de l'effet oxydant	19
II.2.2.1. Test de turbidité cellulaire	19
II.2.2.2. Test de dosage de l'hémoglobine libérée.....	19
II.2.2.3. Dosage de l'hémoglobine intracellulaire	20
II.2.2.4. Dosage de l'hémoglobine intracellulaire oxydée	20
II.2.3. Etude morphologique.....	22
II.2.4. Évaluation de la peroxydation lipidique	22
II.3. Analyse statistiques.....	25

RESULTATS ET DISCUSSION

I Résultats	26
I.1. Résultats de l'étude sur l'hémoglobine	26
I.1.1. Etude de l'oxydation de l'hémoglobine par les sérums des diabétiques	26
I.2. Résultats de l'étude sur les globules rouges	27
I.3. Peroxydation lipidique	32
II Discussion.....	33
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	37

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

RESUME

Introduction

INTRODUCTION

Le diabète communément appelé diabète sucré est une maladie métabolique qui se traduit par une augmentation chronique du taux de glucose (sucre) dans le sang (hyperglycémie) (**Annik et al., 2012**), et qui produit des dommages à long terme avec plusieurs complications. Cette hyperglycémie chronique est source d'un stress oxydant, qui est défini comme un déséquilibre entre espèces pro-oxydantes et antioxydants en faveur des premières (**Fang et al., 2002**). Le stress oxydant va participer au dysfonctionnement cellulaire et favoriser le développement de pathologies associées au diabète (**Johansen et al., 2005**).

Plusieurs modèles ont été explorés pour l'étude du stress oxydant. Ces modèles comportent l'utilisation des animaux, d'organes isolés, de la culture cellulaire ou encore des cellules isolées. Le globule rouge est une cellule anucléée entourée d'une membrane cytoplasmique, dont le composant principal est l'hémoglobine. Ce dernier assure le transport de l'oxygène vers tous les tissus de l'organisme (**Ribeil, 2010**). Ces propriétés rendent le globule rouge un excellent modèle d'étude du stress oxydant (**Fruehauf and Meyskens, 2007**). En effet, il présente un avantage pour son accessibilité et sa facilité d'emploi (**Arbos et al., 2008**).

L'objectif de ce présent travail consiste à mettre en évidence les mécanismes d'amplification du stress oxydatif induit par l'hyperglycémie chronique au niveau des globules rouges en utilisant la co-incubation de sérum des personnes diabétiques avec les hématies.

Notre approche vise à évaluer l'effet oxydant des sérums sur les globules rouges par la mesure de la concentration cellulaire, l'évaluation du stress oxydant à travers le dosage des produits de la peroxydation lipidique et la mise en évidence de l'oxydation et la dénaturation de l'hémoglobine par le sérum des diabétiques. Nous visons particulièrement la mesure de ces paramètres à l'intérieur du globule rouge.

Synthèse bibliographique

Chapitre I:

DIABETE

I. Diabète

1. Définition

Le diabète sucré est une maladie chronique caractérisée par une hyperglycémie pathologique. A long terme, ce sont les complications qui font la gravité de la maladie. (Perlemuter *et al.*, 2000). Selon l'OMS, le diabète est un groupe de troubles métaboliques, et endocriniens multiples résultant d'un dysfonctionnement de la sécrétion d'insuline ou une sensibilité réduite des tissus à l'insuline, les deux conduisant à un métabolisme altéré des hydrates de carbone, des lipides et des protéines (Bading Taika *et al.*, 2018).

2. Classification

La classification du diabète a longuement été revue et révisée depuis sa première classification en 1979. Finalement, l'Association Américaine du diabète (ADA) a proposé de nouveaux critères de diagnostic ainsi qu'une nouvelle classification selon laquelle le diabète est primaire ou secondaire.

2.1. Les diabètes primaires

Les diabètes primaires sont classés en 3 types : le diabète du type 1 (environ 5 à 10% de la population diabétique), le diabète du type 2 (90 à 95%) et le diabète gestationnel.

2.1.1. Le diabète de type 1

Autrement appelé diabète maigre, juvénile ou encore insulino-dépendant, il s'agit d'une destruction des cellules du pancréas qui aboutit à la disparition progressive et finalement quasi-complète de la sécrétion de l'insuline. Par conséquent, le taux de sucre dans le sang s'élève au-dessus du taux normal qui est de 1,26 g/L (La Mutualité Socialiste-Solidaris, 2011).

2.1.2. Le diabète de type 2

Autrefois appelé diabète non insulino-dépendant est liée à l'insulino-résistance périphérique, à l'insulinopénie ou à l'association des deux derniers à des degrés divers. Ce type de diabète est le résultat des facteurs génétiques, dont l'expression dépend de facteurs de l'environnement, il s'accompagne comme le diabète de type 1 d'un risque de complications microvasculaires et rénales, mais sa gravité tient surtout à la survenue de complications

cardiovasculaires, ces dernières sont la principale cause de décès des patients diabétiques de type 2 (**Bush et Pignet, 2001**).

2.1.3. Le diabète gestationnel

Le diabète gestationnel est défini comme une intolérance au glucose qui est découverte au cours de la grossesse quel que soit le terme et quel que soit son devenir après l'accouchement. Ce type de diabète survient surtout pendant le 2^e ou 3^e trimestre de la grossesse où les besoins en insuline sont beaucoup plus importants qu'en temps normal. De plus, certains facteurs tels que les hormones de croissance et placentaires diminuent l'action de l'insuline (**Landon et al., 2009**).

2.2. Les diabètes secondaires

Les autres types de diabètes sont souvent appelés diabètes spécifiques, puisqu'ils sont liés à une cause bien définie. Ces causes peuvent être de nature génétique, comme le diabète MODY (Maturity Onset Diabetes Of the Young), et affecter la fonction des cellules pancréatiques. Le diabète secondaire peut aussi découler de l'évolution d'une autre maladie, tels que les maladies endocrines (Syndrome de Cushing, hyperthyroïdie), les maladies du pancréas (pancréatite, cancer du pancréas) et les maladies du foie (cirrhose, hépatite C). Certains médicaments comme les corticoïdes peuvent aussi induire ce type de diabète (**Stumvoll et al., 2005**).

3. Complications du diabète

Le diabète conduit fréquemment à l'apparition de deux sortes de complications aiguës et chroniques.

3.1. Complications aiguës

3.1.1. Hypoglycémie

Est une concentration en glucose dans le sang anormalement basse ; elle est définie par une valeur inférieure à 3,3 mmol/L

Les hypoglycémies ont plusieurs ordres de causes ; tels que des erreurs de régime alimentaire et du traitement ou un traumatisme sont souvent en cause (**Ardigo et Philippe, 2008**).

3.1.2. L'Acidose lactique

C'est un accident métabolique rare et grave ou un trouble de l'équilibre acido-basique corporel, due à un excès de lactates. Il s'observe surtout chez des sujets âgés traités par les biguanides et/ou atteints d'insuffisance rénale, hépatique ou cardiaque (**Orban, 2006**).

3.1.3. Le coma hyperosmolaire

Est dû à une perte hydrique ou hyperglycémie prolongé suffisante pour entrainer une déshydratation et insuffisance rénale fonctionnelle qui provoque une élévation importante du seuil rénale du glucose (**Menon et Ribeiro, 2012**).

3.2. Les complications chroniques

Généralement ces complications sont liées à l'hyperglycémie chronique et aux facteurs de risque cardio-vasculaires associés ainsi que des dommages à l'oeil (rétinopathie), les reins(néphropathie),les nerfs périphériques (neuropathie), et les vaisseaux sanguins(athérosclérose)(**Stratton et al., 2001**).

3.2.1. Microangiopathie

La microangiopathie diabétique résulte de la glycation des protéines des capillaires aboutissant à leur fragilité, une augmentation de perméabilité ou à leur occlusion (**Vichova et al., 2009**).

3.2.2. Neuropathie

C'est la complication la plus fréquente, caractérisée par une atteinte du système nerveux périphérique c'est à dire des nerfs moteur et sensitifs des membres (**Gourdi et al.,2011**).

3.2.3. Rétinopathie

Cette pathologie correspond à une atteinte de la microcirculation rétinienne et Choroïdienne due à l'hyperglycémie chronique. La rétinopathie diabétique vient en deuxième position après la neuropathie diabétique, elle est présente chez 90 % des diabétiques après 20 ans d'évolution d'un diabète déséquilibré (Fong et al., 2004).

3.2.4. **Néphropathie**

La néphropathie diabétique est une complication fréquente et dangereuse du diabète. Elle touche environ 40% des personnes diabétiques. La néphropathie résulte d'un épaissement de la membrane glomérulaire associé à une atteinte des artères afférentes, qui vont perturber la fonction de filtration du rein. (**Gross et al., 2005**).

3.2.5. **La Macroangiopathie diabétique**

Il s'agit de complications macrovasculaires ; constituent les maladies cardiaques (cœur), l'accident vasculaire cérébral AVC (cerveau) et les maladies artérielles périphérique (pieds et autres)

La macroangiopathie s'aggrave quand le diabète est associé à une hypertension artérielle et une dys-lipidémie (**Auberval, 2010**).

Chapitre II :
Stress oxydatif

II : Stress oxydatif

1. Définition

Le stress oxydatif est un déséquilibre de la balance pro oxydants /antioxydants en faveur des premiers (Bonnefont-Rousselot, 2004) qui entraîne des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires: les lipides avec altérations des membranes cellulaires, les protéines avec l'altération des récepteurs et des enzymes, les acides nucléiques avec un risque de mutation et de cancérisation (Gueye, 2007;Sergent *et al.*, 2000). Ce déséquilibre provient, soit d'une production exagérée d'agents oxydants (radicaux libres et ROS), soit d'une altération des mécanismes de défense (Pelletier *et al.*, 2004).

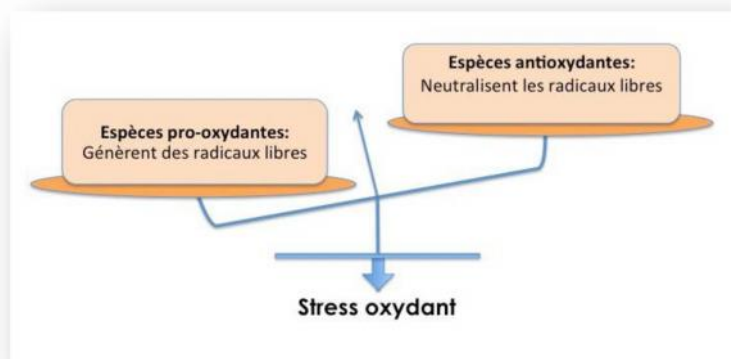


Figure1 : Le stress oxydant induit par un déséquilibre entre pro-oxydant et système antioxydant(Bonnefont-Rousselot,2004)

2. Les principaux radicaux libres

La réactivité chimique des radicaux libres est variable selon la molécule considérée, mais pour la plupart ce sont des puissants oxydants et dans la majorité ce sont des dérivées de l'oxygène, d'où le nom d'espèces réactives de l'oxygène (ROS en anglais : *radical oxygen species*) (Gardès*et al.*,2003).

Il ne faut pas penser que tous les radicaux de l'oxygène sont extrêmement réactifs, cette réactivité étant très variable selon la nature du radical. Ainsi parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l'anion radicalaire superoxyde (O_2^-) et le monoxyde d'azote (NO) ne sont pas très réactifs, mais constituent des précurseurs d'autres espèces plus réactives (Favier, 2003).

Chapitre II : Stress oxydatif

Il existe trois principales familles des radicaux libres, il s'agit des formes réactives de l'oxygène (*Reactiveoxygenspecies (ROS)*), des oxydants chlorés (*ChlorideReactiveSpecies(RCLS)*) (Morena *et al.*, 2002) et d'autres espèces radicalaires comportent de l'azote et sont appelées les espèces azotées actives. Dont elles sont dérivées du monoxyde d'azote (NO) viales systèmes enzymatiques (l'oxyde nitrique synthase ou NOS en anglais : *nitrique oxide synthase*). Le monoxyde d'azote (NO) est synthétisé à partir d'une molécule d'oxygène et d'un atome d'azote obtenu de l'acide aminé L-arginine, en réaction avec l'oxygène ou l'anion superoxyde (O_2), le NO peut former respectivement le dioxyde d'azote (NO_2) et l'anion peroxynitrite (ONOO) qui sont plus réactifs (Marnett *et al.*, 2003).

Tableau II : les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Sies *et al.*, 2017).

Espèces réactives de l'oxygène (ROS)	
Radical	Non-radical
Superoxyde O_2	
Hydroxyl OH	Peroxyde d'hydrogène H_2O_2
Peroxyl RO_2	Acide hypo-chlorure HOCl
Alkoxy RO	Ozone O_3
Hydroperoxy HO_2	Oxygène singulet O-

3. Formation des dérivés actifs de l'oxygène

Le déséquilibre entre espèces pro-oxydantes et anti oxydantes peut avoir une origine endogène, dû à un dysfonctionnement des sources de production de ROS ou de leur système d'élimination. Les radicaux libres endogènes sont produits de la chaîne respiratoire mitochondriale l'inflammation, l'exercice excessif, l'ischémie, l'infection, le cancer et le vieillissement, ou une origine exogène liée le plus souvent à une mauvaise hygiène de vie. Parmi les sources exogènes, on peut citer le tabagisme, l'alcool ou la consommation d'huiles oxydées ainsi que des agents physiques tels que les UV, la chaleur ou certains polluants.

De plus certain métaux tels que le cuivre ou le fer, lorsqu'ils sont apportés en excès peuvent générer des ROS (Birben *et al.*, 2012)

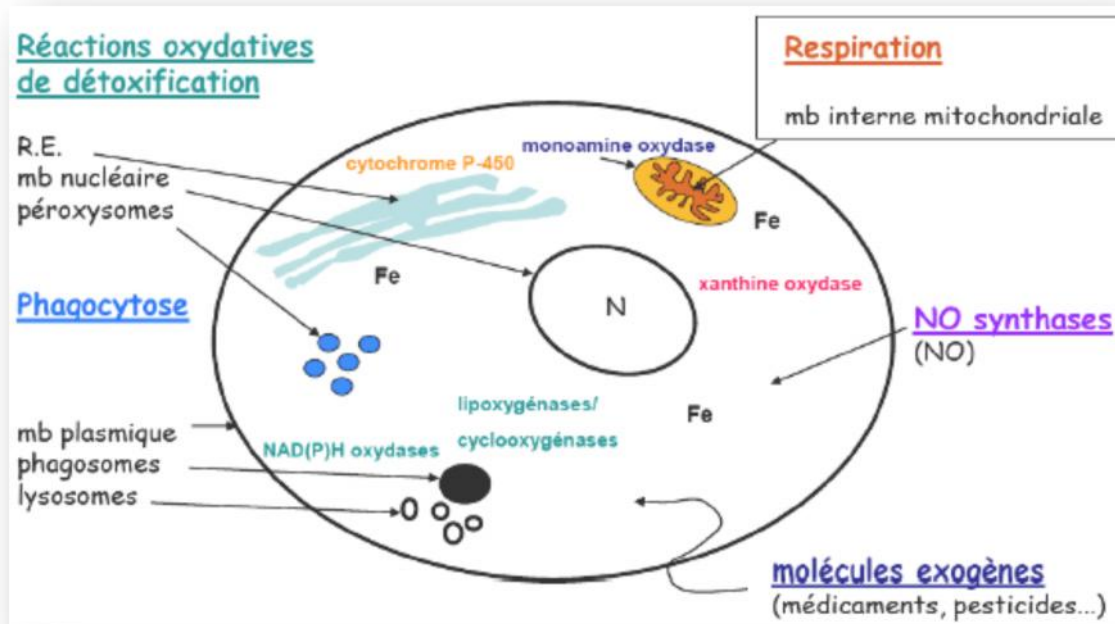


Figure 2 : Principaux sites cellulaires de productions des ERO (Sekli, 2011)

4. Les cibles des radicaux libres

L'accumulation des ERO dans les cellules contribue à des lésions de divers composants, y compris les acides nucléiques (Dekaet *al.*, 2011), les protéines (Squier, 2001) et les lipides, et aussi des lésions secondaires dues au fonction cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de peroxydation lipidique (Michel *et al.*, 2008).

4.1. Dommage de l'ADN

L'ADN est une cible privilégiée pour les ERO, l'ADN mitochondriale (ADN mt) est plus exposé à cette oxydation que l'ADN nucléaire (ADNn) du fait qu'il est à proximité de la chaîne respiratoire mitochondriale génératrice des ERO avec 2 à 3 fois plus de bases oxydées au niveau de l'ADNmt qu'au niveau de l'ADNn. Cette interaction induit des cassures mono et double brin de l'ADN, l'oxydation des bases, des interactions protéines-ADN, la formation de sites abasiques et d'adduits intra-caténaux (Cadet *et al.*, 2002).

4.2. Oxydation des protéines

Les ERO peuvent entraîner l'oxydation des acides aminés présents dans les protéines et généralement les acides aminés aromatiques et ceux qui présentent des groupes sulfhydryle ou méthionine, cette oxydation provoque leur modification, fragmentation de la chaîne peptidique, agrégation de produits d'interaction protéines-ERO, modification des charges électriques, perte des fonctions enzymatiques, modifications de la structure protéique, et des interactions protéine-protéine (Sies *et al*, 2017). Les protéines modifiées par oxydation deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Barnoud *et al*, 2007).

4.3. Peroxydation lipidique

L'oxydation des lipides membranaires et cellulaires, appelé peroxydation lipidique est un phénomène qui aboutit à la formation de différents dérivés lipidiques par oxydation des acides gras polyinsaturés, présents dans les phospholipides, qui sont la cible privilégiée du radical hydroxyle, induisant des altérations de la fluidité et de la perméabilité membranaire, un dysfonctionnement de nombreux récepteurs, enzymes et transporteurs membranaires (Sies *et al*, 2017).

5. Défenses anti-oxydantes

Les antioxydants sont des substances qui peuvent protéger les cellules des dégâts causés par des radicaux libres. Les antioxydants interagissent et stabilisent des radicaux libres et peuvent empêcher leur dégâts (Shinde *et al*, 2012).

Les antioxydants existent dans les cellules vivantes, soit enzymatique (le superoxyde dismutase, le glutathion peroxydase et la catalase) ou non-enzymatique (comme le glutathion et l'acide urique) comme des boueurs de ROS, pour empêcher les dégâts oxydatifs des membranes biologiques. À côté de ces antioxydants trouvés dans les cellules il y a les antioxydants naturels existant dans les légumes et la majeure partie d'entre eux incluant la vitamine A, la vitamine C, la vitamine E et les caroténoïdes (Pieme *et al*, 2017).

Chapitre III :

Diabète et stress oxydatif

III : Diabète et stress oxydatif

L'hyperglycémie génère des espèces réactives de l'oxygène qui sont responsables des dommages de l'ADN, des protéines et des lipides (Evans *et al*, 2003).

La toxicité du glucose conduit à la formation des ROS par plusieurs mécanismes : le phénomène d'auto-oxydation du glucose, la voie des polyols, la voie de la PKC et la glycation des protéines avec formation des produits avancés de fin de glycation (AGEs) (Benhamou, 1991).

1. L'auto-oxydation du glucose

L'auto-oxydation du glucose a été décrite par Wolff et Dean (1987). Le glucose dans sa forme linéaire (projection de Fischer) possède une fonction aldéhyde et une fonction hydroxyle adjacente en équilibre avec la forme ène-diol.

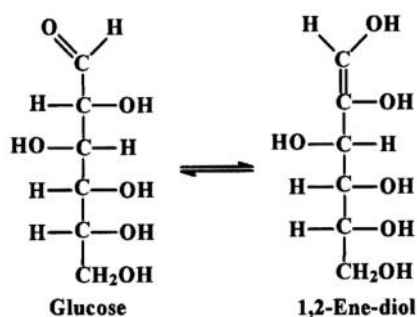


Figure 3 : Représentation selon la projection de Fischer du glucose et de sa forme ène-diol (Thornalley *et al*, 1999).

C'est sous cette dernière forme que le glucose est capable de s'oxyder en présence de métaux de transition, aboutissant à la formation d'un radical anionique ène-diol. Ce radical peut ensuite réagir avec l'oxygène pour libérer des anions superoxydes. Au cours de cette réaction, il y a formation d' -cétoaldéhyde, qui peut réagir avec des métaux de transition via la réaction Fenton pour former des radicaux hydroxyles très réactifs (Wolff *et al*, 1991).

2. La voie des polyols

A l'état de normo glycémie, le glucose est transformé par l'hexokinase en glucose-6-phosphate pour rejoindre la glycolyse et la voie des pentoses phosphates. Cependant, en présence d'un excès de glucose, l'hexokinase est saturée (Gonzalez *et al*, 1984). Le glucose, de ce fait, s'accumule dans les tissus périphériques et active la voie des polyols.

Dans cette voie, le glucose est réduit en sorbitol par l'aldose réductase, qui n'est activée qu'en présence d'une hyperglycémie, car elle possède une faible affinité pour le glucose (**King et Brownlee, 1996**). La réaction a lieu en présence du cofacteur NADPH, H⁺ issu de la voie des pentoses phosphates. Le sorbitol est ensuite oxydé en fructose en présence de NAD⁺ par le sorbitol déshydrogénase. Le sorbitol, qui ne peut pas franchir la membrane plasmique, s'accumule dans la cellule, et augmente la pression osmotique, entraînant une hyperosmolarité intracellulaire (**Burg, 1995**). La production accrue de fructose par cette voie peut également stimuler la formation des AGEs grâce au plus grand pouvoir réducteur du fructose par rapport au glucose (**Suarez et al, 1988**).

L'activation de cette voie peut avoir des effets délétères (**Brownlee, 2001**). La principale conséquence est la modification du statut redox intracellulaire résultant de la déplétion intracellulaire de NADPH, H⁺, au détriment du fonctionnement de nombreuses enzymes antioxydants comme la glutathion-réductase, l'ascorbate-réductase et la NOS qui utilisent ce cofacteur (**Bravi et al, 1997**). Cette baisse de cofacteur augmente la sensibilité de la cellule au stress oxydant (**Brownlee, 2005**).

3. La voie de la PKC

Une hyperactivité de la protéine kinase C au cours du diabète dans de nombreux tissus est une des hypothèses avancées (**King et Brownlee, 1996**). L'hyperglycémie induit une synthèse accrue de diacylglycérol (DAG) à partir des intermédiaires de la glycolyse (**Xia et al, 2006**). L'augmentation de l'activité de l'enzyme induit une augmentation de l'expression des gènes néfastes pour la cellule et au contraire, diminue celle des gènes bénéfiques (**Brownlee, 2005**). L'activation de la PKC va entraîner l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par l'augmentation de l'activité NADPH oxydase (**Banerjee et al., 2013**)

4. La glycosylation non enzymatique ou glycation

Un autre rôle cytotoxique du glucose concerne la glycation lente non enzymatique des protéines (**Brownlee et Cerami, 1981**). C'est une réaction covalente qui attache, sans l'intervention d'enzyme, des résidus glucose aux NH₂ libres des protéines ou d'un acide aminé, le plus souvent une lysine, ce qui permet la formation d'une base de Schiff qui se réarrange en produit d'Amadori. Cette réaction est très dépendante du temps d'exposition au sucre et de la concentration de celui-ci. La formation de ces composés est réversible (**Brownlee et al, 1984**). Par la suite, les produits d'Amadori se dégradent irréversiblement en

Chapitre III : Diabète et stress oxydatif

-céto-aldéhyde comme le 1 et 3-désoxyglucosone, qui peut encore réagir avec des protéines pour former des adduits fluorescents appelés produits de Maillard (**Monnier, 1989**).

Les produits de Maillard sont aussi appelés produits de glycation avancées (AGEs) et sont fortement mutagènes. De plus, ils ne peuvent pas être détruits car le protéasome ne peut détruire les protéines glyquées. Ces produits s'accumulent alors dans la cellule et peuvent entraîner un dysfonctionnement de son métabolisme, finissant par engendrer sa mort.

La formation d'AGEs est dépendante des ROS, elle est augmentée par la production de MDA et par la diminution de GSH réduit (**Jain et Palmer, 1997**). Une fois formées, Les AGE sont capables aussi de produire des radicaux libres oxygénés par interaction avec des récepteurs spécifiques (RAGE) et induire un stress oxydant (**Bonnefont-Rousselot, 2004**). La glycation touche des protéines comme l'albumine, les immunoglobulines, le fibrinogène, le collagène et les LDL. La protéine glyquée la plus connue est l'hémoglobine glyquée, HbA1c dont le taux est utilisé en clinique comme indice du contrôle métabolique de la glycémie (**Koenig et al, 1988**).

Ces AGE modifient non seulement la fonction de la protéine glyquée mais forment aussi des agents qui se lient à d'autres protéines, tel le collagène et autres protéines de la matrice extracellulaire dont les fonctions se trouvent ainsi altérées avec des conséquences délétères sur les tissus vasculaires, cardiaques et rénaux (**Dali-Youcef., 2010**).

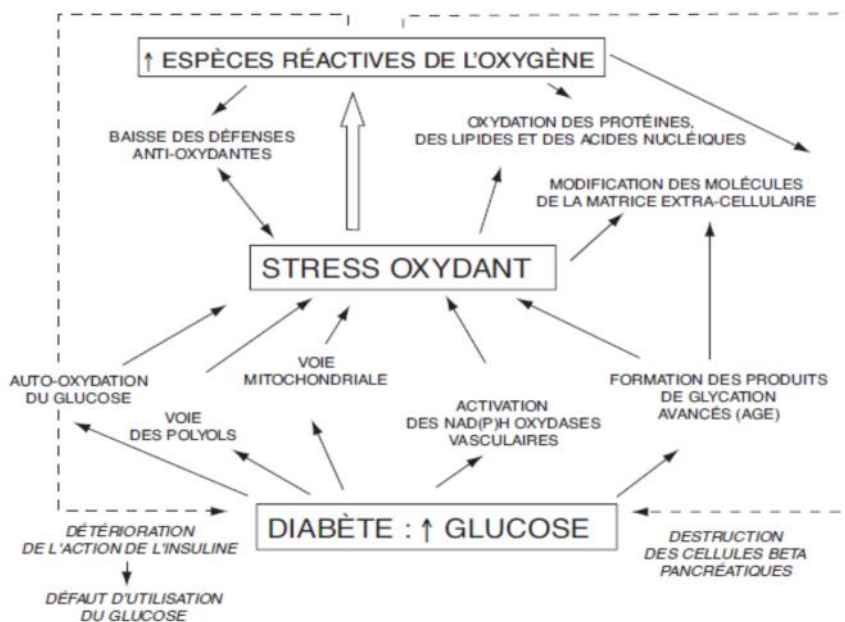


Figure 4 : Relations entre hyperglycémie et stress oxydant (**Bonnefont et al, 2004**)

Chapitre IV :

Modèles d'étude du stress oxydant

IV : Modèles d'étude du stress oxydant

La production des espèces réactives de l'oxygène c'est des processus physiologiques de la vie de la cellule. Aujourd'hui, il est aussi admis que l'installation du stress oxydatif qui est responsable à l'apparition d'un grand nombre de maladies qui possèdent un caractère radicalaire, tels que le diabète, l'hypertension, les maladies cardiovasculaires, les pathologies neuro-dégénératives, les cancers, etc (Del Valle, 2011).

Les scientifiques n'ont cessé de développer de nouveaux modèles d'études qui débutent en général par un modèle cellulaire afin de mieux comprendre les processus pathologiques chez l'homme.

1. Modèles cellulaires

1.1. Le globule rouge

Le stress oxydatif induit par le diabète provoque des variations importantes qui apparaissent dans la membrane plasmique des érythrocytes (Sushil et al.,1989) dont : diminution de la fluidité et la déformabilité (Babu et Singh,2004), augmentation de la teneur en cholestérol total, de la teneur en phospholipides, du rapport cholestérol / phospholipides, la peroxydation lipidique, et diminution du nombre de récepteurs à l'insuline, les variations de l'activité et des propriétés enzymatiques (Jana Viskupicova et al.,2015)

Les globules rouges peuvent être considérés comme des piègeurs mobiles des radicaux libres, ils peuvent assurer une protection antioxydante non seulement pour eux-mêmes mais aussi à d'autres tissus et organes du corps (Siems et al., 2000). En dépit de posséder un très puissant et efficace système antioxydant, les érythrocytes sont les plus vulnérables aux phénomènes oxydants (Neupane et al., 2008), elles sont constamment sous conditions de stress. Leur rôle physiologique de transporteurs d'oxygène rend leur environnement cellulaire riche en oxygène et en hémoglobine (Hb). Au cours de la fixation réversible de l'oxygène, le fer est maintenu à son état réduit (fer ferreux) (Low et al., 2008). Cependant, des fluctuations occasionnelles spontanées du centre conformationnel de l'oxyHb permettent à l'eau ou à de petit anion de pénétrer, aboutissant à un transfert d'électron du fer à l'oxygène pour produire la metHb et l'anion superoxyde (Winterbourn, 1990). La dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène par la superoxyde dismutase constitue la principale source du peroxyde d'hydrogène dans les globules rouges (Low et al., 2008). L'accumulation du peroxyde d'hydrogène diminue la demi-vie des érythrocytes à cause de la peroxydation des

phospholipides membranaires mais aussi par l'oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine (Neupane *et al.*, 2008), laquelle contient du fer à l'état ferrique oxydé, incapable de fixer l'oxygène (Low *et al.*, 2008).

1.2.L'hémoglobine

L'hémoglobine (Hb) est l'une des protéines héminiques la plus spécialisée et la plus répondeuse, plus de 95% des protéines du cytoplasme des hématies est représenté par l'Hb (Çimen, 2008). Les globules rouges contiennent des teneurs très importantes de NO dans la circulation du fait de leur quantité élevée en Hb. L'OxyHb convertit le NO en nitrate, où le HbFe^{2+} se lie au NO pour former le $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$. Les jonctions intercellulaires de l'endothélium permettent le passage de la molécule Hb vers l'espace extravasculaire. En quittant la circulation, la molécule Hb tetramérique agit comme un piègeur efficace à l'égard du NO. La forte concentration intra-érythrocytaire en Hb fait que le fer ferreux de l'Hb soit exposé à des concentrations élevées en oxygène de façon continue, ainsi, un taux faible d'auto-oxydations peut produire d'importantes quantités de ROS; des réductions occasionnelles de l' O_2 en O_2^- s'accompagnent par l'oxydation de l'Hb en metHb. D'autre part, l'auto-oxydation de l'OxyHb donne la metHb ainsi que l' O_2^- qui se dismute en H_2O_2 (Giulivi & Daviess, 1990).

Partie expérimentale

Chapitre V :
Matériel et méthodes

Ce travail consiste à mettre en évidence le potentiel oxydant résultant de la maladie diabétique. Dans notre approche, nous avons eu recours à l'utilisation des globules rouges comme modèle d'étude, dans le but d'évaluer les dommages oxydants sur la membrane lipidique est aussi sur l'intérieur de la cellule. Pour évaluer ces effets après incubation de globules rouges sains avec des sérums de diabétiques, nous avons mesurer la turbidité cellulaire (concentration cellulaire), l'hémoglobine libérée (concentration de l'Hb extracellulaire) et l'hémoglobine oxydée à l'intérieur de la cellule, tout en mesurant le niveau du stress oxydatif. Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire associé en écosystèmes marins et aquacoles à l'Université Abderrahmane Mira de Bejaia.

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

1.1.1. Sérums des diabétiques

La collecte des prélèvements sanguins et des données de cette étude est réalisée à la Maison du Diabétique (Beau Séjour) de Béjaïa, et au niveau de laboratoire d'analyses médicales de Béjaia.

Les informations concernant les malades ont été récoltées dans le service informatique avec :

- Informations générales (sexe, âge, type de diabète, complications et autres pathologies associées comme les maladies cardiaques, maladies vasculaire).
- Bilan biochimique (le taux d'hémoglobine glyquée HbA1c).

Les prélèvements sanguins sont effectués au niveau du laboratoire de la maison du diabétique pour le taux d'hémoglobine glyquée tout les 3mois. Les échantillons collectés conditionnés à froid dans une glacière sont acheminés au laboratoire de l'université le plus tôt possible pour effectuer la séparation des sérums. La classification de chaque échantillon est effectuée en fonction de l'hémoglobine glyquée en 3 classes: HbA1c faible (HbA1c entre 6 et 7), modérée (autour de 8) et élevée (supérieur à 11).

1.1.2. Globules rouges sains

Nous avons utilisé des échantillons de sang veineux périphérique qui ont été prélevés sur des donneurs non-fumeurs sains recueillis sur poches d'héparinate de lithium au niveau du centre de transfusion sanguine.

1.2. Matériel consommable et produits chimiques

Lors de notre travail au laboratoire nous avons utilisé des eppendorfs de 1 et 2 ml, des embouts, des gants, une seringue et aiguille, des tubes à essai en verre, des tubes à hémolyse, du papier absorbant, des béchers, une pissette, une spatule, un baromagnétique, des portoirs, un thermomètre et des cuves de 1ml.

Les réactifs chimiques utilisés dans cette étude sont : chlorure de sodium (NaCl à 0,9%) (Sigma-Aldrich ; St. Louis, MO, USA), 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA), acide éthylène diamine tétraacétique EDTA (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA), acide trichloroacétique (TCA) (Sigma-Aldrich ; St. Louis, MO, USA), acide thiobarbiturique (TBA) (Sigma-Aldrich ; St. Louis, MO, USA), hydroxyde de sodium (NaOH) (Sigma-Aldrich ; St. Louis, MO, USA), peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Alpha Omega labs), l'huile à immersion et l'eau distillé.

1.3. Appareillages

Les différents appareils utilisées sont données dans le tableau 3 :

Tableau 3 : tableau regroupant les appareils utilisés lors de l'expérimentation.

Appareil	Firme
Balance de précision	OHAUS (0.001-210g) g : gramme
Agitateur magnétique	VELP SCIENTIFICA
Bain-marie thermostaté	BUNSEN
Spectrophotomètre UV-Visible	SHIMATZU (UK)
Centrifugeuse non réfrigérer	ALC CENTRIFUGETTE 4206
Centrifugeuse réfrigérer	Eppendorf centrifuge 5702 R
Vortex mixeur	VELP SCIENTIFICA
Microscope Optique	LABOVISION
Micropipette	DRAGON LAB (100-1000ul ; 10-100ul)
Etuve	Ecocell MMMgroup
Réfrigérateur	Condor

2. METHODES

2.1. Etude de l'effet oxydant de sérums de diabétiques sur l'oxydation et la dénaturation de l'hémoglobine

C'est un test utilisant l'Hb comme molécule indicatrice de l'état oxydatif (Oprea, 2006) pour envisager l'effet oxydant de sérum des diabétiques sur l'Hb qui se traduit par une dénaturation et une modification de sa conformation spatiale.

2.1.1. La préparation des sérums des diabétiques

Les échantillons sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 pour la séparation des cellules, sous forme de culot, et du plasma comme surnageant. Les surnageant sont récoltés, identifiés avec des codes et congelés à -4° .

2.1.2. Prélèvement et préparation du l'Hb

Les tests à l'hémoglobine ont été réalisés avec du sang humain frais prélevé dans des pochettes contenant de l'héparinate de lithium par un personnel médical. Le sang est ensuite centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min à 4°C où il y aura séparation de ses constituants et la formation de 3 couches (les globules rouges, une fine couche blanche qui contient les plaquettes et les leucocytes, et le plasma) ; ses deux dernières sont soigneusement éliminés par pipetage et le volume ainsi évacué est remplacé par un même volume d'une solution isotonique (NaCl à 0,9%) afin de garder l'équilibre osmotique des érythrocytes (Awad et *al.*, 2008).

2.1.3. Protocole de la dénaturation et de l'oxydation de l'Hb

Un prélèvement de 100 μl de sang isotonique est mis en contact avec 500 μl de l'eau distillée pour provoquer une lyse totale des GRs et libérer l'Hb intracellulaire dans le but d'obtenir une solution de l'Hb prête à être testée avec les différents échantillons. Une quantité de la solution de l'Hb préparée est répartie sur une série de tubes composés de NaCl à 0,9% qui est considéré comme témoin négatif, alors que le H_2O_2 à 50 mM est utilisé comme témoin positif et le reste des tubes est réservé pour les sérums des diabétiques.

Après la répartition de l'Hb sur les tubes, l'ajout de solutions préparées est effectué comme suit :

Le témoin négatif contient un volume (μl) de l'Hb avec 9 volumes (μl) de NaCl (0,9%).

Le témoin positif contient un volume (μl) de l'Hb avec 9 volumes (μl) de H_2O_2 (50 mM).

Chapitre V: MATERIEL ET METHODES

Les tubes des sérums des diabétiques contiennent un volume (μl) de l'Hb avec 9 volumes (μl) de sérums des diabétiques avec différents valeurs de HbA1c (faible, modéré et élevé).

L'Hb est ensuite incubée à 37°C pendant 2H ou 24H, puis une lecture au spectrophotomètre est réalisée à une longueur d'onde de 412 nm pour mesurer le degré de dénaturation de l'Hb où la diminution de l'intensité de l'absorbance révèle son degré d'oxydation (Oprea, 2006).

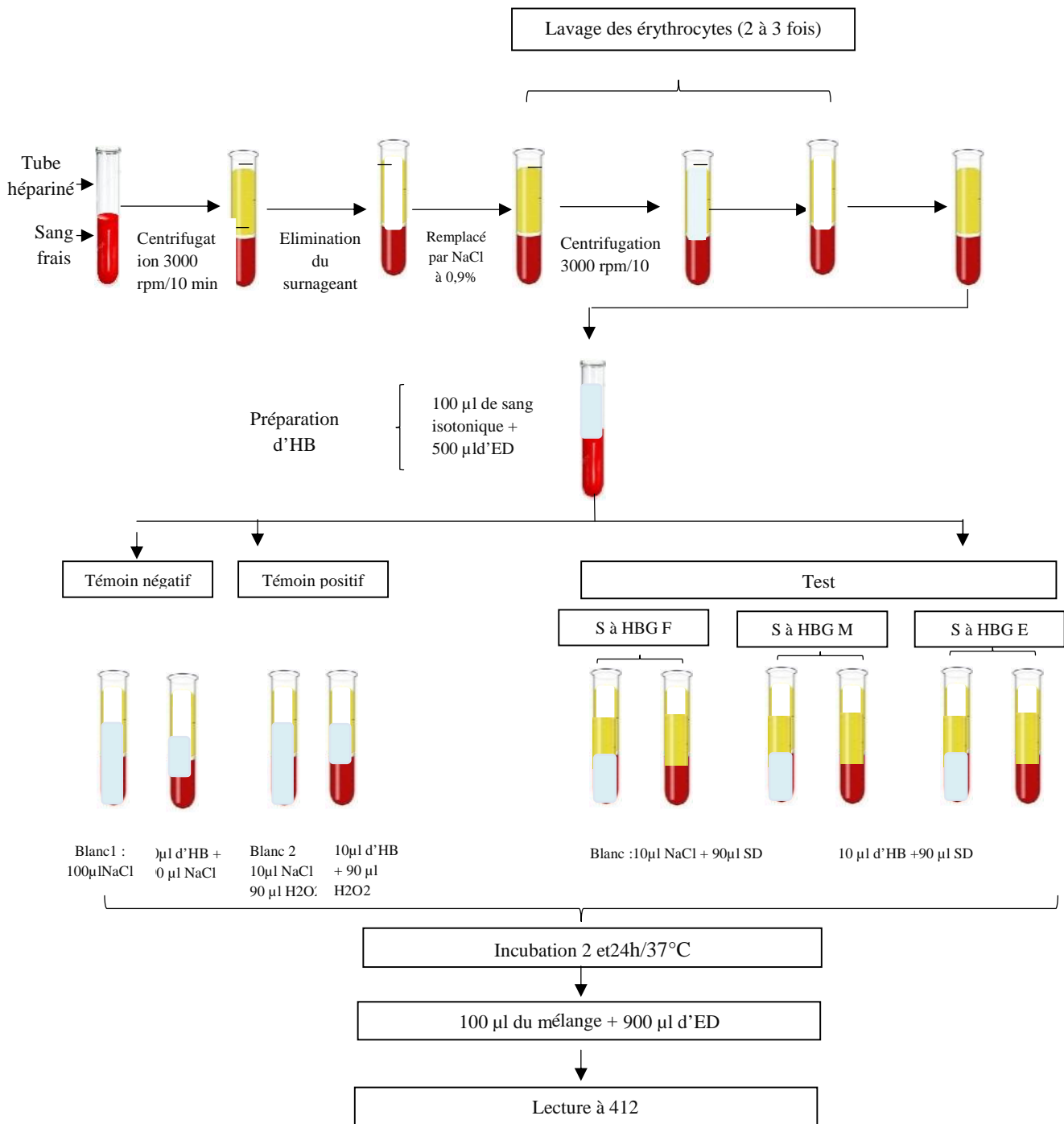


Figure 5 : Protocole de dénaturation et d'oxydation d'hémoglobine (Oprea, 2006) avec modification.

2.2. Etude de la cytotoxicité membranaire de sérum des diabétiques sur les globules rouges humains

2.2.1. Prélèvement et préparation du sang

Le protocole employé pour la préparation des hématies est décrit dans le paragraphe 2.1.2. La solution est délicatement homogénéisée pour éviter l'éclatement des cellules et obtenir un sang isotonique à partir duquel une solution de sang à 20% d'hématocrite est préparée.

2.2.2. Etude de l'effet oxydant

Le principe de la méthode consiste à co-incuber les hématies avec les sérums des personnes diabétiques, et à déterminer la concentration cellulaire, l'Hb libérée et l'Hb intracellulaire, et cela par un dosage par spectrophotométrie UV-visible (**figure 6**) (Aad *et al.*, 2012, Rizvi et Pandey, 2010, Tsuchiya *et al.*, 2002).

2.2.2.1. Test de turbidité cellulaire

Les tubes à analyser ont été préparés à partir du sang isotonique à 20% d'hématocrite. Dans chaque tube un volume (μ l) de sang isotonique était mis avec 9 volumes (μ l) de sérums à HbA1c élevée, modérée et faible. Pour le témoin négatif le même volume de NaCl à 0,9% a été ajouté à la place de sérum et un volume de H₂O₂ a été ajouté pour le témoin positif. Tous les tubes sont incubés à 37°C pendant 24h ou 48h. Une lecture à 620 nm est effectuée pour évaluer la concentration cellulaire (turbidité cellulaire) et chaque échantillon est ensuite centrifugé (4000 rpm/10 min) pour récupérer le surnageant et doser son hémoglobine libérée.

2.2.2.2. Test de dosage de l'hémoglobine libérée

Après la lecture à 620 nm, une centrifugation est effectuée à 4000 rpm pendant 10 min, le surnageant de chaque tube est récupéré. Deux lectures au spectrophotomètre sont réalisées, une à 540 nm pour le test d'hémolyse et l'autre à 412 nm pour le dosage de l'Hb libérée (Oprea, 2006).

Après récupération de surnageant de chaque tube, l'hémoglobine libérée a été dosée par spectrophotométrie à 412 nm (Girish *et al.*, 2012).

2.2.2.3. Dosage de l'hémoglobine intracellulaire

Chapitre V: MATERIEL ET METHODES

Après avoir évalué l'hémoglobine libérée, cette dernière est éliminée et le culot cellulaire (hématies intactes) est complètement lysé par l'ajout de l'eau distillée pour la libération de l'hémoglobine intracellulaire (Fig. 11), qui est ensuite mesurée par spectrophotométrie à 412 nm (Mitrofan-Oprea *et al.*, 2007).

2.2.2.4. Dosage de l'hémoglobine intracellulaire oxydée

Après le dosage d'hémoglobine intracellulaire, une lecture à 540 nm est effectuée pour l'évaluation de l'Hb intracellulaire oxydée.

Chapitre V: MATERIEL ET METHODES

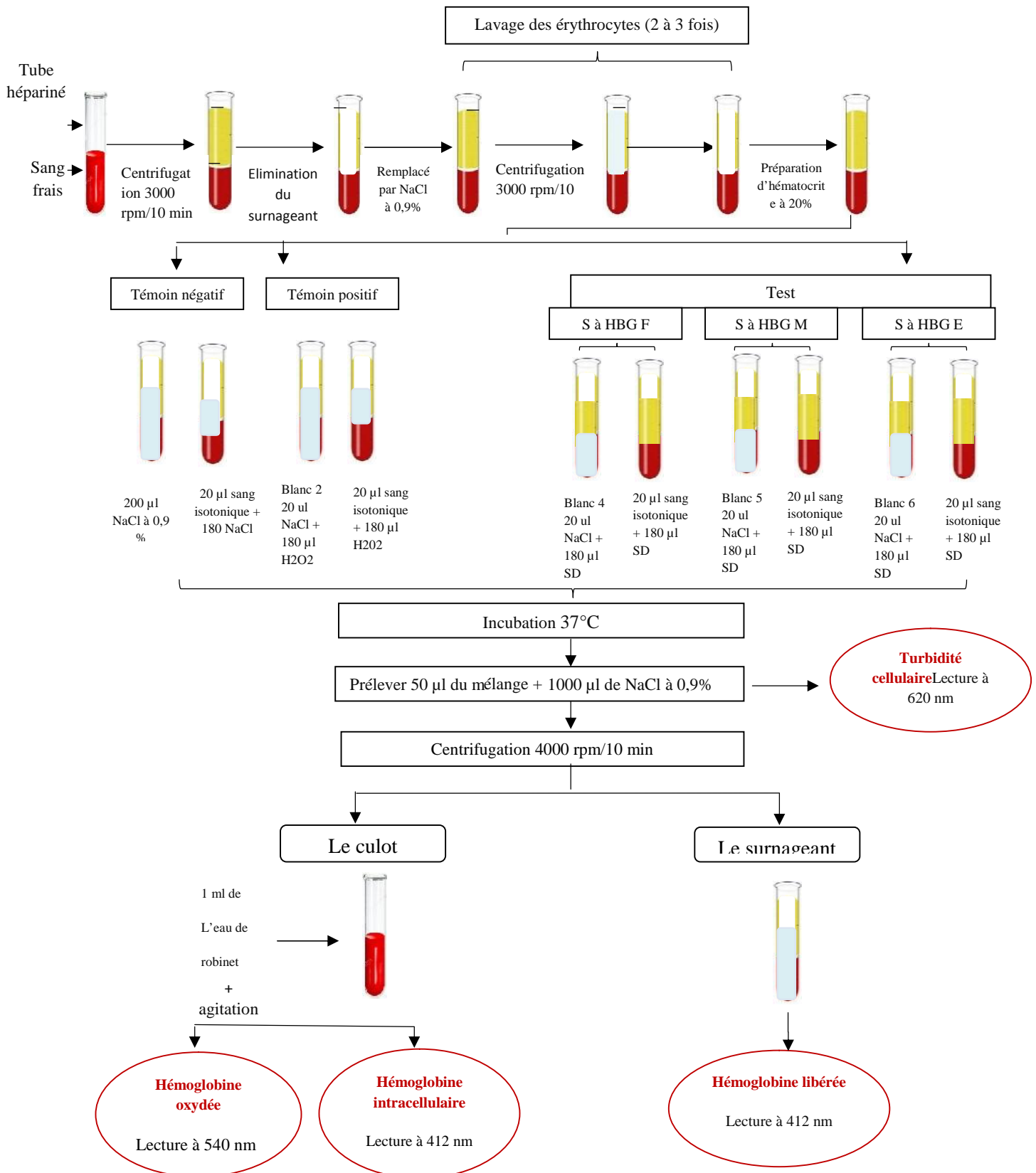


Figure 6: Protocole expérimental d'étude du potentiel oxydatif des sérums des diabétiques sur les globules rouges. (Aad et al., 2012, Rizvi and Pandey, 2010, Tsuchiya et al., 2002).avec modification.

2.2.3. Etude morphologique

Une observation microscopique en parallèle aux tests susmentionnés vise à étudier les changements morphologiques des globules rouges dans les différentes conditions testées. Pour cela des volumes de 15 µl ont été prélevés sur des échantillons traités avec les sérums avec HbA1c élevé ainsi que des hématies de témoin négatif. Il est ainsi possible de comparer la forme des hématies par champ microscopique

2.2.4. Evaluation de la peroxydation lipidique

L'évaluation de la peroxydation lipidique est mise en place après le test de turbidité pour mettre en évidence le mode d'action des sérums sur la membrane phospholipidique des GRs et illustrer les modifications et les changements induits. En effet la peroxydation lipidique est un bon indicateur de la formation des radicaux libres acteurs du stress oxydant. Les acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires sont les cibles principales des EROs.

La membrane des GRs est composée de lipides polyinsaturés qui réagissent avec les EROs et conduisent en premier lieu à la formation des hydroperoxydes, après une cascade de réaction forment des composés carbonylés très réactifs « les MDAs ». Ces derniers représentent le résultat de la dégradation des lipides membranaires, où ils sont considérés comme marqueurs d'une peroxydation lipidique (Michel et *al.*, 2008).

Test TBARS (substances réactives à l'acide thiobarbiturique)

Le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) est largement utilisé pour évaluer l'état oxydatif de la membrane cytoplasmique (la présence d'une peroxydation lipidique). Il se déroule sous conditions acides, à une température avoisinant les 90-100 C° (Devasagayam et *al.*, 2003). Le principe de la méthode consiste à démontrer la présence des MDAs par TBA ou deux molécules de cette dernière se lient avec une molécule de MDA pour donner des chromophores de couleur rose absorbés au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 535 nm (Devasagayam et *al.*, 2003).

L'utilisation de l'AAPH comme témoin positif est dû à son fort potentiel cytotoxique connu sur les membranes phospholipidiques des cellules (Ghibu et *al.*, 2009).

Après la préparation d'un sang isotonique à 20% d'hématocrite, une série de tube qui se compose de témoin négatif, de témoin positif et des sérums des diabétiques est réalisée et qui comporte :

Chapitre V: MATERIEL ET METHODES

- ❖ Un volume (μl) de sang isotonique avec 9 volumes (μl) de NaCl à 0,9%.

- ❖ Un volume (μl) de sang isotonique avec 9 volumes (μl) d'AAPH.

- ❖ Un volume (μl) de sang isotonique avec 9 volumes (μl) de sérum des diabétiques à Hba1c faible, modérée et élevée.

Ensuite une incubation est réalisée pendant 48 h à 37°C. Une déprotéinisation de la suspension obtenue est effectuée par l'ajout de l'acide trichloracétique (TCA) à 30% puis incubée à 0°C pendant 2 h, suivie d'une centrifugation à 3000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. A un volume du surnageant a été ajouté un volume (μl) d'acide thiobarbiturique (TBA) à 1% (dissous dans 0,05 mol/l de NaOH), et d'EDTA (0,1 mol/l) et chauffé à 95-100 °C pendant 15 min suivi d'un refroidissement. L'absorbance de la solution obtenue a été mesurée à 535 nm (figure 7).

Chapitre V: MATERIEL ET METHODES

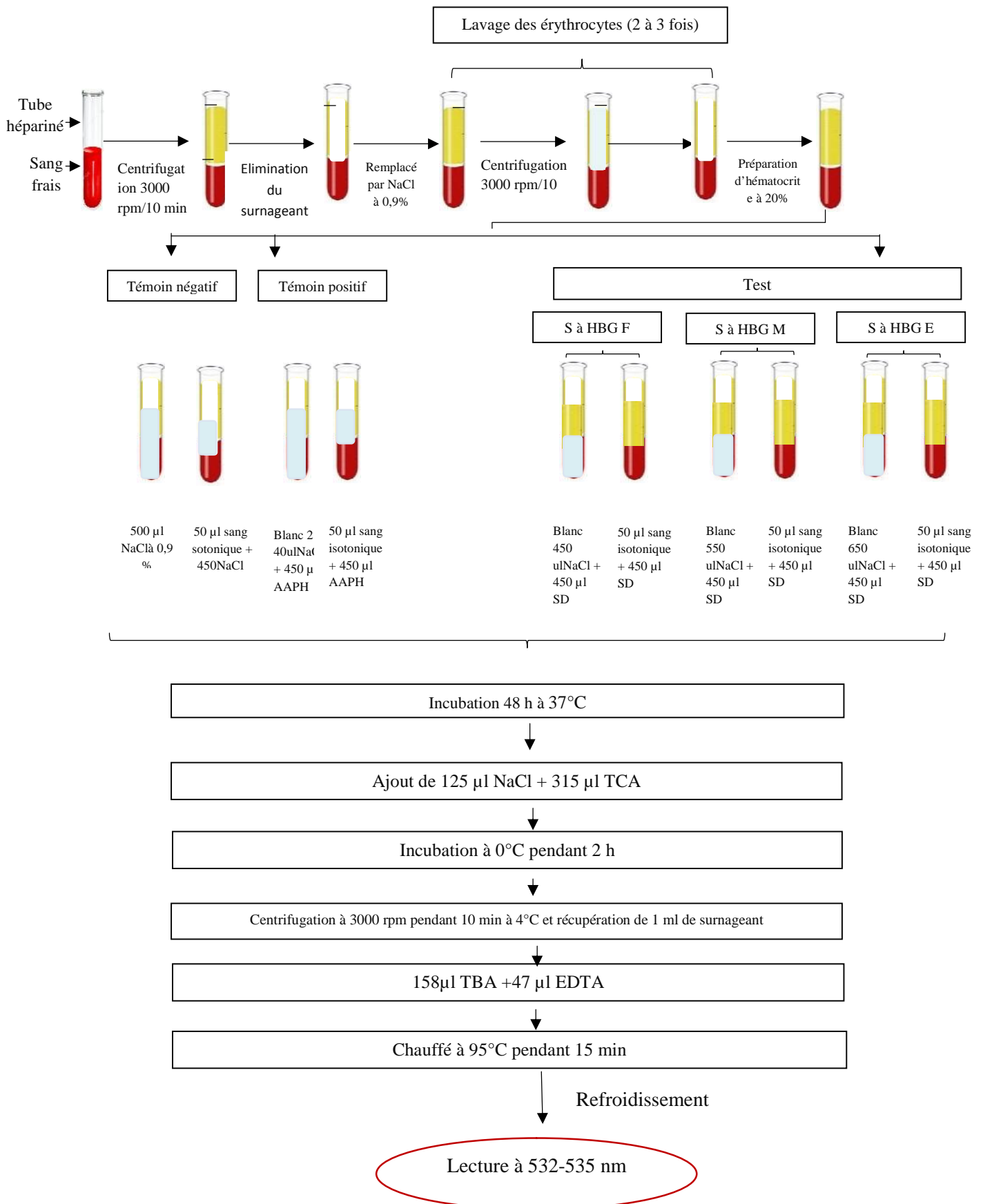


Figure 7 : Protocole expérimentale de la peroxydation lipidique (Devasagayam et al., 2003) avec modification.

2.3. Analyse statistique

Toutes les expériences réalisées dans le présent travail ont été répétées trois fois. L'analyse statistique a été effectuée par un logiciel de traitement des données (Statview), dont les variables sont les absorbances des échantillons, (les concentrations de Hb ,de globules rouges et des MDA).

Chapitre VI :

Résultats et discussions

I RESULTATS

I.1. Résultats de l'étude sur l'hémoglobine

Dans la présente étude, l'hémoglobine a été utilisée comme modèle pour étudier le dommage oxydatif induit par les sérums des diabétiques.

I.1.1. Etude de l'oxydation de l'hémoglobine par les sérums des diabétiques

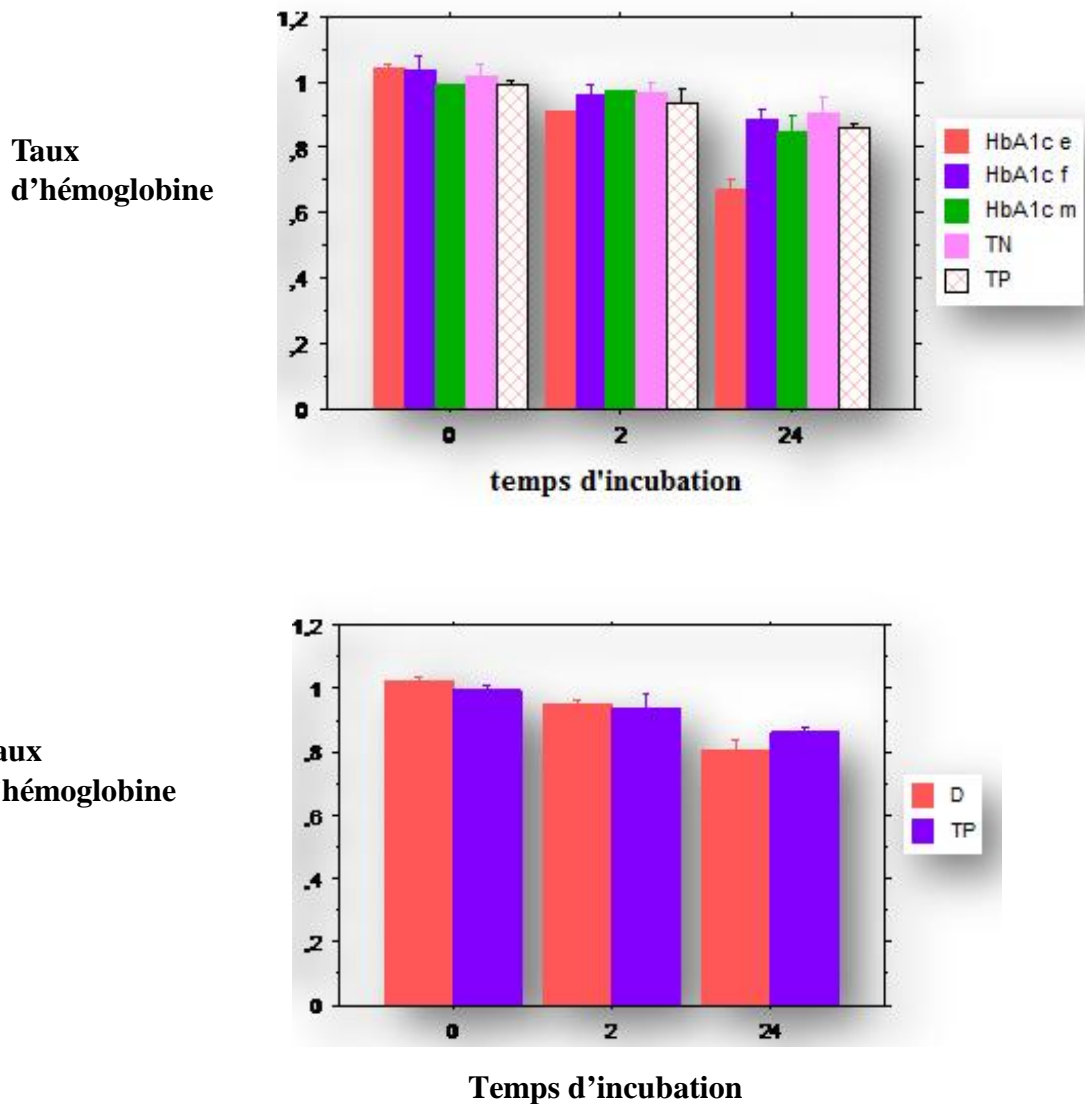


Figure 8 : La concentration en hémoglobine après 2h et 24h d'incubation. (A)-TN : Témoin négatif (sans traitement) : NaCl à 0,9% ; TP : témoin positif H₂O₂, échantillons avec sérums des diabétiques HbA1c e±13 ; HbA1c f± 6,5 ; HbA1c m±8. **(B)-D :** , échantillons avec sérums des diabétiques, TP : témoin positif H₂O₂.

Sur la figure 8, il apparaît très clairement que la concentration initiale de l'hémoglobine est réduite après 2h d'incubation et plus significativement après 24h (**figure 8 (A)**). Toutefois, cette diminution varie en fonction des échantillons étudiés. En effet, les échantillons avec les sérums des diabétiques et surtout ceux qui contiennent l' HbA1c élevée augmente la dénaturation de l'Hb du fait de la réduction importante de la concentration après 24h d'incubation, cette dénaturation est plus importante par rapport à l'oxydation par H₂O₂ (témoin positif) après 24h d'incubation. (**Figure 8 (B)**)

I.2. Résultats de l'étude sur les globules rouges

Dans la présente étude, l'hémolyse oxydative *in vitro* des érythrocytes humains a été utilisée comme modèle pour étudier le dommage oxydatif des membranes biologiques induit par la génération de radicaux libres par le sérum des personnes diabétiques.

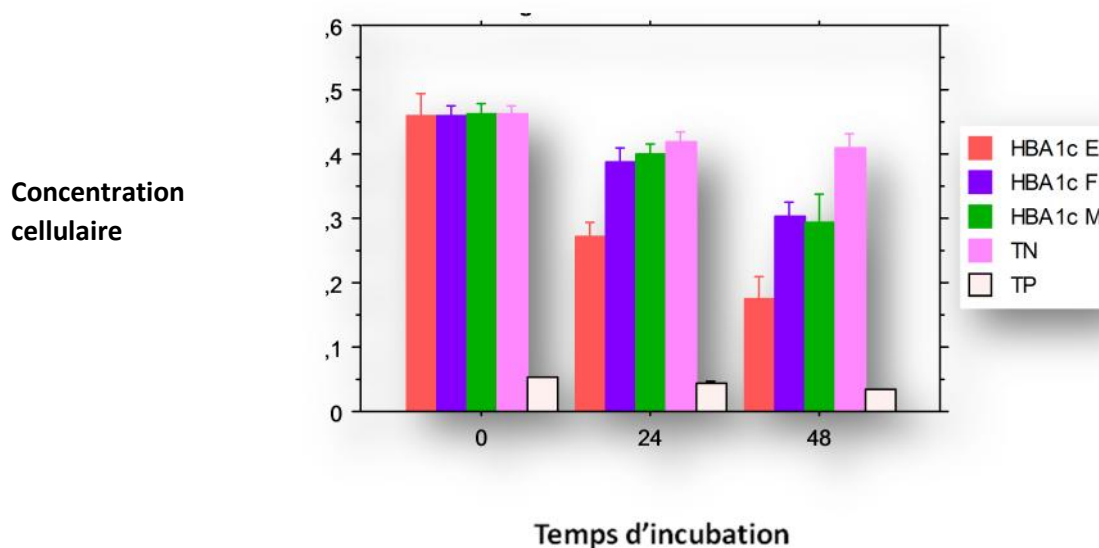


Figure 9 : la turbidité cellulaire après 24 et 48h d'incubation, des différents échantillons étudiés sous l'effet de différent taux d' HbA1c. HbA1c e±13 ; HbA1c f± 6,5 ; HbA1c m±8 et sous l'action du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ à 50mM). TN : Témoin négatif (sans traitement) : NaCl à 0,9% ; TP : témoin positif H₂O₂

La figure 9 montre les valeurs des concentrations cellulaires (érythrocytes) dans les échantillons témoins (témoin négatif et témoin positif) et les échantillons de test (HbA1c élevée, modérée et faible).

Chapitre VI : RESULTATS ET DISCUSSION

Il apparait sur cette figure que les valeurs de la concentration cellulaire du sang témoin négatif (n'ayant pas subi d'oxydation) restent largement supérieures par rapport au témoin positif (H_2O_2) et des différents échantillons étudiés après 24h et 48h d'incubation. Le sang du témoin positif ainsi que le sang des échantillons avec les sérums des diabétiques, présente les concentrations cellulaires les plus faibles.

Il apparait aussi que les concentrations cellulaires dans l'échantillon avec HbA1c élevé sont inférieures par rapport aux échantillons ayant une HbA1c faible et modérée.

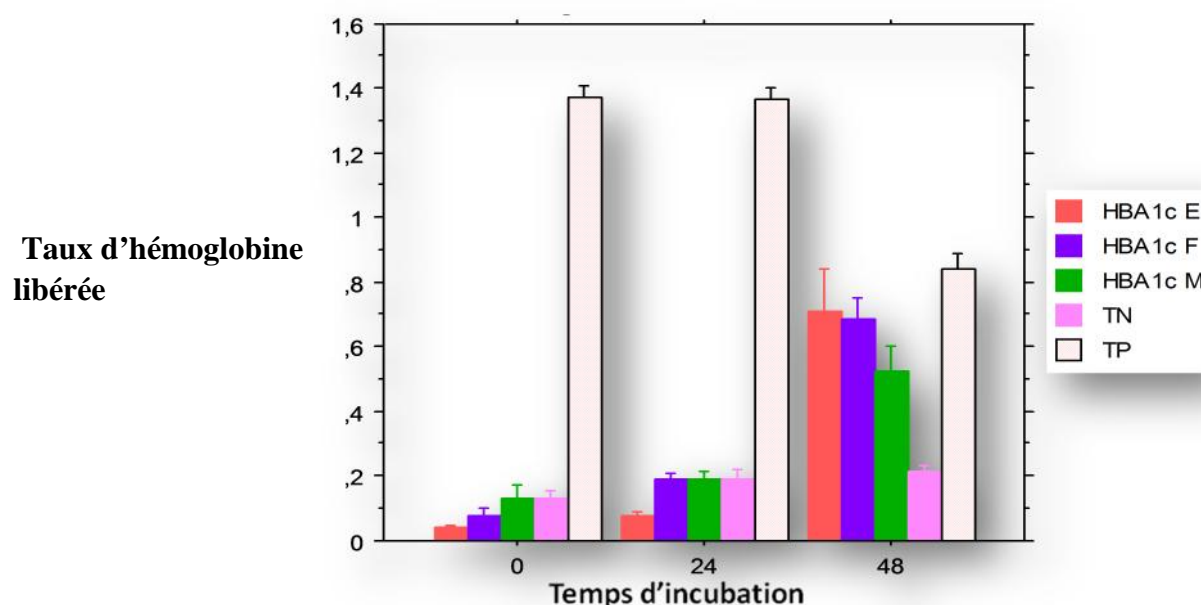


Figure10 : l'hémoglobine libérée après 24 et 48h d'incubation, correspondant aux différents échantillons étudiés sous l'effet de différent taux d' HbA1c. HbA1c e±13 ; HbA1c f± 6,5 ; HbA1c m±8 et sous l'action du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 à 50mM). TN : Témoin négatif (sans traitement) : NaCl à 0.9% ; TP : témoin positif H_2O_2

La figure 10 montre les valeurs de l'hémoglobine libérée qui évoluent à l'inverse des concentrations cellulaires, le sang de témoin positif ainsi que le sang des échantillons avec les sérums des diabétiques, surtout avec une de HbA1c élevée, présente les valeurs d'Hb libérée les plus importants par rapport au témoin négatif, notamment après 48h d'incubation.

L'hémoglobine intracellulaire

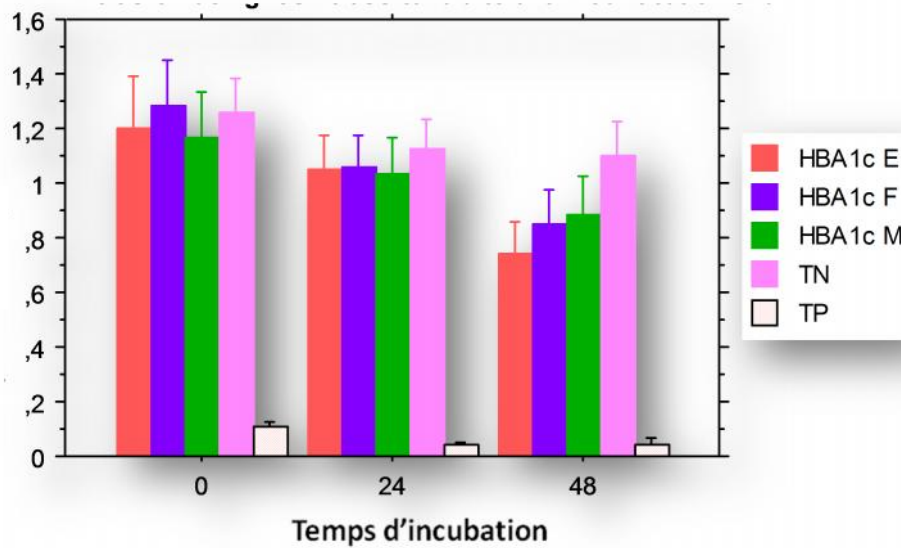


Figure 11: l'hémoglobine intracellulaire après 24 et 48h d'incubation, correspondant aux différents échantillons étudiés sous l'effet de différent taux d' HbA1c. HbA1c e±13 ; HbA1c f± 6,5 ; HbA1c m±8 et sous l'action du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ à 50mM). TN : Témoin négatif (sans traitement) : NaCl à 0,9% ; TP : témoin positif H₂O₂

Sur la **figure 11** nous pouvons constater que les concentrations intracellulaires en Hb sont corrélées positivement avec les valeurs de la turbidité cellulaire avec diminution de la concentration en Hb intracellulaire pour le témoin positif et les échantillons traités avec les sérums des diabétiques après 48H d'incubation. Cette diminution est clairement observée dans les échantillons ayant un taux d'HbA1c élevée. Les échantillons ayant un taux fiable ou modéré toujours diminuent de manière assez proche.

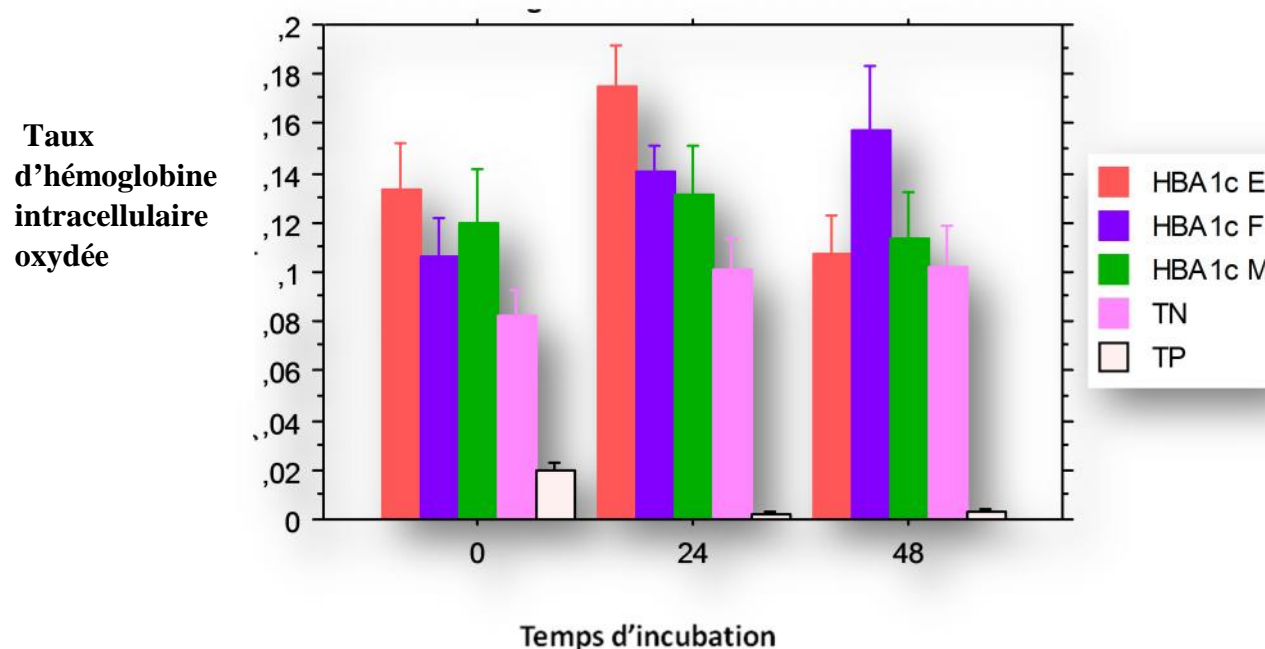


Figure 12: après 24 et 48h d'incubation, correspondant aux différents échantillons étudiés sous l'effet de différent taux d' HbA1c. HbA1c $e \pm 13$; HbA1c $f \pm 6,5$; HbA1c $m \pm 8$ et sous l'action du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 à 50mM). TN : Témoin négatif (sans traitement) : NaCl à 0,9% ; TP : témoin positif H_2O_2 .

La figure 12 montre les valeurs de l'hémoglobine intracellulaire oxydée (la méthémoglobine). Nous pouvons observer une augmentation de la concentration en méthémoglobine pour le témoin négatif et les sérums des diabétiques. Après 24H, on peut observer une diminution de l'Hb intracellulaire oxydée (cas de sérum à HbA1c élevé) due probablement à la libération de ces derniers par la lyse cellulaire. Il est noté aussi une concentration trop faible de l'Hb intracellulaire oxydée pour les échantillons du témoin positif due à une forte hémolyse et qui se traduit par une faible concentration cellulaire (**figure 9**).

Résultats d'étude morphologique

Parallèlement aux résultats du dosage d'hémoglobine et de turbidité cellulaire nous avons suivi dans cette étude la morphologie des globules rouges par une observation microscopique.

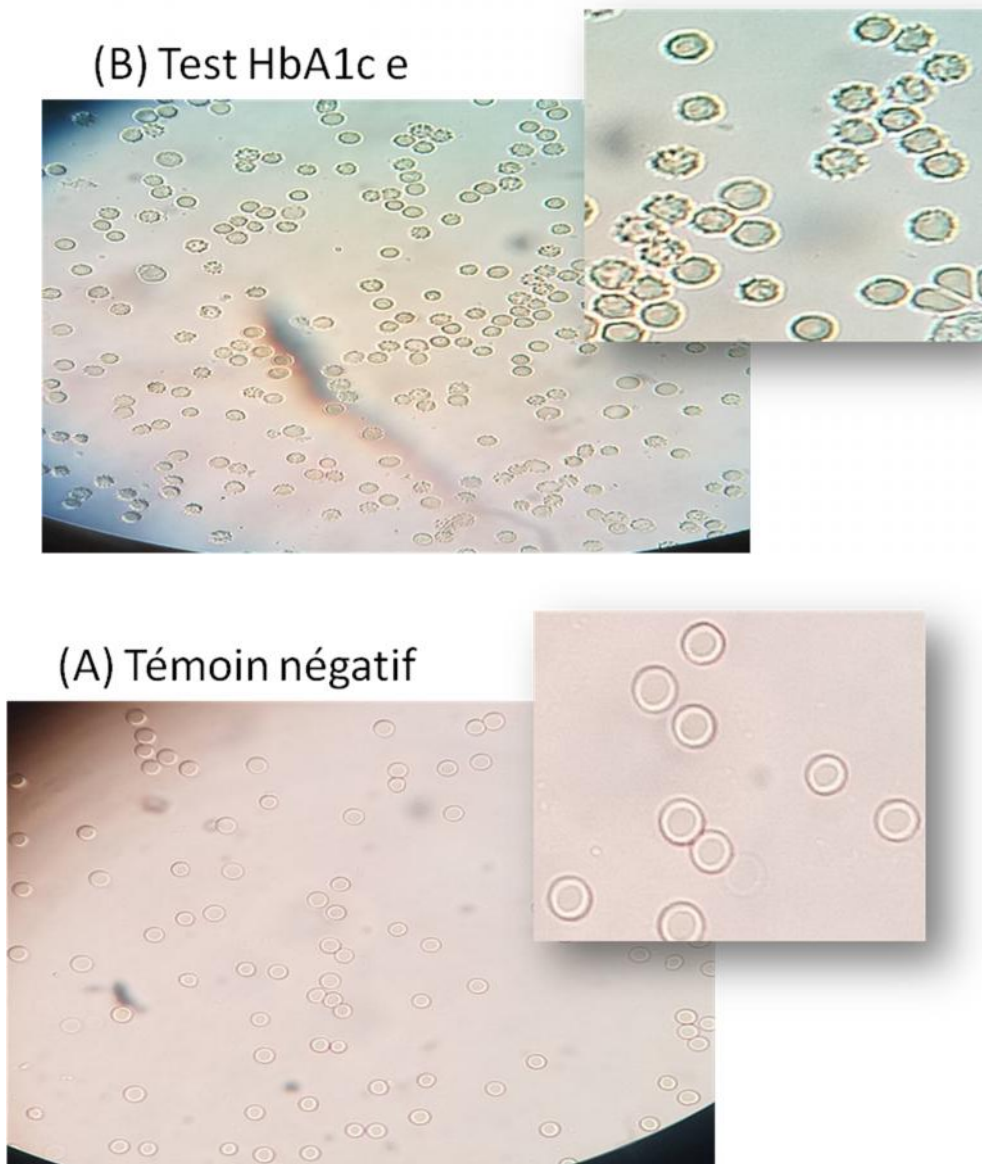


Figure13 : images représentatives de la morphologie des globules rouge, (A) témoin négatif ; GR avec NaCl 0,9% ; (B) GR incubé avec HbA1c élevée

Chapitre VI : RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats montrent une morphologie cellulaire altérée avec la présence de granulation près de la membrane cytoplasmique des globules rouges (corps de Heinz) pour les échantillons avec taux d'HbA1c élevé en comparaison avec les globules rouges du témoin négatif qui apparaissent de forme et de taille normales (**figure13**).

Peroxydation lipidique

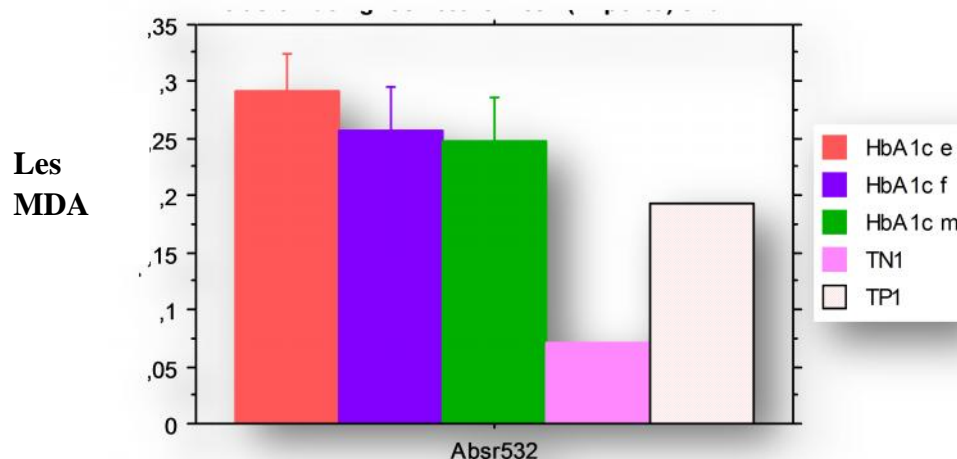


Figure 14 : la concentration des MDA après 48h d'incubation, correspondant aux différents échantillons étudiés sous l'effet de différent taux d' HbA1c. HbA1c e \pm 13 ; HbA1c f \pm 6,5 ; HbA1cm \pm 8 et sous l'action du AAPH (AAPH à 50mM). TN : Témoin négatif (sans traitement) : NaCl à 0,9% ; TP : témoin positif AAPH.

L'effet oxydant des sérums des diabétiques sur la membrane cellulaire des globules rouges a été révélé par la mesure de la concentration du marqueur de peroxydation lipidique MDA via le test de TBARS. **La figure 14** montre que la concentration de MDA est importante dans les échantillons des sérums des diabétiques après 48H d'incubation comparativement au témoin positif qui contient de l'AAPH comme molécule oxydant.

A l'inverse dans le témoin négatif on observe une concentration faible des MDA. Ceci démontre la production d'une peroxydation lipidique causée par la génération des ERO par les sérums des diabétiques. Nous pouvons voir qu'en fonction de la concentration, les

sérums avec une HbA1c élevée produit plus les MDA suivi par les sérums ayant HbA1c modéré et faible.

II. DISCUSSION

Le stress oxydatif décrit l'existence de produits appelés radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui se forment dans des conditions physiologiques normales mais qui deviennent délétères lorsqu'ils ne sont pas éteints par les systèmes antioxydants (**Fang et al.,2002**). Il existe des preuves expérimentales et cliniques convaincantes que la production d'espèces réactives de l'oxygène est augmentée dans les deux types de diabète et que l'apparition du diabète est étroitement associée au stress oxydatif (**Johansen et al.,2005**). Les radicaux libres sont formés de façon disproportionnée dans le diabète par l'autoxydation du glucose, la voie des polyols et la glycation non enzymatique des protéines (**Obrosova et al.,2002**). Des niveaux anormalement élevés de radicaux libres et le déclin simultané des systèmes de défense antioxydants peuvent entraîner des dommages aux organites et enzymes cellulaires, une augmentation de la peroxydation lipidique et le développement de complications du diabète sucré (**Maritim et al.,2003**).

L'hyperglycémie est considérée comme le principal facteur dans le développement de complications cliniques chroniques de diabète sucré. Certains des principaux changements produits dans les érythrocytes sont la glycation de l'hémoglobine et des protéines membranaires (**Pretorius et al.,2015**).

Les complications microvasculaires et macrovasculaires sont les plus fréquentes qui causent la morbidité et la mortalité. L'un des facteurs contribuant à ces complications potentielles est l'anomalie dans les propriétés physiques et biologiques des cellules sanguines (**Pretorius et al.,2015**). Les anomalies de l'hyperglycémie, peuvent perturber l'architecture et les fonctions des globules rouges à l'échelle moléculaire. L'hyperglycémie a des multiples effets sur les globules rouges, c'est notamment la glycation de l'hémoglobine, la réduction de la déformabilité et de la durée de vie (**Bandeira et al.,2012**). Des études antérieures ont montré que certains phospholipides sont modifiés dans les érythrocytes des patients diabétiques. Ces altérations se traduisent par l'agrégation des érythrocytes, qui est un facteur de risque indépendant dans le développement des complications vasculaires chez les patients diabétiques (**Pretorius et al.,2015**).

Les érythrocytes étant les plus vulnérables à l'oxydation à cause de leurs contenus riches en acides gras polyinsaturés, leurs environnements saturés en oxygène moléculaire, ainsi que la présence de métaux de transition tels que le fer et le cuivre, dès lors, ces cellules

Chapitre VI : RESULTATS ET DISCUSSION

participent dans le statut oxydatif du sang total (**Çimen, 2008**). Le globule rouge, par sa structure et sa fonction, reste donc un modèle d'étude cellulaire intéressant car sa structure est simple et sa fonction de transport de l'oxygène et de véhicule de l'hémoglobine l'expose particulièrement aux attaques radicalaires (**Antonelou et al., 2010**).

Il a ainsi été démontré que l'hyperglycémie induit une érythrocytotoxicité par des dommages considérables sur la membrane, à travers le dosage des MDA, **Varashree et Gopalakrishna (2011)**, ont prouvé que la peroxydation des lipides chez le diabétique était significativement plus élevée que ceux d'un groupe témoin de personnes non diabétiques. Les concentrations des MDA dans les érythrocytes ont été déterminées dans les érythrocytes prélevés chez les personnes atteintes de diabète sucré (groupe expérimental) et des individus sains normaux (groupe témoin) (**Varashree et Gopalakrishna Bhat, 2011**).

Malgré la prévalence de l'anémie liée au diabète et la connaissance de ses conséquences, très peu de recherches ont été menées sur les mécanismes physiopathologiques et moléculaires sous jacents de l'anémie chez les patients diabétiques. En conséquence, la corrélation entre l'anémie ou autre perturbations hématologiques chez les patients diabétiques restent encore moins connues (**Tshikongo et al., 2016**).

Cependant, l'effet oxydant de sérums des diabétiques sur les GRs, par contact direct qui conduit à une hémolyse à travers une peroxydation lipidique de la membrane érythrocytaire, la libération de l'Hb et la formation de méthémoglobine n'a jamais été abordée dans la littérature.

Ce travail consistant à l'étude de l'effet oxydant de sérums des diabétiques sur les érythrocytes, dont l'objectif majeur est de démontrer leur toxicité à l'intérieur de la cellule (agissant directement sur les GRs) pouvant induire ainsi cliniquement une anémie et une amplification du stress oxydatif. Nous avons opté dans notre démarche pour l'utilisation des GRs du fait qu'ils sont dépourvus de noyaux, facilitant ainsi nos conclusions sur l'action de l'hyperglycémie sur les membranes cellulaires et aussi sur l'intérieur de la cellule. Pour cela, l'effet oxydant a été déterminé d'une part par la dénaturation de l'hémoglobine; d'une autre part par la mesure de l'intégrité membranaire et cela par le dosage de l'Hb libérée, la mesure de la turbidité cellulaire, le dosage de l'Hb intracellulaire et par le dosage de la méthémoglobine intracellulaire. Notre étude a dévoilé que les sérums des diabétiques provoquent une dénaturation de l'hémoglobine ainsi qu'une diminution de la concentration cellulaire des GRs et une hémolyse cellulaire importante qui dépend du taux de l'hémoglobine glyquée, et donc de l'état d'équilibre du diabète. En parallèle, nous avons complété ce test par une observation microscopique de la morphologie des GRs pour visualiser les modifications

Chapitre VI : RESULTATS ET DISCUSSION

et les changements au niveau membranaires et cellulaire induites par les sérums des diabétiques.

Nous avons ainsi relevé un changement remarquable dans les GRs incubés avec les sérums des diabétiques qui est justifié par une détérioration de leurs membranes ainsi que la présence des corps de Heinz près de la membrane comparativement aux GRs du témoin négatif. Les corps de Heinz sont des agrégats d'hémoglobine précipitée qui résultent de dommages oxydatifs à l'hémoglobine (**fenneteau, 2000**).

Une étude réalisée par Parisa Sadighara sur les GRs, a montré que l'interaction des ROS avec l'hémoglobine peut la dénaturer. L'hémoglobine dénaturée peut former des agrégats qui se lient à la membrane cellulaire pour former des inclusions appelées corps de Heinz. L'augmentation du taux d'oxydation entraîne une augmentation du nombre de corps de Heinz. (**Parisa Sadighara, 2009**).

Afin d'identifier le mode d'action de ces sérums, nous avons utilisé test à l'Hb qui consiste à mettre en contact les sérums des diabétiques avec cette molécule. Les résultats de ce test montrent que le degré de l'oxydation de l'Hb dépend de taux d'hémoglobine glyquée. Pour mieux comprendre l'effet oxydant des sérums des diabétiques, nous avons utilisé un test qui indique le degré de peroxydation lipidique des membranes des GRs. Nous avons constaté un potentiel oxydant des sérums des personnes diabétiques sur la membrane (cytotoxicité membranaire), cela explique l'oxydation des acides gras polyinsaturés via les ERO produits par l'hyperglycémie chronique. Ce qui conduit finalement à une lyse membranaire libérant ainsi, les constituants cellulaires des GRs.

Nos résultats démontrent que, les sérums des diabétiques, ont provoqué lors du contact direct avec les GRs *in vitro* une forte hémolyse ainsi qu'une diminution de la concentration cellulaire par rapport au témoin négatif. Cet effet, est expliqué par une peroxydation lipidique illustrée par un taux élevé en MDA. Ce phénomène se traduit cliniquement par l'apparition d'une anémie (**Tshikongo et al., 2016**).

Il est intéressant de signaler, que le sérum des diabétiques ayant un taux d'HbA1c élevée a un effet oxydant sur l'hémoglobine et sur la membrane lipidique plus important que les sérums avec HbA1c modérée et faible, cela est justifié par la corrélation positive entre l'HbA1c et la glycémie (**Yassin et Ibrahim,1981**).

Une étude réalisée par Moussa (2008). sur le stress oxydatif chez les diabétiques, a montré que les patients diabétiques subissent un stress oxydatif important par rapport au contrôle (les patients normoglycémiques). Ceci est encore plus expliqué par la

Chapitre VI : RESULTATS ET DISCUSSION

méthémoglobine qui est une mesure importante du stress oxydatif chez les patients diabétiques (**MOUSSA,2008**). Par ailleurs, nos résultats obtenus par le dosage de l'Hb et la méthémoglobine intracellulaires, ont démontré un effet de sérums des diabétiques, ayant un HbA1c élevé, sur l'oxydation de l'Hb en produisant la méthHb (diminution de l'Hb à l'intérieur de la cellule et augmentation de methHb). De plus, cette méthémoglobine est probablement impliquée dans la lyse des globules rouge, en effet, nous avons vu que les temps de la formation de la méthémoglobine surviennent plutôt que la lyse cellulaire.

Conclusion et perspectives

Au terme de ce travail nous avons observé que l'effet des sérums des diabétiques sur les globules rouges dépend de l'état de l'équilibre de HbA1c, plus l'HbA1c est élevé plus les impacts négatifs sont importants.

Nous avons constatés que le sérum des diabétiques entraine la lyse cellulaire, ce qui fait diminuer la turbidité cellulaire et augmente l'Hb libérée, nous avons surtout montré que chez les diabétiques il y'a un impact à l'intérieur même du globule rouge avant la lyse cellulaire par l'exacerbation des phénomènes oxydatifs notamment l'oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine qui serait probablement le facteur principal dans la lyse cellulaire.

A l'avenir, nous préconisons d'élargir notre étude en mettons en œuvre l'impact des sérums des diabétiques sur l'ensemble des constituants du sang. Ainsi, à la lumière de ces résultats, d'autres perspectives intéressantes méritent d'être explorées dans le futur. Des études pourraient être développées sur les globules rouges comme une cellule oxydante dans des modèles de co-culture cellulaires.

Des études pourraient être menées pour trouver des antioxydants qui permettront d'assurer une meilleure protection des globules rouge pour prévenir les complications. Cette approche nous conduira à minimiser leurs dégâts oxydatifs et leurs perturbations.

Références bibliographiques

LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aad G. Abajyan T. Abbott B. Abdallah J. Khalek S. A. Abdelalim A. Abdinov O. Aben R. Abi B. and Abolins M. (2012). Observation of a new particle in the search for the Standard Model Higgs boson with the ATLAS detector at the LHC. *Physics Letters B*, 716, 1-29.
- Annick M. Lecok Q. et Jourdain-Menninger D.(2012).Evaluation de la prise en charge du diabète. Inspection générale des affaires sociales, Tom 1Rapport,033p.
- Antonelou M.H. Kriebardis A.G. and Papassideri I.S. (2010).Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice. *Blood Transfusion*. **8**: s39–s4.
- Arbos K. A. Claro L. M. Borges L. Santos C. A. and Weffort-Santos A. M. (2008). Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. *Nutrition Research*, 28, 457-463.
- Ardigo S. et Philippe J. (2008). Hypoglycémie et diabète. *Revue médicale suisse*. Vol. 4, 160, pp. 1376-1382.
- Awad, S. Allison S. P. and Lobo D. N. (2008). The history of 0.9% saline. *Clinical Nutrition*, 27, 179-188.
- Babu N. and Singh M. (2004). Singh.Influence of hyperglycemia on aggregation, deformability and shape parameters of erythrocytes, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* (2004) 273–280 IOS Press
- Bading Taika B. Bouckandou M. Souza A. Bourobou Bourobou H. P. MacKenzie L.S. and Lione L. (2018). An overview of anti-diabetic plants used in Gabon: Pharmacology and toxicology. [Review]. *J Ethnopharmacol*, 216, 203-228. doi: 10.1016/j.jep.2017.12.036
- Badouard C. (2006). Les lésions des acides nucléiques: détection par CLHP-SM/SM dans les milieux biologiques humains et intérêt comme biomarqueurs du stress oxydant et de l'inflammation. Université Joseph-Fourier-Grenoble I.
- Bandeira Sde M. Guedes Gda S. da Fonseca L.J. Pires A.S. Gelain D.P. Moreira J.C. Rabelo L.A. Vasconcelos S.M. and Goulart M.O.(2012). Characterization of blood oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients: increase in lipid peroxidation and SOD activity. *Oxid Med Cell Longev*. 819310.

- Banerjee M. and Vats P. (2013). Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in Type 2 diabetes mellitus. *Redox Biol.* Dec 11;2:170–7.
- Benhamou PY. Biochimie des complications vasculaires du diabète. *Synthèse du 14ème Congrès de l'IDF*, Washington DC, 1991.
- Birben E. Sahiner U.M. Sackese C. Erzurum S. and Kalayci O. Oxidative Stress et Antioxydant Defense/*WAO Journal*. 2012; 5(1) :9-19 .
- Bonnefont-Rousselot D. Beaudoux J.-L. Thérond P. Peynet J. and Legrand A. (2004). Delattre, Diabète sucré, stress oxydant et produits de glycation avancée, *Ann Pharm Fr.* 62 : 147-157
- Bravi MC. Pietrangeli P. Laurenti O. Basili S. Cassone-Faldetta M. Ferri C. and De Mattia G. (1997). Polyol pathway activation and glutathione redox status in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism*. 46(10):1194-8.
- Brownlee M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 54(6):1615-25
- Brownlee M. and Cerami A. (1981). The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Annu. Rev. Biochem.* 50:385-432
- Brownlee M. Vlassara H. and Cerami A. (1984). Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann. Intern. Med.* 101(4):527-37.
- Burg MB. (1995). Molecular basis of osmotic regulation. *Am. J. Physiol.* 268(6 Pt 2):F983-96.
- Bush B. S. and Pignet M. (2001). Le diabète de type 2. *Médecine Nucléaire. Imagerie fonctionnelle et métabolisme*. vol 25(2) :103-14.
- Cadet J. Bellon S. Berger M. Bourdat AG. Douki T. Duarte V. Frelon S. Gasparutto D. Muller E. Ravanat JL. and Sauvaigo S. (2002). Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol. Chem.* 383(6):933-43 cardiovasculaire. *Médecine des maladies métaboliques* vol.05 suppl. 1: 31-37.
- Çimen, M.Y.B. (2008). Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*. 390: 1–11.
- Dali-Youcef N. (2010). Les produits de fin de glycation des protéines et leur récepteur en pathologie, *Médecine des maladies métaboliques – Décembre –Vol. 4-N°6*.

- Deka D. et al. (2011). "Clinical Implications of Oxidative Stress & Sperm DNA Damage in Normozoospermic Infertile Men." *The Indian Journal of Medical Research* 134(3): 396–98.
- Del Valle L.G. (2011). Oxidative stress in aging: Theoretical outcomes and clinical evidences in humans. *Biomedicine & Aging Pathology*. 1: 1–7.
- Devasagayam T. Bloor K. and Ramasarma T. 2003. Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Diabetes Care*, 28(1): 164-76.
- Fang S. and Yang G. (2002). Free radical, antioxidant and nutrition, *Nutrition*, **18**, 872–890.
- Favier A. (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 108– 115.
- Fenneteau O. & Maier-Redelsperger M. (2000). Apport de l'examen pour le diagnostic constitutionnelle du frottis de sang de la pathologie du globule rouge .51-62
- Fong, D. S. Aiello L. P. Ferris F. L. 3rd and Klein R. (2004). Diabetic
- Gardès-albert M. Bonnefont-rousselot D. Abedinzadeh Z. et Jore D. (2003). "Espèces Réactives de L ' Oxygène Comment L ' Oxygène Peut-Il Devenir Toxique ?" *L'actualité chimique*: 91–96.
- Ghibu, S., Delemasre, S., Amoureux, S., Richard, C., Vostinaru, O., Mogosan, C., Muresan, A., Vergely, C. & Rochette, L. 2009. C023 Evaluation de l'effet protecteur de l'acide dihydro-lipoïque vis-à-vis d'une séquence d'ischémie-reperfusion sur coeur isolé perfusé de rat et d'un stress oxydant induit in vitro sur le globule rouge. *Archives of Cardiovascular Diseases*, 102, S35-S36
- Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP. (1988). Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabete Metab*. 14(1):25-30.
- Girish, T.K.; Vasudevaraju, P.; Rao, P.U.J.S. (2012). Protection of DNA and erythrocytes from free radical induced oxidative damage by black gram (*Vigna mungo* L.) husk extract. *Food and Chemical Toxicology*. 50: 1690–1696.
- Giulivi, C. Daviess K.J.A. (1990). A novel antioxidant role for hemoglobin. The comproportionation of ferrylhemoglobin with oxyhemoglobin. *The Journal of Biological Chemistry*. 265: 19453–194560.

- Gonzalez A.M. Sochor M. Hothersall JS. and McLean P.(1978). Effect of experimental diabetes on the activity of hexokinase in rat lens: an example of glucose overutilization in diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30;84(4):858-64.
- Gourdi P. (2011). Diabète de type 2 et insuffisance rénale : une situation a haut risque
- Grimaldi A. (1999). Diabétologie Questions d'internat Université PARIS-VI Pierre et Marie Curie Faculté de Médecine Pitié Salpêtrière -2000 ; 8-92
- Grimaldi A. (1999). Diabétologie Questions d'internat Université PARIS-VI Pierre et Marie Curie Faculté de Médecine Pitié Salpêtrière -2000 ; 8-92
- Gross J. L. de Azevedo M. J. Silveiro S. P. Canani L. H. Caramori M. L. and Zelmanovitz T. (2005). Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment.
- Gueye M. (2007). Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge. Université louis pasteur Strasbourg I.
- Helmut S. Carsten Berndt and Dean P. J. (2017). Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* 86:25.1–25.34.
<http://www.ijmr.org.in/article.asp?issn=09715916;year=2011;volume=134;issue=3;spage=396;epage=398;aulast=Venkatesh>
- Hunt JV. and Wolff SP. (1991). Oxidative glycation and free radical production: a causal mechanism of diabetic complications. *Free Radic. Res. Commun.* 12(Pt1):115-23.
- Jain SK. and Palmer M. (1997). The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin E on glycosylation of proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 22(4):593-6.
- Johansen J.S. Harris A.K. Rychly D.J. and Ergul A.(2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice, *Cardiovascular Diabetology*, 2005, 4, 5–9.
- King GL. and Brownlee M.(1996).The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 25(2):255-70.
- Koenig RJ. Peterson CM. Jones RL. Saudek C. Lehrman M. and Cerami A. (1976). Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 295(8):417-20.
- La Mutualité Socialiste-Solidaris. (2011). L'essentiel sur les diabètes de type 1 et 2. In : *Le diabète Les clefs pour le soigner*. 3e éd. La Mutualité Socialiste. P. 12-14.

- Landon M. B. Spong C. Y. Thom E. Carpenter M. W. Ramin S. M. Casey B. and Anderson G. B. (2009). Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. A multicenter, randomized trial of treatment for mild gestational diabetes. *N Engl J Med*, 361(14), 1339-1348.
- Low F.M. Hampton M.B. and Winterbourn C.C. (2008). Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte. *Antioxidant Redox Signaling*. 10: 1621–1629.
- Maritim A.C. Sanders R.A. and Watkins J.B.(2003). Diabetes, oxidative stress and antioxidants: a review, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, **17**, 24–38.
- Marnett Lawrence J. James N. Riggins and James D. (2003). “Endogenous Generation of Reactive Oxidants and Electrophiles and Their Reactions with DNA and Protein.” *The Journal of clinical investigation* 111(5): 583–93.
- Michel F. Bonnefont-Rousselot D. Mas E. Draï J. and Théron P. (2008). Biomarqueurs de la peroxydation lipidique: aspects analytiques. *Annales de Biologie Clinique*. 605-620.
- Mitrofan-Oprea L. Paliu C. Tissier J.-P. Héron A. Verpoor T. Behague M. Smagghe E. Schooneman F. Huart J.-J. Goudaliez F. Montreuil J. et Bratosin D. (2007). Nouveaux critères d'évaluation de la viabilité des hématies destinées à la transfusion. *Transfusion Clinique et Biologique*.14: 393–401.
- Monnier VM. (1989). Toward a Maillard reaction theory of aging. *Prog. Clin. Biol. Res.* 304:1-22.
- Moussa S.A. (2008). Oxidative stress in *diabetes mellitus*, Biophysics Group, Department of Biochemistry, National Research Centre, Dokki, Cairo, Egypt, ROMANIAN J. BIOPHYS., Vol. 18, No. 3, P. 225–236
- Neupane D.P. Majhi S. Chandra L. Rijal S. and Baral, N. (2008). Erythrocyte glutathione status in human visceral leishmaniasis. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 23: 95–97.
- Obrosova I.G. C. Vanltesen L. Fathallah X. Cao D.A. Greene M.J. Stevens.(2002). An aldose reductase inhibitor reverses early diabetes-induced changes in peripheral nerve function, *FASEB J*.**16**, 123–125.
- OMS. (2016). Organisation mondiale de la Santé. Rapport mondial sur le diabète. Genève.

- Oprea L. (2006). Recherche de nouveaux marqueurs de mort programmée (apoptose) dans les membranes des hématies humaines sénescents: impact en transfusion sanguine. Lille 1.
- Orban J.-C. Lena D. Bonciu M. Grimaud D. and Ichai C. (2006). Complications métaboliques du diabète. Les Essentiels, p. 471-480.
- Parisa Sadighara. (2009). RBC: Tool for Oxidant Agents Screening Test, Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 3(3): 2970-2973, ISSN 1991-8178
- Pelletier E. Campbell P. et Denizeau F. (2004). Écotoxicologie Moléculaire: Principes fondamentaux et Perspectives de développement ; Bibliothèque nationale du Québec ; Canada p : 182
- Perlemuter L. Collin De L'Hortet G. et Selam, J.L. (2000). Histoire et actualité. In : *Diabète et maladies métaboliques*. 3e éd. Paris : Masson. P. 1
- Pieme C.A. Tatangmo J.A. SiSmo G. Nya P.C.B. and Moor V.J.A. (2017) Relationship between hyperglycemia, antioxidant capacity and some enzymatic and non-enzymatic antioxidants in African patients with type 2 diabetes/*BMC Res Notes*. 10(1):141. Doi: 10.1186/s13104-017-2463-6. retinopathy. *Diabetes Care*, 27(10): 2540-53
- 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. *Cardiovasc Diabetol*. Mar;14(8):30.
- Ribeil J.-A. (2010). Hsp70 est un nouveau régulateur majeur de l'érythropoïèse empêchant le clivage du facteur de transcription GATA-1 par la caspase-3 au cours de la différenciation. Université Paris-Diderot-Paris VII.
- Rizvi S I. et Pandey K. B. 2010. Activation of the erythrocyte plasma membrane redox system by resveratrol: a possible mechanism for antioxidant properties. *Pharmacological Reports*, 62, 726-732.
- Sekli BF. (2011). Fonctionnalisation de surfaces d'électrodes par un film de poly(3,4-éthylènedioxythiophène) PEDOT pour l'élaboration de microcapteur spécifique des acides ascorbique et urique : application à l'étude des propriétés antioxydantes du sérum sanguin. thèse de doctorat en Génie des Procédés et de l'Environnement. Université de Toulouse III, 17p.

- Sergent O. Griffon B. Cillard P. Cillard J. (2000). Alcool et stress oxydatif. *Pathol. Biol.* 49: 689-695.
- Shinde A. Ganu J. Naik P. Effect of Free Radicals & Antioxidants on Oxidative Stress: A Review/*Journal of Dental & Allied Sciences*.2012; 1(2):63-66.
- Siems W.G. Sommerburg O. Grune T. (2000). Erythrocyte free radical and energy metabolism. *Clinical Nephrology*.5 3: S9–S17.
- Squier and Thomas C. (2001). “Oxidative Stress and Protein Aggregation during Biological Aging.” *Experimental Gerontology* 36: 1539–50.
- Stratton I.M. Kohner E.M. Aldington S.J. Turner R.C. (2001). UKPDS 50: Risk factors for incidence and progression of retinopathy in type II diabetes over 6 years from diagnosis: *Diabetologia*. 44: 713-22
- Stratton I.M. Kohner E.M. Aldington S.J. Turner R.C. (2001). UKPDS 50: Risk factors for incidence and progression of retinopathy in type II diabetes over 6 years from diagnosis: *Diabetologia*. 44: 713-22
- Stumvoll M. Goldstein B. J. and van Haeften, T. W. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet*, 365(9467), 1333-1346
- Sushil K. Mcvie J.R. Duett J. et John J. Herbst.(1989). Erythrocyte Membrane Lipid Peroxidation and Glycosylated Hemoglobin in Diabetes, *DIABETES*, VOL. 38, DECEMBER. 1539-1543
- Tshikongo A. K. Kyandabike R.K. Cansa H. M. Bwalya Y. K. Lukumwena Z. K.et Longanga A. O. (2016). Profil De L'hémogramme Chez Les Diabétiques De Type 2 À Lubumbashi En République Démocratique Du Congo.Hemogram Profile in Type 2 Diabetics in Lubumbashi in the Democratic Republic Of Congo.
- Tsuchiya M. Asada A. Kasahara E. Sato E. F. Shindo M. and Inoue M. 2002. Antioxidant protection of propofol and its recycling in erythrocyte membranes. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 165, 54-60.
- Valmadrid C. T. Klein R. Moss S.E. and Klein B.E. (2000). The risk of cardiovascular disease mortality associated with microalbuminuria and gross proteinuria in persons with older-onset diabetes mellitus. *Arch Intern Med*. 160(8): 1093-100.
- Varashree BS. and Gopalakrishna Bhat P.(2011). Correlation of Lipid Peroxidation with Glycated Haemoglobin Levels in Diabetes Mellitus. *Online Journal of Health and Allied Sciences*. Peer Reviewed, Open Access, Free Online Journal Published Quarterly: Mangalore, South India. Volume 10, Issue 2; : ISSN 0972-5997

- Vichova Z. Delannoy B. Robert J.M. Lehot J.J. et Quadiri T. (2009). Sujet à risque diabétique. Elsevier Masson SAS. 3-760-A-05.
- Viskupicova J. Blaskovic D. Galiniak S. Soszy ski M. Bartosz G. Horakova L. and Sadowska-Bartosz I.. (2015).Effect of high glucose concentrations on human erythrocytes in vitro. *RedoxBiology*5.381–387
- Yassin D.Al.and Ibrahim K.A. (1981). Minor haemoglobin fraction and the level of fasting blood glucose, *J. Fac. Med. Univ.*, Baghdad, 23, 373–380).

Annexes

ANNEXE 1 :

Tableau IV : les différent taux d'HbA1c des échantillons utilisés lors des expérimentations.

	HbA1c faible (%)	HbA1c modérée (%)	HbA1c élevée (%)
Test du la dénaturation de l'hémoglobine	6,1	7,5	10,8
	6,3	8,1	11,3
	6,2	8	12
Test de la turbidité cellulaire	6,3	8	12,2
	6,11	8,2	11,8
	6,5	8,3	12,3
	6,2	8,3	15
Test de la peroxydation lipidique	6	8	12,2
	6,4	8,2	11,8
	5,8	8,3	12,3

RESUME

L'objectif du présent travail est d'évaluer l'impact des sérums des diabétiques sur les globules rouges humains *in vitro*. 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) libérée et de la méthémoglobine intracellulaire. Notre étude a dévoilé que ces sérums provoquent une diminution de la concentration cellulaire des GRs ainsi qu'une hémolyse cellulaire importante qui dépend des taux l'hémoglobine glyquée. Le test de l'Hb a révélé une oxydation remarquable de l'Hb. Le test qui indique le degré de la peroxydation lipidique a révélé que l'effet oxydant des sérums de diabétiques est dû à un état de stress oxydant survenu sur la membrane qui s'explique par la formation des malondialdéhydes (MDA) engendré par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) provenant de l'intérieur de la cellule au cour de l'hyperglycémie chronique. Nous pouvons conclure que chez les diabétiques il y'a un impact à l'intérieur du globule rouge avant la lyse cellulaire par l'oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine.

Mots clés : diabète, stress oxydatif, globules rouges, hémoglobine.

Abstract

The objective of this work is to evaluate the impact of diabetic sera on human red blood cells *in vitro*. Cytotoxicity was assessed by determining hemolysis by measuring cell concentration as well as assaying released hemoglobin (Hb) and intracellular methemoglobin. Our study revealed that these sera cause a decrease in the cellular concentration of RBCs as well as a significant cellular hemolysis that depends on the glycated hemoglobin levels. The Hb test revealed remarkable oxidation of Hb. The test, which indicates the degree of lipid peroxidation, revealed that the oxidative effect of the sera of diabetics is due to a state of oxidative stress on the membrane which is explained by the formation of malondialdehydes (MDA) generated by the reactive species oxygen (ROS) from within the cell in the midst of chronic hyperglycemia. We can conclude that in diabetics there is an impact inside the red blood cell before cell lysis by the oxidation of hemoglobin to methemoglobin.

Keywords: diabetes, oxidative stress, red blood cells, hemoglobin

الملخص:

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم تأثير السكري على خلايا الدم الحمراء البشرية مخبريا، ت تقييم السمية الخلوية من خلال تحديد انحلال الدم عن طريق قياس تركيز الخلايا وكذلك تحديد الهيموغلوبين المنطلق (Hb) والميثيموغلوبين داخل الخلايا. خلال هذه الدراسة وجدنا ان مصل مرضى السكري ي مستويات الهيموغلوبين السكري. الهيموغلوبين ركيز كريد لها مستويات الهيموغلوبين السكري. اختبار لذي يشير إلى درجة بيروكسيد الدهون أن التأثير المؤكسد ل مرضى السكري يرجع إلى حالة من الإجهاد التأكسدي على الغشاء الذي يفسر بتكوين (MDA) الأكسجين التفاعلية (ROS) داخل الخلية .

يمكننا أن نستنتج أنه مرضى السكري هناك تأثير داخل خلايا الدم الحمراء قبل تحلل الخلية عن طريق أكسدة الهيموغلوبين إلى الميثيموغلوبين.

الكلمات المفتاحية: الإجهاد خلايا الدم الهيموغلوبين.