



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE, VIE, TERRE ET UNIVERS  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE  
LABORATOIRE DE RECHERCHE  
*PHYSIOLOGIE, PHYSIOPATHOLOGIE ET BIOCHIMIE DE LA NUTRITION*

## THESE

Présentée par : **M<sup>elle</sup> DJELTI FARAH**

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

En Physiologie et Biochimie de la Nutrition

## Thème

Altérations métaboliques et immunitaires chez les femmes enceintes  
diabétiques ainsi que leurs nouveau-nés.

Soutenue le 24 /11/16, devant la commission d'examen:

**Présidente : M<sup>me</sup> MOKHTARI Nassima**, Professeur, Université de Tlemcen

**Directrice de thèse : M<sup>me</sup> MERZOUK Hafida**, Professeur, Université de Tlemcen

**Examinatrice : M<sup>me</sup> SAKER Meriem**, MCA, Université de Tlemcen

**Examinatrice : M<sup>me</sup> AIT YAHIA Dalila**, Professeur, Université d'Oran

**Examinatrice : M<sup>me</sup> BOUKORT Farida**, Professeur, Université d'Oran

Année Universitaire : 2015-2016

*A l'âme de ma grande mère  
Qui est toujours présente dans mon cœur*

## *Dédicaces*

*À mes parents*

*À mes cher Frères (DJAWAD, YACINE)*

*À tous ceux que j'aurais oublié de citer mais  
qui existent au fond de mon cœur et de ma pensée*

# Remerciements

*Je remercie infiniment Mme **MERZOUK Hafida**, Professeur à l'université de Tlemcen, de m'avoir accepté dans son laboratoire et de m'avoir encadré et suivi durant la réalisation de ce travail, qu'elle trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance et mon profond respect pour la confiance qu'elle m'a accordée en me proposant ce thème de recherche, merci pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail, merci pour ses précieux conseils, merci encore une fois pour ses qualités scientifiques et humaines que je lui témoigne durant toute ma vie. Que Dieu le tout puissant la protège, et la garde pour nous tous inchaalah.*

*Je témoigne également ma reconnaissance sincère à Mr **MERZOUK Sid Ahmed**, par son dévouement et intérêt à mon projet recherche et soutien scientifique tout au long de ce travail, son implication, ses critiques constructives dans le domaine des statistiques, ses encouragements, qui ont tous contribué à la réalisation d'un travail de grande qualité*

*Je suis particulièrement reconnaissante à Mme **MOKHTARI Nassima**, Professeur à l'université de Tlemcen pour l'honneur qu'elle m'a fait d'avoir acceptée la présidence du jury de ma thèse. Qu'elle soit assurée de ma respectueuse considération.*

*J'exprime mon estime et mes remerciements aux honorables membres de jury:*

*Madame **SAKER Meriem**, maitre de conférences à l'université de Tlemcen pour avoir accepté de consacrer du temps à examiner et juger ce travail.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Mme **AIT YAHIA Dalila**, Professeur à l'université d'Oran, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de juger mon travail.*

*Je tiens également à remercier Mme **BOUKORT Farida**, Professeur de l'université d'Oran qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être Examinatrice de ce travail et de participer à ce jury.*

*Je remercie infiniment Mme **MEDJDOUB Amel**, Maître de conférences à l'Université de Tlemcen, de m'avoir aidé dans mon chemin de recherche et pour m'avoir initié aux cultures cellulaires.*

*Je remercie très chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce travail, particulièrement : **Mme BABA AHMED Fatima Zohra ; Mme MALTI Nassima ; Mme LOUKIDI Bouchra** pour leur gentillesse sans limite ;*

*Je ne manquerai pas d'exprimer ma plus profonde gratitude et mes chaleureux remerciements aux gynécologues, Infirmières et Sages-Femmes ainsi que les membres du laboratoire du Centre Hospitalo-universitaire de Tlemcen ainsi que ceux de la polyclinique Chetouane et tous ceux ayant contribué à la réalisation de ma thèse spécialement **Dr BENGHDIH M ; Dr MALTI A et Dr CHIKH M.***

*Merci à mes amies qui m'ont soutenu tout au long de mon chemin : **Meriem ; Djamila ; Selma ; Wahiba ; Farah ; Ismahane ; Fatima ; Fadia** et tous les membres du laboratoire PPABIONUT.*

*J'exprime toute ma gratitude à ceux qui m'ont donné goût aux sciences et à la recherche: mes parents et mes enseignants. Sans eux je ne serais pas là, et surtout je ne serais pas moi-même.*

*A tous ceux et celles qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail, qu'ils trouvent ici ma haute considération.*

**MERCI !**

## TABLE DES MATIERES

|   |      |
|---|------|
| LISTE DES TABLEAUX.....   | i    |
| LISTE DES FIGURES.....  | ii   |
| LISTE DES ABREVIATIONS.....   | iv   |
| AVANT PROPOS.....   | iiiv |
| INTRODUCTION.....   | 1    |
| ETAT ACTUEL DU SUJET.....   | 5    |
| 1. Grossesse et diabète gestationnel.....                                     | 5    |
| 1.1. Définition et épidémiologie.....   | 5    |
| 1.2. Modifications physiologiques et physiopathologiques de la grossesse..... | 5    |
| 1.2.1. Métabolisme du glucose pendant la grossesse.....                       | 5    |
| 1.2.2. Physiopathologie du Diabète gestationnel.....                          | 5    |
| 1.3. Facteurs de risque.....  | 7    |
| 1.4. Complications du diabète gestationnel.....                               | 7    |
| 1.4.1. A court terme.....   | 7    |
| 1.4.2. A long terme.....  | 7    |
| 1.5. Dépistage du diabète gestationnel.....                                   | 7    |
| 1.5.1. Test O'Sullivan.....   | 7    |
| 2. Stress oxydatif et diabète gestationnel.....                               | 9    |
| 2.1. Définition du stress oxydant.....  | 9    |
| 2.2. Radicaux libres.....   | 9    |
| 2.3. Origines du stress oxydatif.....   | 9    |
| 2.4. Conséquences du stress oxydatif.....                                     | 14   |
| 2.4.1. Oxydation des macromolécules.....                                      | 14   |
| 2.4.1.1. Acide désoxyribonucléique ou ADN.....                                | 14   |
| 2.4.1.2. Oxydation des protéines.....   | 14   |
| 2.4.1.3. Oxydation des lipides.....   | 14   |
| 2.4.1.4. Oxydation des sucres.....  | 14   |
| 2.4.2. Défenses antioxydantes.....  | 14   |
| 2.5. Stress oxydatif au cours du diabète gestationnel.....                    | 16   |
| 2.5.1. Métabolisme du glucose et production des radicaux libres.....          | 16   |
| 2.5.2. Stress oxydatif, diabète et grossesse.....                             | 25   |
| 3. Defense immunitaire et stress oxydatif (burst oxydatif).....               | 26   |

|   |    |
|---|----|
| 3.1. Rôles de la myéloperoxydase.....   | 26 |
| 3.2. Défense immunitaire et diabète gestationnel .....  | 27 |
| 4. Acides gras et diabète gestationnel .....  | 27 |
| 4.1. Les différents types et fonction des acides gras .....   | 27 |
| 4.2. Acides gras chez le fœtus.....   | 29 |
| 4.3. Effets bénéfiques des acides gras polyinsaturés.....   | 29 |
| 4.4. Composition en acides gras de <i>Nigella Sativa</i> , <i>Linum Usitatissimum</i> et<br><i>Olea Europea</i> ..... | 30 |
| 4.4.1. <i>Nigella sativa</i> (Cumin noir) .....   | 30 |
| 4.4.2. <i>Linum Usitatissimum</i> (Lin cultivé) .....   | 30 |
| 4.4.3. <i>Olea europea</i> (Olivier cultivé) .....  | 33 |

## MATERIEL ET METHODES

|  |    |
|--|----|
| 1. Population étudiée.....   | 36 |
| 1.1. Questionnaire individuel.....   | 36 |
| 1.2. Considérations éthiques.....  | 37 |
| 2 Analyses biochimiques.....   | 37 |
| 2.1. Prélèvements sanguins et Préparation des échantillons.....                  | 37 |
| 2.2. Détermination des teneurs plasmatiques en glucose.....                      | 37 |
| 2.3. Détermination des teneurs plasmatiques en urée.....                         | 38 |
| 2.4. Détermination des teneurs plasmatiques en créatinine.....                   | 38 |
| 2.5. Séparation des lipoprotéines plasmatiques .....                             | 38 |
| 2.6. Détermination des teneurs en cholestérol.....                               | 40 |
| 2.7. Détermination des teneurs en triglycérides.....                             | 40 |
| 2.8. Détermination des protéines totales.....                                    | 40 |
| 2.9. Hémogramme.....   | 40 |
| 2.10. Détermination du statut oxydant / antioxydant .....                        | 41 |
| 2.10.1. Dosage du Malondialdéhyde.....   | 41 |
| 2.10.2. Dosage des protéines carbonylées.....                                    | 41 |
| 2.10.3. Dosage de la vitamine C.....   | 42 |
| 2.10.4. Dosage du Glutathion réduit (GSH).....                                   | 42 |
| 2.10.5. Détermination de l'activité enzymatique antioxydante de la catalase..... | 42 |
| 2.10.6. Dosage du monoxyde d'azote érythrocytaire.....                           | 42 |
| 2.10.7. Dosage de l'anion superoxyde érythrocytaire.....                         | 43 |

|  |    |
|--|----|
| 2.10.8. Détermination du pouvoir antioxydant total du plasma.....  | 43 |
| 3. Etude in vitro.....   | 44 |
| 3.1. Choix des huiles et du modèle d'étude in vitro.....   | 44 |
| 3.2. Isolement des lymphocytes .....   | 46 |
| 3.3. Test de transformation lymphoblastique (TTL) .....  | 46 |
| 3.3.1. Comptage des lymphocytes .....  | 49 |
| 3.3.2. Détermination de la prolifération lymphocytaire par la méthode du MTT   | 49 |
| 3.3.3. Dosage des protéines .....  | 50 |
| 3.4. Dosage des Interleukines .....  | 50 |
| 3.4.1. Dosage des Interleukines 2 (IL-2) .....   | 50 |
| 3.4.2. Dosage des Interleukines 4 (IL-4) .....   | 51 |
| 3.5. Détermination des marqueurs du stress oxydatif au niveau des lymphocytes .....  | 51 |
| 3.5.1. Détermination des taux en Glutathion réduit des lymphocytes .....   | 51 |
| 3.5.2. Détermination de l'activité de la Superoxyde dismutase des lymphocytes...   | 51 |
| 3.5.3. Détermination de l'activité de la Catalase des lymphocytes.....   | 52 |
| 3.5.4. Teneurs en malondialdéhyde (MDA) des lymphocytes .....  | 52 |
| 3.5.5. Teneurs en Protéines Carbonylées des lymphocytes.....   | 52 |
| 3.6. Détermination de la composition en acides gras des membranes des lymphocytes....  | 52 |
| 4 Analyse statistique.....   | 53 |
| <b>RESULTATS ET INTERPRETATION.....</b>  |    |
| 1. Paramètres biochimiques chez les mères et les nouveau-nés.....  | 54 |
| 1.1. Teneurs plasmatiques en glucose et en protéines totales chez les mères et leurs<br>nouveau-nés.....                                 | 54 |
| 1.2. Teneurs plasmatiques en cholestérol, triglycérides, HDL-cholestérol et LDL-<br>cholestérol chez les mères et leurs nouveau-nés..... | 54 |
| 1.3. Teneurs plasmatiques en urée, créatinine et acide urique chez les mères et leurs<br>nouveau-nés.....                                | 54 |
| 2. Statut oxydant / antioxydant chez les mères et les nouveau-nés.....   | 54 |
| 2.1. Pouvoir antioxydant total chez les mères et leurs nouveau-nés.....  | 54 |
| 2.2. Teneurs plasmatiques en vitamine C chez les mères et leurs nouveau-nés.....   | 60 |
| 2.3. Teneurs érythrocytaires en glutathion réduit et en activité de la catalase chez les<br>mères et leurs nouveau-nés.....              | 60 |
| 2.4. Teneurs érythrocytaires en malondialdéhyde et en protéines carbonylées chez les   |    |

|  |     |
|--|-----|
| mères et leurs nouveau-nés.....  | 60  |
| 2.5. Teneurs érythrocytaires en anion superoxyde et en monoxyde d'azote chez les mères et leurs nouveau-nés.....               | 60  |
| 3. Formule de la numération sanguine chez les mères et leurs nouveau-nés.....  | 64  |
| 4. Effets des différentes huiles sur la fonction lymphocytaire in vitro.....   | 64  |
| 4.1. Effets des différentes huiles sur la prolifération des lymphocytes in vitro.....  | 64  |
| 4.2. Effets des différentes huiles sur la sécrétion des cytokines.....   | 67  |
| 4.3. Effets des différentes huiles sur le statut Redox lymphocytaire.....  | 67  |
| 4.3.1. Effets des différentes huiles sur les teneurs en glutathion réduit (GSH) des lymphocytes.....                           | 67  |
| 4.3.2. Effets des différentes huiles sur les teneurs en malondialdéhyde (MDA) et en protéines carbonylées des lymphocytes..... | 71  |
| 4.3.3. Activités de la Superoxyde dismutase (SOD) et de la Catalase des lymphocytes en présence des différentes huiles.....    | 71  |
| 4.4. Composition en acides gras des membranes des lymphocytes chez les mères et leurs nouveau-nés.....                         | 74  |
| 4.4.1. Composition en acide gras saturée (AGS) des phospholipides membranaires chez les mères et leurs nouveau-nés.....        | 74  |
| 4.4.2. Composition en C18:1 n-9 des phospholipides membranaires chez les mères et leurs nouveau-nés.....                       | 74  |
| 4.4.3. Composition en C18:2 n-6 des phospholipides membranaires chez les mères et leurs nouveau-nés.....                       | 74  |
| 4.4.4. Composition en C18:3 n-3 des phospholipides membranaires chez les mères et leurs nouveau-nés.....                       | 77  |
| 4.4.5. Composition en C20:4 n-6 des phospholipides membranaires chez les mères et leurs nouveau-nés.....                       | 77  |
| 4.4.6. Composition en C20:5 n-3 des phospholipides membranaires chez les mères et leurs nouveau-nés .....                      | 77  |
| DISCUSSION.....  | 78  |
| CONCLUSION.....  | 95  |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....   | 97  |
| ANNEXES.....   | 119 |

# LISTE DES TABLEAUX

|                     |   |     |
|---------------------|---|-----|
| <b>Tableau 1 :</b>  | Les principales espèces réactives de l'oxygène.....   | 10  |
| <b>Tableau 2 :</b>  | Composition en acides gras et en vitamine E et K de l'huile de Nigelle,<br>de lin et d'olive .....                        | 34  |
| <b>Tableau 3 :</b>  | Caractéristiques de la population étudiée.....  | 39  |
| <b>Tableau 4 :</b>  | Composition des huiles utilisées.....   | 47  |
| <b>Tableau 5 :</b>  | Taille et densité des cellules sanguines.....   | 49  |
| <b>Tableau 6 :</b>  | Hémogramme chez les mères et leurs nouveau-nés.....   | 65  |
| <b>Tableau 7 :</b>  | Rapports Th1/Th2 (IL-2/IL-4) en présence des différentes huiles.....  | 69  |
| <b>Tableau 8 :</b>  | Composition en acides gras des membranes des lymphocytes chez les<br>mères et leurs nouveau-nés.....                      | 75  |
| <b>Tableau A1 :</b> | Paramètres biochimiques chez les mères et leurs nouveau-nés.....  | 120 |
| <b>Tableau A2 :</b> | Marqueurs du stress oxydatif chez les mères et les nouveau-nés.....   | 121 |
| <b>Tableau A3 :</b> | Prolifération in vitro des lymphocytes en présence de différentes huiles<br>chez les mères et leurs nouveau-nés.....      | 122 |
| <b>Tableau A4 :</b> | Sécrétion des cytokines par les lymphocytes en présence de différentes<br>huiles chez les mères et leurs nouveau-nés..... | 123 |
| <b>Tableau A5 :</b> | Marqueurs Redox intracellulaires des lymphocytes chez les mères et<br>leurs nouveau-nés.....                              | 124 |

# LISTE DES FIGURES

|                    |   |    |
|--------------------|---|----|
| <b>Figure 1 :</b>  | Prévalence de l'hyperglycémie pendant la grossesse .....  | 7  |
| <b>Figure 2 :</b>  | Dépistage du diabète gestationnel.....  | 8  |
| <b>Figure 3 :</b>  | Formation des radicaux libres.....  | 11 |
| <b>Figure 4 :</b>  | Principales sources des radicaux libres.....  | 12 |
| <b>Figure 5 :</b>  | Production de l'anion superoxyde en condition physiologique par la fuite<br>d'électron de la chaîne respiratoire mitochondriale.....  | 13 |
| <b>Figure 6 :</b>  | La peroxydation lipidique.....  | 15 |
| <b>Figure 7 :</b>  | Répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule.....   | 17 |
| <b>Figure 8 :</b>  | Action des principales enzymes antioxydantes.....   | 18 |
| <b>Figure 9 :</b>  | Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de<br>leurs cofacteurs métalliques.....                            | 19 |
| <b>Figure 10 :</b> | Exemple de voies d'élimination des radicaux oxygénés par les vitamines A,<br>C, E.....  | 20 |
| <b>Figure 11 :</b> | Equilibre des couples redox intracellulaires .....  | 21 |
| <b>Figure 12 :</b> | Stress oxydant et diabète .....   | 22 |
| <b>Figure 13 :</b> | Mécanismes reliant l'hyperglycémie au stress oxydant.....   | 24 |
| <b>Figure 14 :</b> | Stress oxydant et défense immunitaire.....  | 28 |
| <b>Figure 15 :</b> | Description et taxonomie des trois espèces: <i>Nigella sativa</i> ; <i>Linum</i><br><i>usitatissimum</i> et <i>Olea europea</i> ..... | 33 |
| <b>Figure 16 :</b> | Méthode d'isolement et purification des lymphocytes.....  | 50 |
| <b>Figure 17 :</b> | Teneurs plasmatiques en glucose et en protéines totales chez les mères et<br>leurs nouveau-nés. ....                                  | 55 |
| <b>Figure 18 :</b> | Teneurs plasmatiques en cholestérol et en triglycérides chez les mères et<br>leurs nouveau-nés. ....                                  | 56 |
| <b>Figure 19 :</b> | Teneurs plasmatiques en LDL et HDL-cholestérol chez les mères et leurs<br>nouveau-nés. ....   | 57 |
| <b>Figure 20 :</b> | Teneurs plasmatiques en urée, créatinine et acide urique chez les mères et<br>leurs nouveau-nés. ....                                 | 58 |
| <b>Figure 21 :</b> | Pouvoir antioxydant total du plasma chez les mères et leurs nouveau-nés.....  | 59 |
| <b>Figure 22 :</b> | Statut antioxydant chez les mères et leurs nouveau-nés. ....  | 61 |

|                    |   |    |
|--------------------|---|----|
| <b>Figure 23 :</b> | Statut oxydant chez les mères et leurs nouveau-nés.....   | 62 |
| <b>Figure 24 :</b> | Teneurs érythrocytaires en monoxyde d'azote (NO) et en anion superoxyde (O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> ) chez les mères et leurs nouveau-nés. .... | 63 |
| <b>Figure 25 :</b> | Effets des différentes huiles sur la prolifération des lymphocytes in vitro.....  | 66 |
| <b>Figure 26 :</b> | Effets des différentes huiles sur la sécrétion des cytokines par les lymphocytes. ....  | 68 |
| <b>Figure 27 :</b> | Effets des différentes huiles sur les taux en glutathion réduit (GSH) lymphocytaire.....  | 70 |
| <b>Figure 28 :</b> | Effets des différentes huiles sur les teneurs lymphocytaires en malondialdéhyde (MDA) et protéines carbonylées (CARP) .....                       | 72 |
| <b>Figure 29 :</b> | Activité de la Superoxyde dismutase (SOD) et de la Catalase des lymphocytes en présence des différentes huiles.....                               | 73 |

## LISTE DES ABREVIATIONS

AA : acide arachidonique  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
AG : Acides gras  
AGMI: Acides gras mono-insaturés  
AGPI : Acides gras polyinsaturés  
AGS : Acides gras saturés  
ALA : Acide alphalinoléique  
AO : acide oléique  
CD4+: Lymphocyte T auxiliaire (en anglais Helper)  
CD8+: Lymphocyte T cytotoxique  
CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone  
Con A: Concanavaline A  
CPA: Cellule présentatrice de l'antigène  
Cu-ZnSOD: Superoxydes dismutases à cuivre-zinc  
DHA: Acide docosahexaénoïque  
DNPH: Dinitrophénylhydrazine  
EDTA: acide éthylène diamine tétracétique  
EOR: Espèces oxygénées réactives  
EPA: Acide eicosapentaénoïque  
ERO : radicaux libres  
GSH: Glutathion réduit  
GSHPX: Glutathion peroxydase  
GSSG: Glutathion oxydé  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peroxyde d'hydrogène  
HGPO : hyperglycémie par voie orale  
HCl: Acide chlorhydrique  
HDL: lipoprotéines de haute densité  
IL: Interleukine  
IMC: Index de masse corporelle  
iNOS: NO synthase inductible  
INS: Insuline  
IRS-1: Insulin receptor substrates  
JNK: c-Jun N terminal Kinase  
LA: acide linoléique  
LB: Lymphocytes B  
LDL: lipoprotéines de faible densité  
LNA: linolenic acid, acide linoléique  
LT: Lymphocytes T  
MCP: Monocyte chimiotactique protéine  
MDA: Malondialdéhyde  
MnSOD: Superoxydes dismutases à manganèse  
MPO: Myéloperoxydase  
MTT: Thiazolyl bleu tétrazolium  
NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit  
NK: Natural killer  
NO: Monoxyde d'azote  
NO<sub>2</sub>-: Ion nitrite  
NO<sub>3</sub>-: Ion nitrate

NOS: NO synthase  
O<sub>2</sub>: Dioxygène  
O<sub>2</sub><sup>•</sup>: Radical superoxyde  
OH<sup>•</sup>: Radical hydroxyle  
OMS: Organisation Mondiale de la Santé  
ONAB: Office nationale d'aliment de bétail  
ONOO<sup>-</sup>: Peroxynitrite  
ONOOH: Nitroperoxyde  
PI3-kinase: phosphatidylinositol 3-kinase  
PKC: Protéine kinase C  
PPRA: Peroxisome proliferators activated receptors  
RE: Réticulum endoplasmique  
RLO: Radical libre oxygéné  
RO<sup>•</sup>: Radical alkoxyde  
ROOH: Hydroperoxydes  
SOD: Superoxyde dismutase  
TBA: Acide thiobarbiturique  
TCA: Acide Trichloroacétique  
Th1 : T helper 1  
Th2 : T helper 2  
TL: Régime témoin enrichi en huile de lin  
TLR: Récepteur Toll-Like  
TNF: Facteurs de nécrose tumorale  
TTL: Test de transformation lymphocytaire  
 $\varepsilon$  : Coefficient d'extinction

# **AVANT PROPOS**



Le travail présenté dans cette thèse de doctorat a fait l'objet d'une publication scientifique et a été présenté par communications lors des congrès scientifiques nationaux et internationaux.

### **PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES**

**DJELTI F**, MERZOUK H, MERZOUK S H, NARCE N (2015). In vitro effects of oil's fatty acids on T cell function in gestational diabetic pregnant women and their newborns. *Journal of Diabetes*. 7:512–522.

### **COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES**

BOUANANE S, MEDJDOUB A, MERZOUK H, **DJELTI F**, BABA AHMED Fz, BENKALFAT N.B, SOULIMANE- MOKHTARI N, NARCE M. (2011). Effets d'un régime hyperlipidique et hypercalorique sur quelques paramètres du stress oxydatif chez la rate gestante et allaitante. Communication affichée présentée oralement au Congrès international de Nutrition le 22-23 mai 2011 à Oran. Algérie.

**DJELTI F**, MERZOUK H (2013). Oxydant and antioxidant status in gestationnel diabetic pregnant mother and their newborns in the region of Tlemcen. Communication présenté oralement au congrès national de biotechnologie des Molécules Bioactives et Pathologie cellulaire « SNBMBPC » le 26-27 Octobre 2013 à Batna. Algérie

**DJELTI F**, MERZOUK H (2015). In vitro effect of Nigella Sativa oil on T cell function in gestationnel diabetic pregnant women and their newborns. Communication affichée au 2ème journée international des Sciences de l'Agriculture, Environnement et santé le 15 avril 2015 à Tlemcen. Algérie

# **INTRODUCTION**



L'association diabète et grossesse est une situation gestationnelle fréquente qui constitue un vrai problème de santé publique dans de nombreux pays à travers le monde. C'est une grossesse à très haut risque en raison des complications maternelles et fœtales qui lui sont inhérentes, et qui peuvent mettre en jeu le pronostic materno-fœtal aussi bien fonctionnel que vital (Maged et al., 2016). Le diabète gestationnel est connu depuis longtemps et il est bien caractérisé actuellement (Olmos Coelho, 2014). Il a été décrit la première fois en 1823 par le physicien allemand Heinrich Bennewitz, qui a observé l'association de différents symptômes comme la soif et la polyurie chez la femme enceinte. Il a considéré que ce type de diabète fait partie des changements métaboliques de la grossesse parce que ces symptômes ainsi que la glycosurie disparaissent après l'accouchement. Dans les années 1940 et 1950, des études publiées montrent qu'une hyperglycémie liée à la grossesse constitue un risque considérable pour l'état de santé de la femme enceinte et augmente le taux de mortalité fœtale. En 1954, un chercheur belge Hoet a publié une étude appelée « le métabolisme des carbohydrates durant la grossesse » et il a introduit le terme de diabète méta gestationnel. Le terme moderne de diabète gestationnel a été utilisé par O'Sullivan en 1961, ce qui désigne « l'intolérance au glucose de la grossesse » (O'Sullivan, 1961).

En ce qui concerne l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le diabète gestationnel est un trouble de la tolérance glucidique conduisant à une hyperglycémie de gravité variable, survenant ou diagnostiqué pour la première fois pendant la grossesse, quel que soit le traitement nécessaire et l'évolution après l'accouchement (WHO, 2012). Cette définition englobe en fait deux entités différentes qu'il convient de distinguer :

- un diabète patent, le plus souvent de type 2, préexistant à la grossesse et découvert seulement à l'occasion de celle-ci, et qui persistera après l'accouchement.
- une anomalie de la tolérance glucidique réellement apparue en cours de grossesse, et disparaissant, au moins temporairement, dans le post-partum.

Cette définition regroupe des affections de gravité variable selon le niveau de la glycémie, ainsi que des complications de gravité différente. Le diabète gestationnel est en fait une maladie fréquente. Il existe actuellement une forte augmentation de l'incidence du diabète qui fluctue généralement entre 2 et 6 % au niveau mondial, mais peut être très variable selon les populations et les tests de diagnostic utilisés (WHO, 2012). En France par exemple la prévalence du diabète gestationnel est de 6.1% (Kong et al., 2015). Les données canadiennes indiquent que 6,50% des femmes avaient un diabète de la grossesse (Ferrara, 2007). Cette hétérogénéité de la population concernée et l'absence de consensus

sur les critères de diagnostic expliquent en partie les estimations variables de la prévalence à travers le monde. En Algérie, la prévalence du diabète gestationnel est estimée entre 2 et 5% mais peut être plus élevée dans certaines populations à risque (Lamri et al., 2014). Cette fourchette de prévalence est liée d'une part à l'hétérogénéité des populations étudiées mais aussi au type de test de dépistage réalisé. Quoiqu'il en soit, cette prévalence est en forte augmentation notamment chez la femme jeune, en lien avec une augmentation du poids et de la sédentarité.

A ce jour, il n'existe pas de recommandations internationales concernant le dépistage du diabète gestationnel. Plusieurs études ont démontré qu'il existait une corrélation entre des niveaux de glycémie élevée et la survenue de complications pendant la grossesse ou l'accouchement. Un dépistage précoce et une prise en charge pluridisciplinaire du diabète gestationnel réduiraient les complications encourues par la mère et l'enfant telles que la macrosomie, la dystocie des épaules et les troubles métaboliques (WHO, 2012).

Si tous les auteurs sont d'accord sur la nécessité du dépistage du diabète gestationnel ainsi que celle d'un suivi strict et d'une prise en charge de toute grossesse diabétique, de nombreuses controverses persistent encore sur le sujet, notamment en ce qui concerne les modalités de dépistage et les critères du diagnostic du diabète gestationnel.

Toutefois, le pronostic de ces grossesses a été considérablement amélioré grâce aux progrès thérapeutiques acquis ces vingt dernières années.

Selon les dernières recommandations du Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (CNGOF), en l'absence de facteurs de risque, le bénéfice et le rapport coût/efficacité du dépistage restent à évaluer (CNGOF, 2010). Il n'y a donc pas d'arguments suffisants pour recommander un dépistage systématique en l'absence de facteurs de risque. Le dépistage du diabète gestationnel est recommandé en présence d'au moins un des critères suivants: âge maternel supérieur ou égal à 35 ans, IMC supérieur ou égal à 25 kg/m<sup>2</sup>, antécédents familiaux au 1er degré de diabète de type 2, antécédents personnels de diabète gestationnel ou d'enfant macrosome (WHO, 2012).

Les évidences indiquent que la résistance à l'insuline, l'inflammation et le stress oxydant semblent étroitement liés à l'anomalie métabolique associée au diabète gestationnel et impliqués dans la résistance à l'insuline (Kim et al., 2010 ; Oliviera et al., 2012).

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et la destruction par des systèmes de défenses antioxydants. Les radicaux libres peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles comme les

protéines, lipides et acides nucléiques. Les radicaux libres sont une forme particulière d'espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un électron célibataire. La formation de radicaux libres est très importante au cours du diabète gestationnel et est à l'origine des complications au cours de la grossesse et même après l'accouchement (Xu et al., 2014). Il est bien démontré que le diabète chez la mère entraîne des altérations du métabolisme des lipides et des glucides (Kheirat et al., 2013). Cette pathologie est aussi caractérisée par une augmentation de l'activité des radicaux libres et une réduction des défenses antioxydantes, marquant ainsi un stress oxydatif évident (Orhan et al., 2003; Kheirat et al., 2013). La corrélation entre stress oxydatif et hyperglycémie est bien connue dans le domaine des complications dégénératives et peut avoir des conséquences néfastes sur le développement fœtal (Alberti-Fidanza et al., 2002). De plus, étant donné que le fœtus est entièrement dépendant de l'apport de nutriment provenant de l'organisme maternel, toute modification du métabolisme de la mère entraîne une altération du métabolisme fœtal.

Le diabète est aussi associé à un dysfonctionnement du système immunitaire dont les effets délétères sur l'organisme en développement ne sont pas à négliger (Schober et al., 2014). Certaines études ont prouvé l'existence d'anomalies immunitaires au cours du diabète gestationnel, marquées par une prolifération anormale des lymphocytes et une sécrétion altérée de cytokines indiquant un état inflammatoire dont les effets délétères sur l'organisme en développement ne sont pas à négliger (Ategbo et al., 2006 ; Khan et al., 2006).

L'alimentation est un facteur environnemental majeur, modifiable, pouvant avoir une action sur le développement fœtale. Les études réalisées au sujet des micronutriments et de leurs rôles potentiellement bénéfiques pendant la grossesse sont de plus en plus fréquentes (Fall et al., 2003 ; Ford et al., 2008 ; Musumeci et al., 2015). Il existe actuellement une forte pression médiatique en faveur de la supplémentation en acides gras poly insaturés (Picone et al., 2009 ; Innis et al., 2013 ; Loomans et al., 2014 ; Valenzuela et al., 2014). L'influence des acides gras polyinsaturés (AGPI) sur le métabolisme des lipides et des lipoprotéines, ainsi que leur rôle immunomodulateur sont à l'origine de nombreux travaux ces dernières années. Les AGPI n-3 par exemple possèdent des propriétés immunosuppressives et des effets favorables sur le métabolisme des glucides et peuvent donc être utilisés dans la prévention et le traitement du diabète (Khan et al., 2006).

Malgré l'existence de travaux sur le statut immunologique maternel lors des grossesses compliquées de diabète gestationnel et son impact sur celui du fœtus et malgré la présence de certains résultats expérimentaux sur les effets bénéfiques des AGPI, aucune étude n'est encore spécifiquement réalisée sur les mères diabétiques et leurs nouveau-nés. De nombreuses études sont donc encore à mettre en place afin d'élucider les effets bénéfiques des AGPI au cours du diabète gestationnel.

D'un autre côté, la vitamine E est une vitamine liposoluble d'origine végétale constituée de huit composés structurellement apparentés et agit comme un antioxydant classique qui piège les radicaux libres. Les données obtenues chez les sujets diabétiques semblent indiquer que la vitamine E pourrait avoir un effet protecteur contre les anomalies métaboliques associées au diabète (Mayer-Davis et al., 2002; Manning et al., 2004; Ble-Castillo et al., 2005). Cependant, ses effets au cours du diabète gestationnel restent à élucider.

Mon travail de thèse de doctorat s'inscrit dans ce contexte qui vise à évaluer les effets des acides gras essentiels et de la vitamine E pendant la grossesse et leurs rôles correcteurs des anomalies immunologiques au cours des grossesses compliquées d'un diabète gestationnel. Par conséquent, les modifications du métabolisme et celles du statut oxydant/antioxydant sont étudiées chez la mère atteinte de diabète gestationnel et chez son nouveau-né. L'utilisation d'un modèle d'étude *in vitro*, les lymphocytes T isolés à partir du sang maternel et fœtal et incubés en présence de différentes huiles (huile de lin, olive, nigelle) ou en présence de la vitamine E, permettra d'éclaircir les effets bénéfiques de ces nutriments, notamment immuno-modulateurs, antioxydants et anti-inflammatoires au cours du diabète gestationnel.

# **ETAT ACTUEL SUR LE SUJET**

## **1. Grossesse et diabète gestationnel**

### **1.1. Définition et épidémiologie**

Le diabète gestationnel est défini par l'organisation mondiale de la santé comme étant un trouble de la tolérance glucidique conduisant à une hyperglycémie de sévérité variable. Ce trouble est mis en évidence pour la première fois pendant la grossesse quels que soient le traitement nécessaire et/ou l'évolution dans le post partum (OMS, 2013).

Selon la FID, en 2013, 16,8 % des enfants nés vivants, ont une mère ayant développé une forme quelconque d'hyperglycémie durant leur grossesse (FID, 2013).

La prévalence du diabète gestationnel dans le monde varie entre 2 et 22% selon les ethnies et stratégies de dépistages utilisés (Figure 1) (Galtier, 2010).

En Algérie, la prévalence du diabète gestationnel varie entre 2 à 5% des femmes enceintes (Fortas, 2012 ; Lamri et al., 2014).

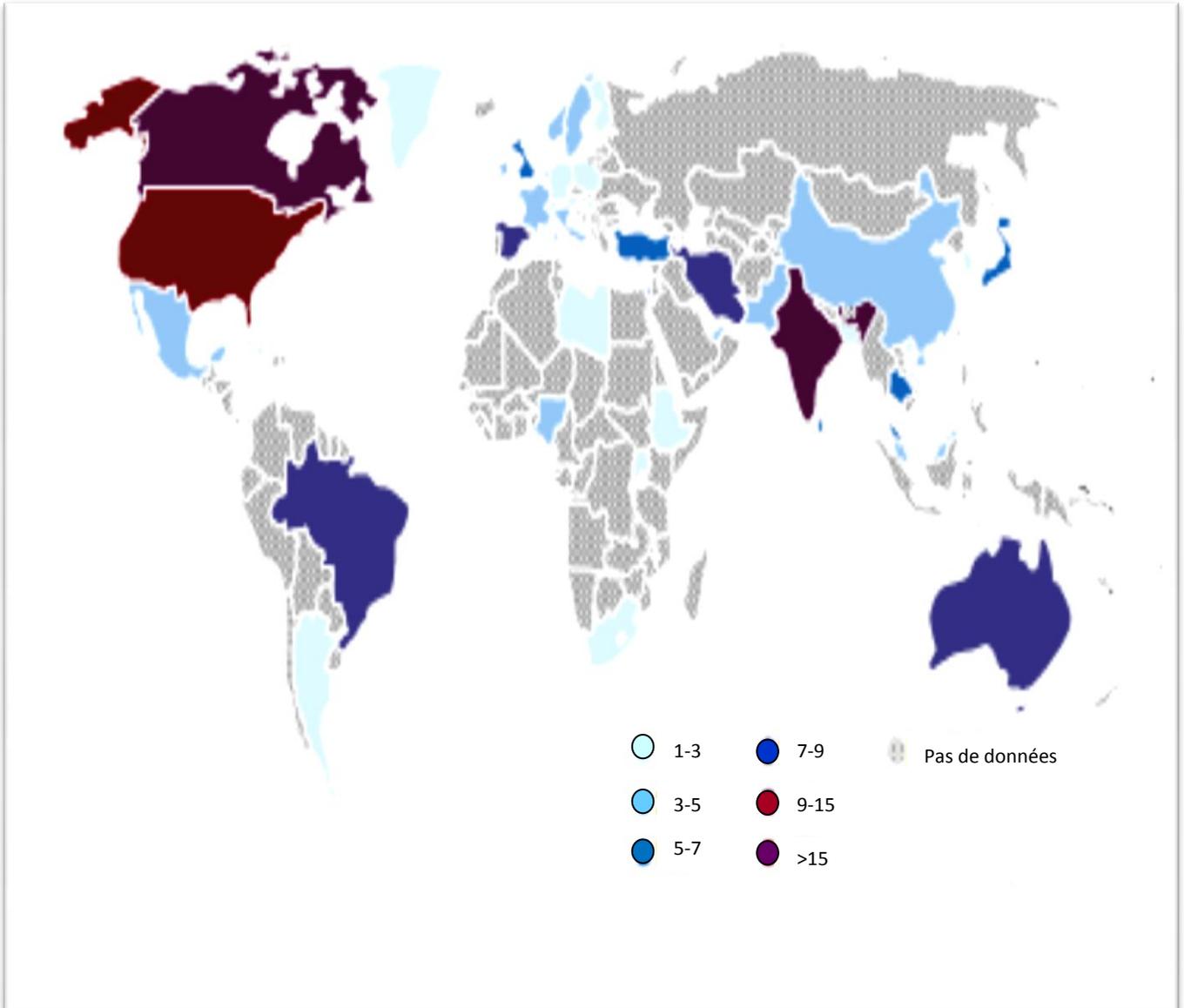
### **1.2. Modifications physiologiques et physiopathologiques de la grossesse**

#### **1.2.1. Métabolisme du glucose pendant la grossesse**

Le glucose est le principal nutriment acheminé au fœtus par l'intermédiaire du placenta (Vambergue, 2011). La grossesse s'accompagne de modifications métaboliques glucidiques afin de répondre aux besoins énergétiques du fœtus. Pendant la grossesse, il se crée un état diabétogène, une insulino-résistance s'installe et s'amplifie tout au long du troisième trimestre (Vambergue, 2011).

#### **1.2.2. Physiopathologie du Diabète gestationnel**

Le diabète gestationnel (DG) est la conséquence d'un défaut d'adaptation à l'insulino-résistance qui s'installe physiologiquement au cours de la grossesse (Valle et al., 2011). Ce défaut d'adaptation est provoqué par une réponse insulinique insuffisante à une charge glucidique ou par une résistance excessive à l'action de l'insuline, ou par les deux phénomènes à la fois. L'insulino-résistance résulte d'un effet «anti-insulinique» des hormones produites par le placenta comme la HPL (human placental lactogene) ou d'une altération du transport de glucose suite a une réduction du nombre de GLUT4 et une diminution de la phosphorylation de la tyrosine de la sous-unité  $\beta$  du récepteur à l'insuline (Beucher et al., 2010)



**Figure 1 : Prévalence de l'hyperglycémie pendant la grossesse (FID, 2013)**

### **1.3. Facteurs de risque**

Les facteurs de risque du diabète gestationnel sont: l'âge maternel (> 30 ou 35 ans), le surpoids maternel avant la grossesse (BMI > 25 kg/m<sup>2</sup>), la prise de poids excessive pendant la grossesse, l'origine ethnique (origine indienne et asiatique, notamment chinoise ; le risque chez les races noires et hispaniques est plus controversé), les antécédents familiaux de diabète, les antécédents de diabète gestationnel ou de macrosomie, les antécédents d'hypertension artérielle (Jacqueminet, 2010).

### **1.4. Complications du diabète gestationnel**

#### **1.4.1. A court terme**

Le diabète gestationnel est associé à un risque accru d'hypertension artérielle gravidique et de pré-éclampsie chez la mère (Riceet al., 2016). Chez le nouveau né, étant donné que l'insuline est une hormone anabolisante et un facteur essentiel de la croissance fœtale, le diabète gestationnel est associé souvent a une augmentation du poids de naissance supérieur à 4 kg appelé macrosomie (Mitanchez, 2010).

#### **1.4.2. A long terme**

Le risque majeur du diabète gestationnel est de développer un diabète de type 2 après l'accouchement. En effet, un antécédent de diabète gestationnel multiplie le risque d'avoir ce type de diabète (Burguet, 2010).

Le diabète maternel augmente également le risque de l'obésité chez la descendance et la tendance à développer un syndrome métabolique durant l'enfance et l'adolescence (Burguet, 2010).

### **1.5. Dépistage du diabète gestationnel**

#### **1.5.1. Test O'Sullivan**

Le test de dépistage O'Sullivan consiste à doser la glycémie veineuse une heure après ingestion de 50 g de glucose, que la femme soit à jeun ou non. Le dépistage était considéré comme positif si la glycémie était supérieure à 7,8 mmol/L. En cas de dépistage positif, il était nécessaire de réaliser un test diagnostique qui reposait sur une étude HGPO, Une charge de 100g de glucose était donnée à la patiente puis la glycémie est mesurée à jeun, à 1heure, à 2 heures et à 3 heures après le début du test. Les valeurs seuils étaient respectivement 5.3mmol/L, 10.1mmol/L, 8.6mmol/L et 7.8mmol/L. Le test était positif si au moins deux des valeurs précitées étaient dépassées (Vinokuroff, 2013) (Figure 2).

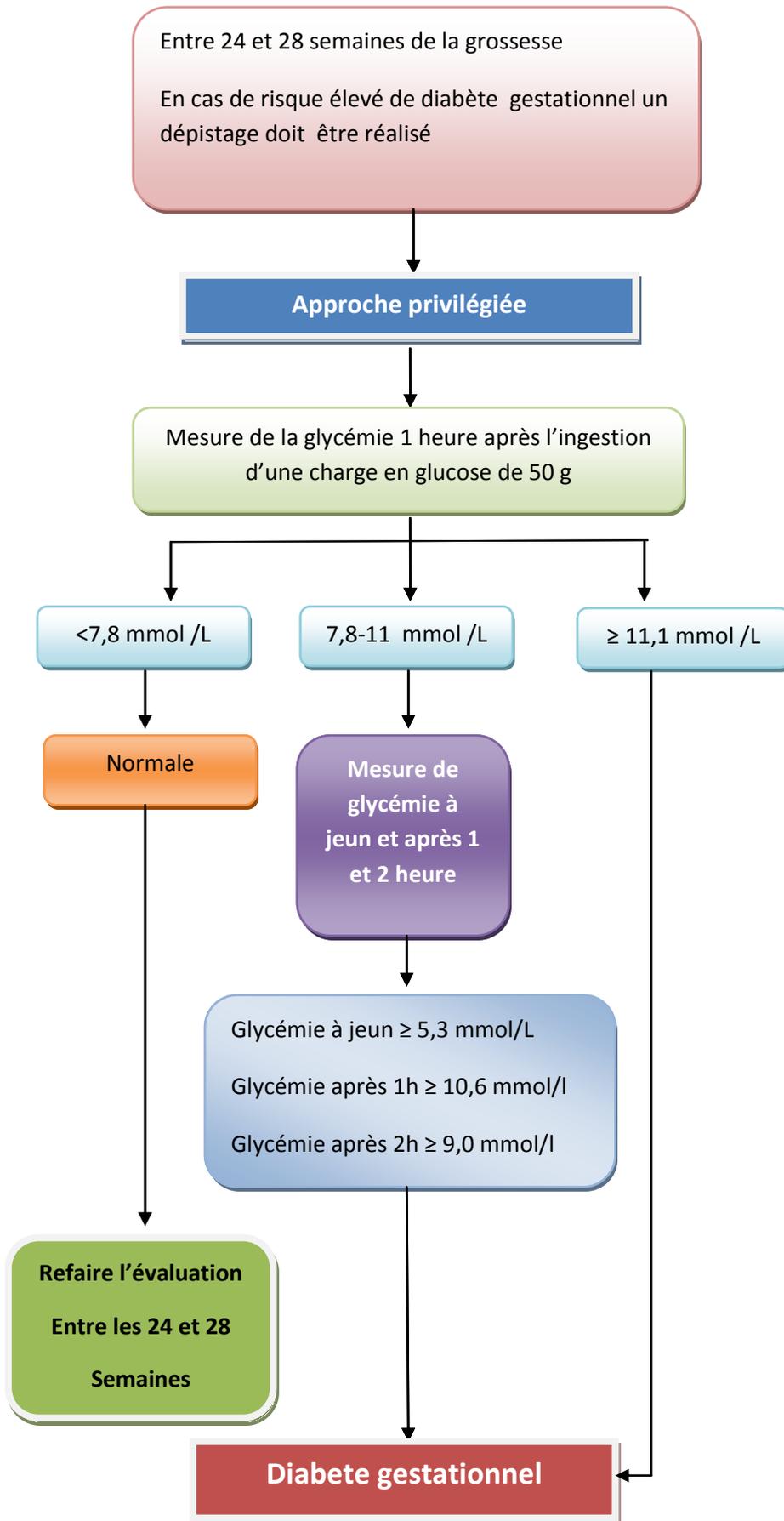


Figure 2 : Dépistage du diabète gestationnel (Vinokuroff, 2013)

## 2. Stress oxydatif et diabète gestationnel

### 2.1. Définition du stress oxydant

Le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres (espèces pro-oxydantes) et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs par des systèmes de défense anti-oxydantes (Datta et al., 2015 ; Kozlik et al., 2015).

### 2.2. Radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques possédant un électron célibataire sur leur couche périphérique, Ils ont une forte tendance à participer dans des réactions en chaîne qui peuvent endommager plusieurs molécules (Jones, 2008). Cette propriété rend les radicaux libres aptes à réagir avec différentes molécules, dont les composés cellulaires: lipides, protéines et acides nucléiques (Shieh et al., 2010). Les radicaux libres incluent deux types de molécules réactives : les radicaux libres de l'oxygène (ROS ou ERO) qui comprennent des dérivés radicalaires comme l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) ou le radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ) (Tableau 1) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (Ayaz et al., 2015 ; Li et al., 2015). Les espèces azotées actives (RNS) sont définies comme un sous groupe d'oxydants dérivés de l'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote (NO) (Figure 3) (Johns et al., 2015 ; Weidinger et Kozlov, 2015).

### 2.3. Origines du stress oxydatif

Le stress oxydant a plusieurs origines. Les principales espèces réactives oxydantes dérivées de l'oxygène et de l'azote peuvent être produites par le métabolisme cellulaire normal tout comme pathologique ou par exposition environnementale. Il peut provenir de l'environnement comme l'exposition prolongée au soleil, à l'ozone, tabagisme, consommation excessive d'alcool, contact avec des agents cancérigènes, consommation de médicaments, pollution (Figure 4). Toutes ces situations génèrent un stress oxydant (Fisher-Wellman et Bloomer, 2009 ; Pace et al., 2015).

Par ailleurs, il est généralement accepté que le complexe III mitochondrial est un générateur important d'anion superoxyde dans la cellule (Figure 5) (Bouzid et al., 2015).

**Tableau 1 : Les principales espèces réactives de l'oxygène**

| Espèces réactives  | Réaction de formation   | Propriétés   |
|--|---|--|
| L'Anion Superoxyde<br>(O <sub>2</sub> <sup>-°</sup> )    | Formé par la réduction mono électrique de l'oxygène: addition d'un seul électron<br>$O_2 + 1 e \longrightarrow O_2^-$   | C'est le radical le moins réactif mais le précurseur des autres ERO (Koechlin, 2006)   |
| Le Peroxyde d'Hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | Produit à partir de l'anion superoxyde, réaction catalysée par la superoxyde dismutase (Raccach, 2004)<br>$O_2^- + O_2^- \longrightarrow H_2O_2 + O_2$  | La majeure partie de la toxicité de l'eau oxygénée provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle (OH°) (Gardès-Albert et Jore, 2003)  |
| Le Radical Hydroxyle<br>(OH°)                            | Formé par la réaction de Fenton à partir d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en présence de métaux de transition: L'ion ferreux réagit avec le peroxyde d'hydrogène (Goudable et Favier, 1997)<br>$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow OH^\bullet + Fe^{3+} + OH^-$  | Le radical hydroxyle (°OH) est le radical le plus avide d'électron et le plus dangereux pour l'organisme (Gardès-Albert et Jore, 2003)   |
| Le Monoxyde d'Azote<br>(NO)                              | Le NO est formé à partir de l'un des deux atomes d'azote terminal du groupement guanidine de la L-arginine, d'une part, et de l'oxygène moléculaire (O <sub>2</sub> ) d'autre part en présence de cofacteur: NADH, H <sup>+</sup> , réaction catalysée par les NO synthase (Nos) (Sabry et al., 1996) | Le NO est un radical libre qui est surtout réputé pour ses propriétés physiologiques (agit sur le tonus vasculaire) (Barouki, 2006)  |
| Le Peroxynitrite<br>(ONOO <sup>-</sup> )                 | En l'absence d'une quantité suffisante de cofacteurs ou de substrat (arginine), les NOS produisent de l'anion superoxyde (O <sub>2</sub> <sup>-°</sup> ) plutôt que du NO•, le superoxyde produit lie le NO• pour former du Peroxynitrite (Massion et Balligand, 2003)                                | Très réactif et sans doute responsable d'un stress oxydant. Il engendre des oxydations irréversibles et des nitrations diverses (surtout des résidus tyrosines) (Massion et Balligand, 2003) |

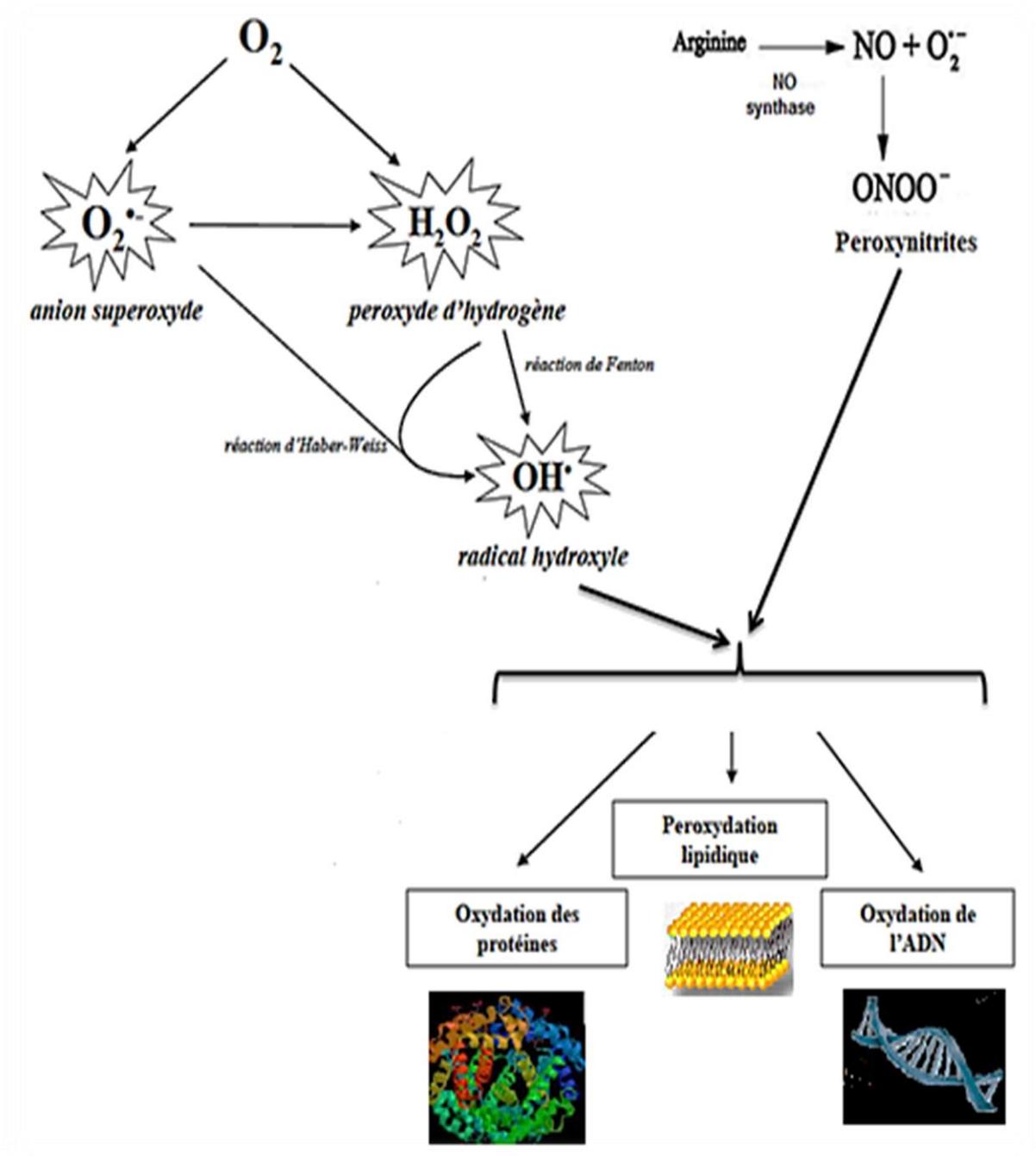


Figure 3 : Formation des radicaux libres (Afonso et al., 2007)

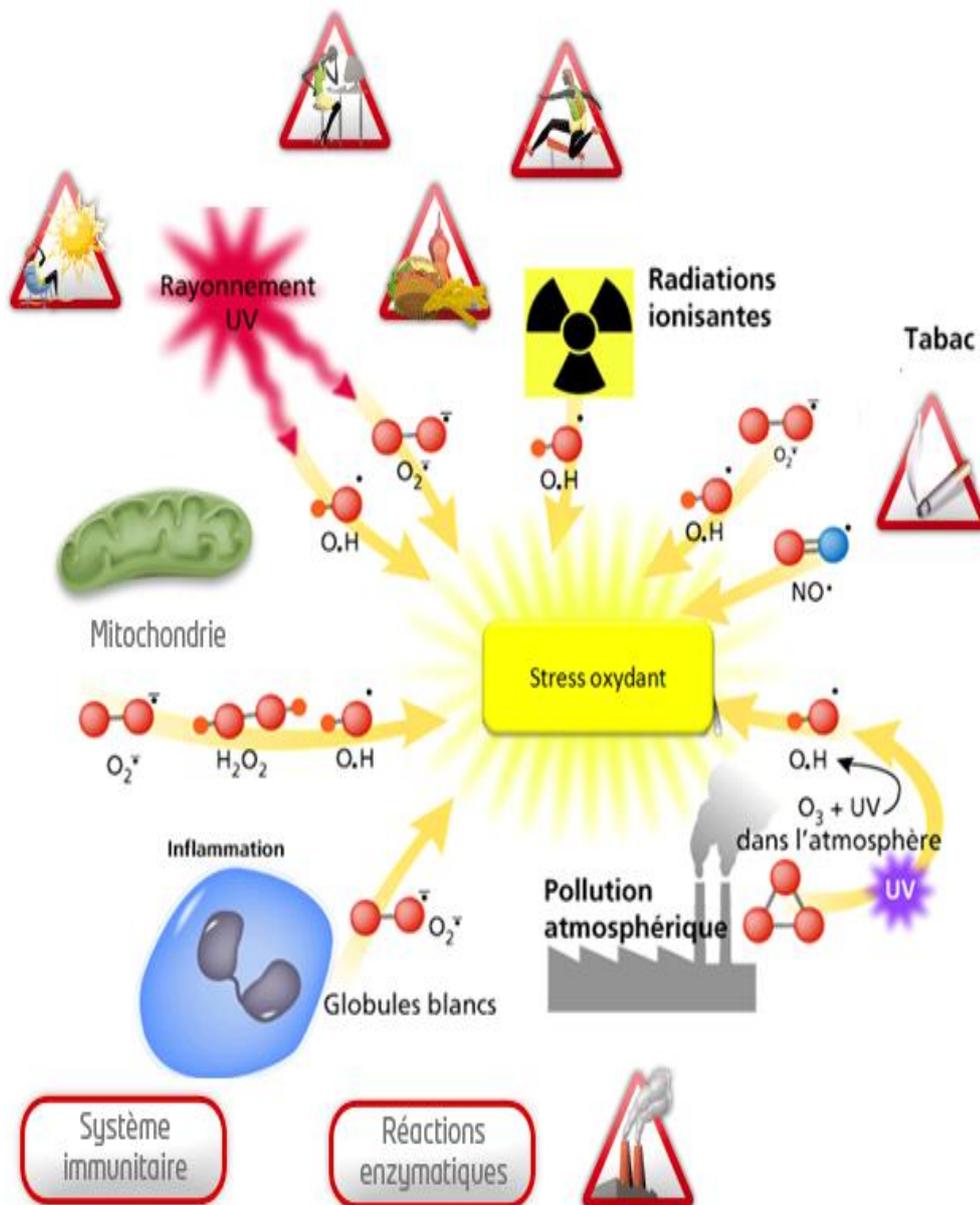
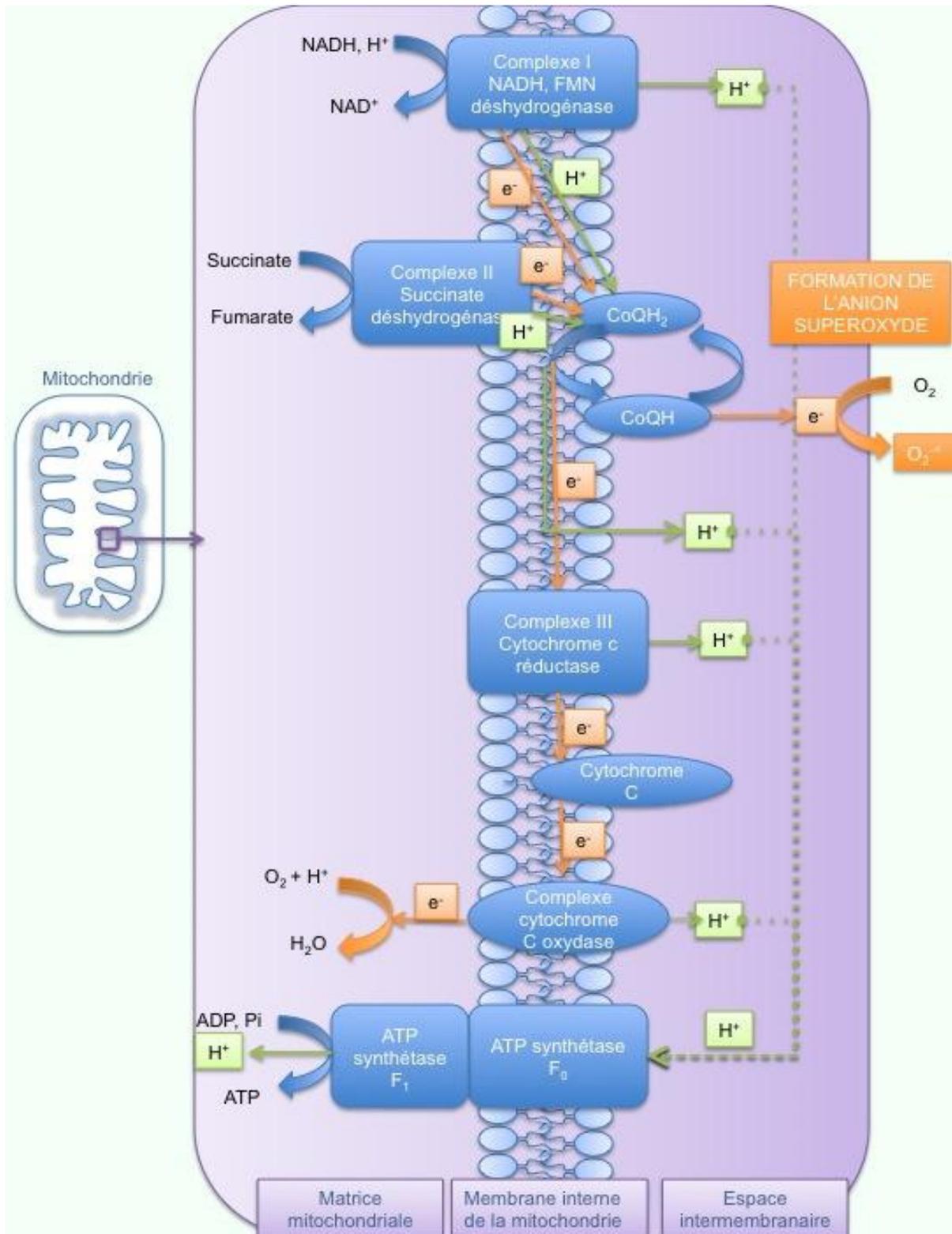


Figure 4 : Principales sources des radicaux libres (Sovari et Dudley, 2012)



**Figure 5 : Production de l'anion superoxyde en condition physiologique par la fuite d'électron de la chaîne respiratoire mitochondriale (Arousseau, 2002)**

## **2.4. Conséquences du stress oxydatif**

### **2.4.1. Oxydation des macromolécules**

#### **2.4.1.1. Acide désoxyribonucléique ou ADN**

L'ADN est une cible privilégiée pour les radicaux libres. La guanine peut réagir avec  $\text{OH}\cdot$  pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui s'associera avec l'adénine au lieu de s'apparier avec la cytosine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement (Ohnishi et al., 2015).

#### **2.4.1.2. Oxydation des protéines**

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des radicaux libres. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec, pour conséquence, l'apparition de groupements carbonylés, et des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes (Wang et al., 2015). La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (Peng et al., 2015 ; Rosa-Lima et al., 2015).

#### **2.4.1.3. Oxydation des lipides**

L'oxydation des lipides ou peroxydation lipidique correspond à la détérioration oxydative des doubles liaisons d'acides gras insaturés (AGI) (Figure 6) (Niki, 2014). Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire. Les peroxydes continueront à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes (malondialdéhyde, 4-hydroxynonéanal) (Sampath et al., 2010).

#### **2.4.1.4. Oxydation des glucides**

Par auto-oxydation, les sucres comme le glucose forment des composés dicarboxylés (contenant deux  $\text{C}=\text{O}$ ), dont les plus connus sont les glyoxal et les glycolaldéhydes, qui pourront se lier à des protéines par réaction de Maillard et altérer les propriétés chimiques de celles-ci (Park et Jae, 2012).

### **2.4.2. Défenses antioxydantes**

L'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes, on distingue deux sources : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et

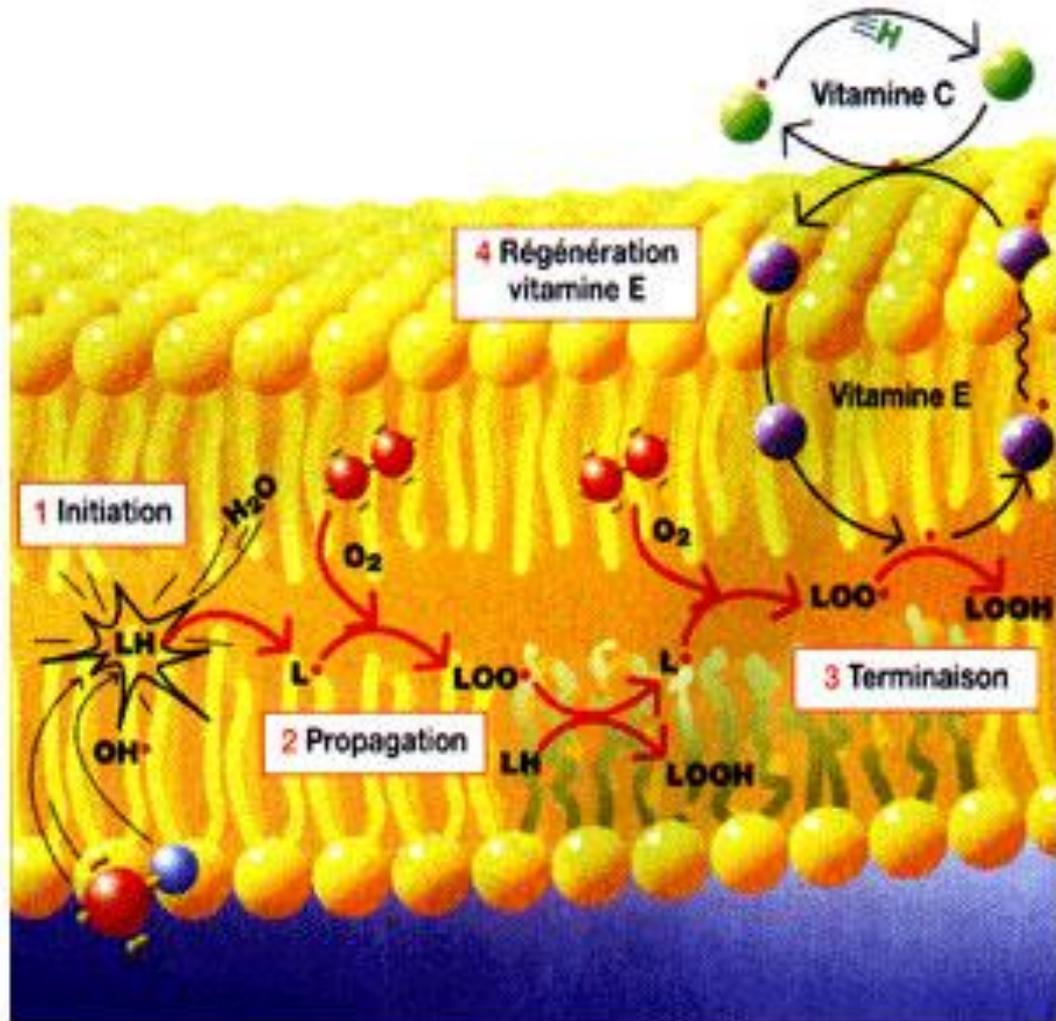


Figure 6 : Peroxydation lipidique (Favier, 2003)

légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxydedismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine). A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes (Borut et Rok, 2014).

La répartition des antioxydants dans la cellule est donnée dans la Figure 7. Le mécanisme réactionnel invoqué dans la détoxification enzymatique est résumé dans les Figures 8 ; 9 et 10.

Il est important de noter que dans les conditions physiologiques, la cellule présente un équilibre de la balance oxydante / antioxydante (Figure 11).

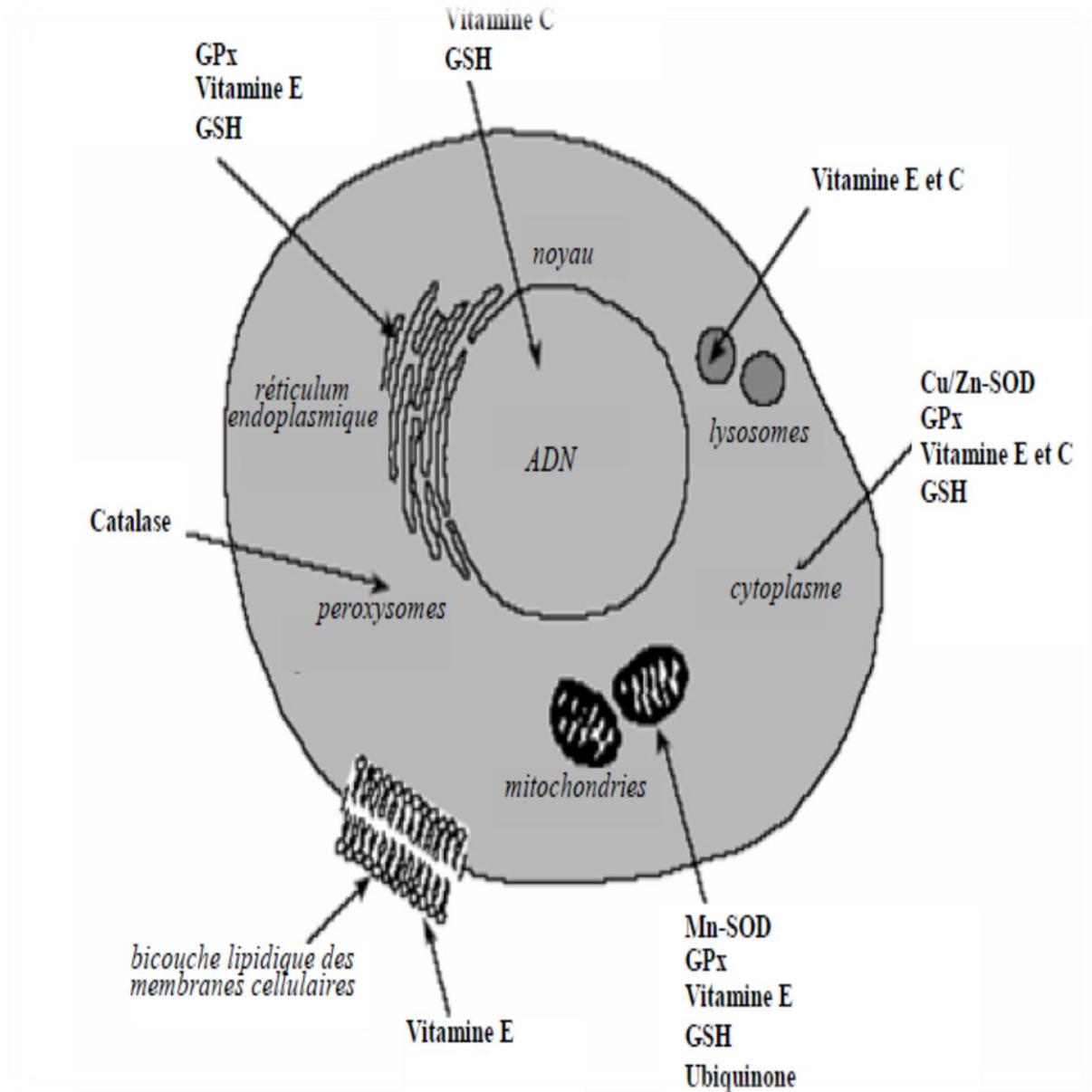
## **2.5. Stress oxydatif au cours du diabète gestationnel**

L'état d'hyperglycémie chronique du diabète sucré conduit à un stress oxydant. Plusieurs mécanismes semblent impliqués dans la genèse de ce stress oxydant: auto-oxydation du glucose, glycation des protéines, voie des polyols, surproduction de radical superoxyde au niveau de la mitochondrie et de la NAD (P) H oxydase. L'équilibre glycémique joue donc un rôle très important dans la balance pro-oxydants/anti-oxydants. Ce stress oxydant est impliqué dans la physiopathologie des complications du diabète (Figure 12).

### **2.5.1. Métabolisme du glucose et production des radicaux libres**

On dénombre trois grands systèmes générateurs de radicaux libres dépendant du glucose:

- ❖ **L'auto-oxydation du glucose:** En présence de fer, le glucose s'oxyde, entraînant la génération d'ERO, mais aussi la production de la forme aldéhyde du glucose, le glyoxal. Cette molécule se fixe rapidement sur les protéines dans lesquelles apparaît un résidu carboxyméthyl lysine (CML). Ce groupement capte facilement le cuivre, ce qui provoque le déclenchement de réactions de type Fenton avec production de radicaux libres et augmentation de la peroxydation lipidique. Ce mécanisme pourrait expliquer pourquoi le diabète est souvent associé à des complications cardio-vasculaires (Chong et al., 2007 ; Yan, 2014).



**Figure 7 : Répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule (Favier, 2003)**

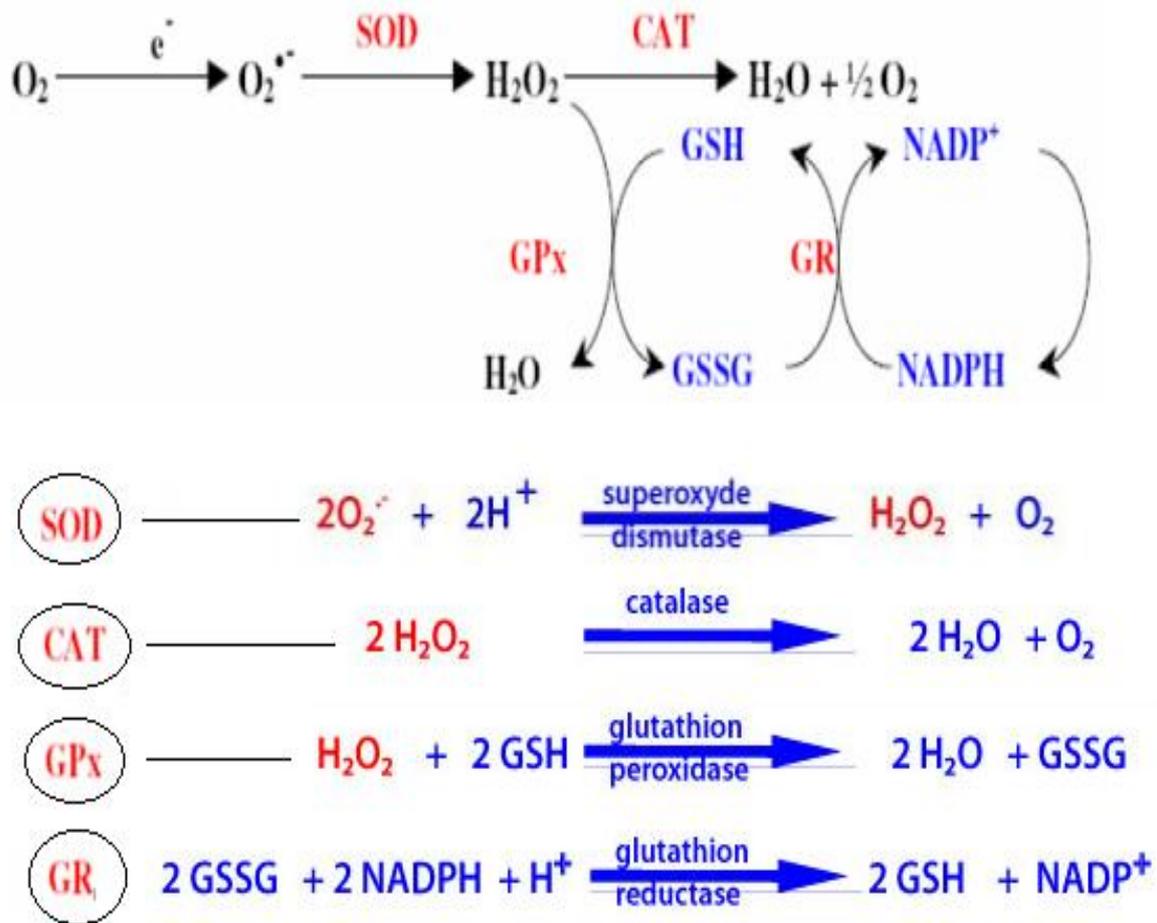


Figure 8 : Action des principales enzymes antioxydantes (Favier, 2003)

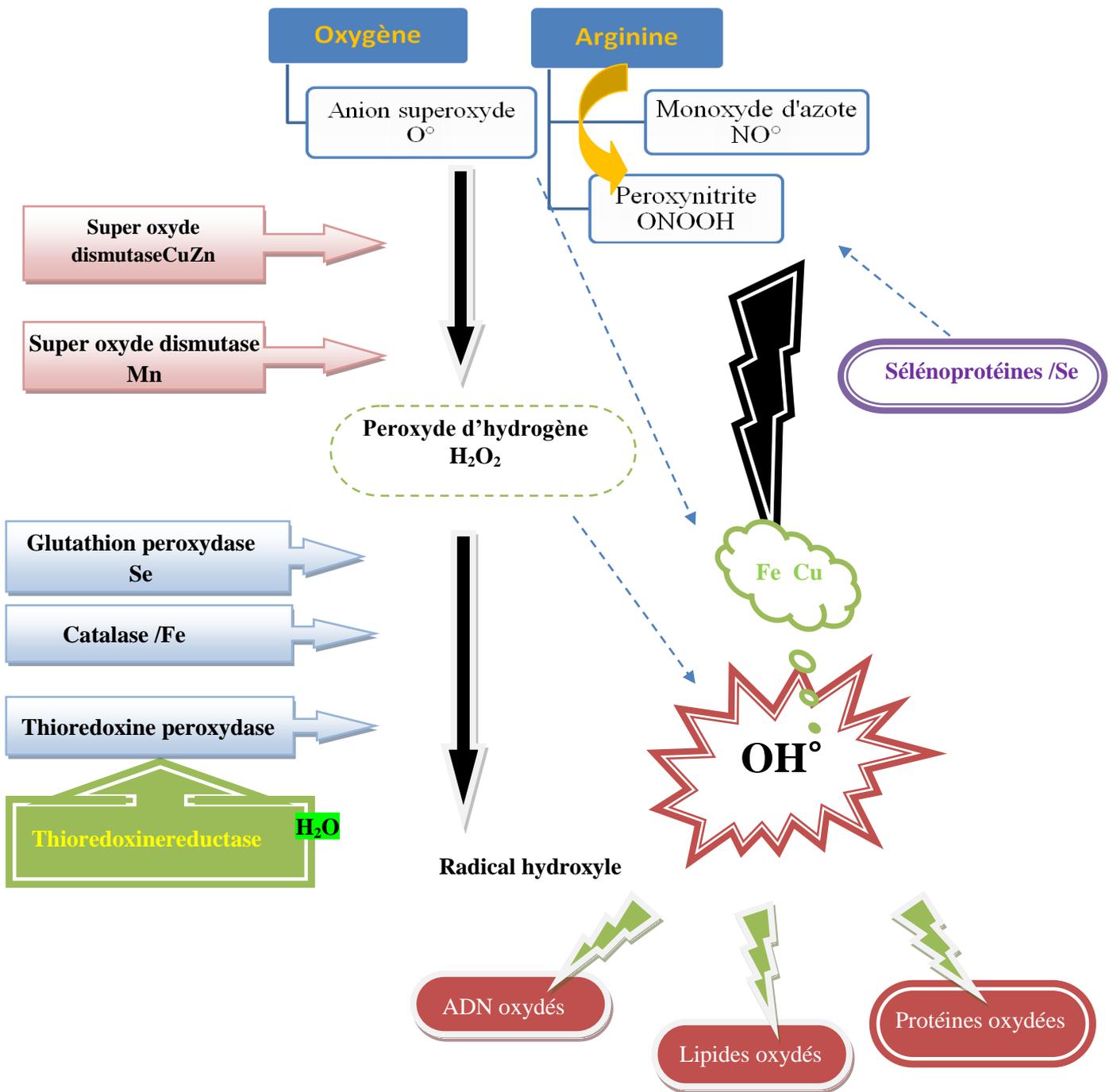
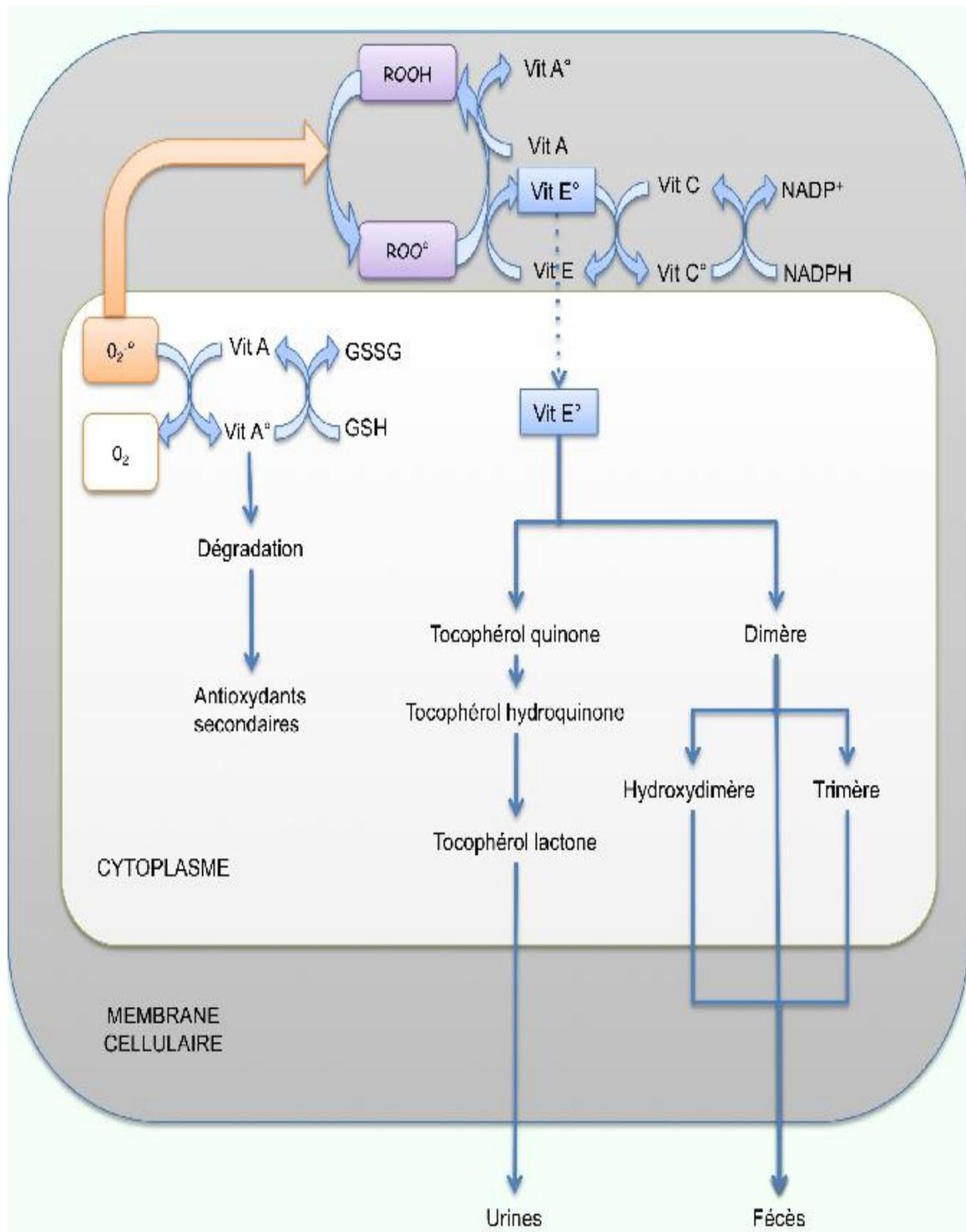
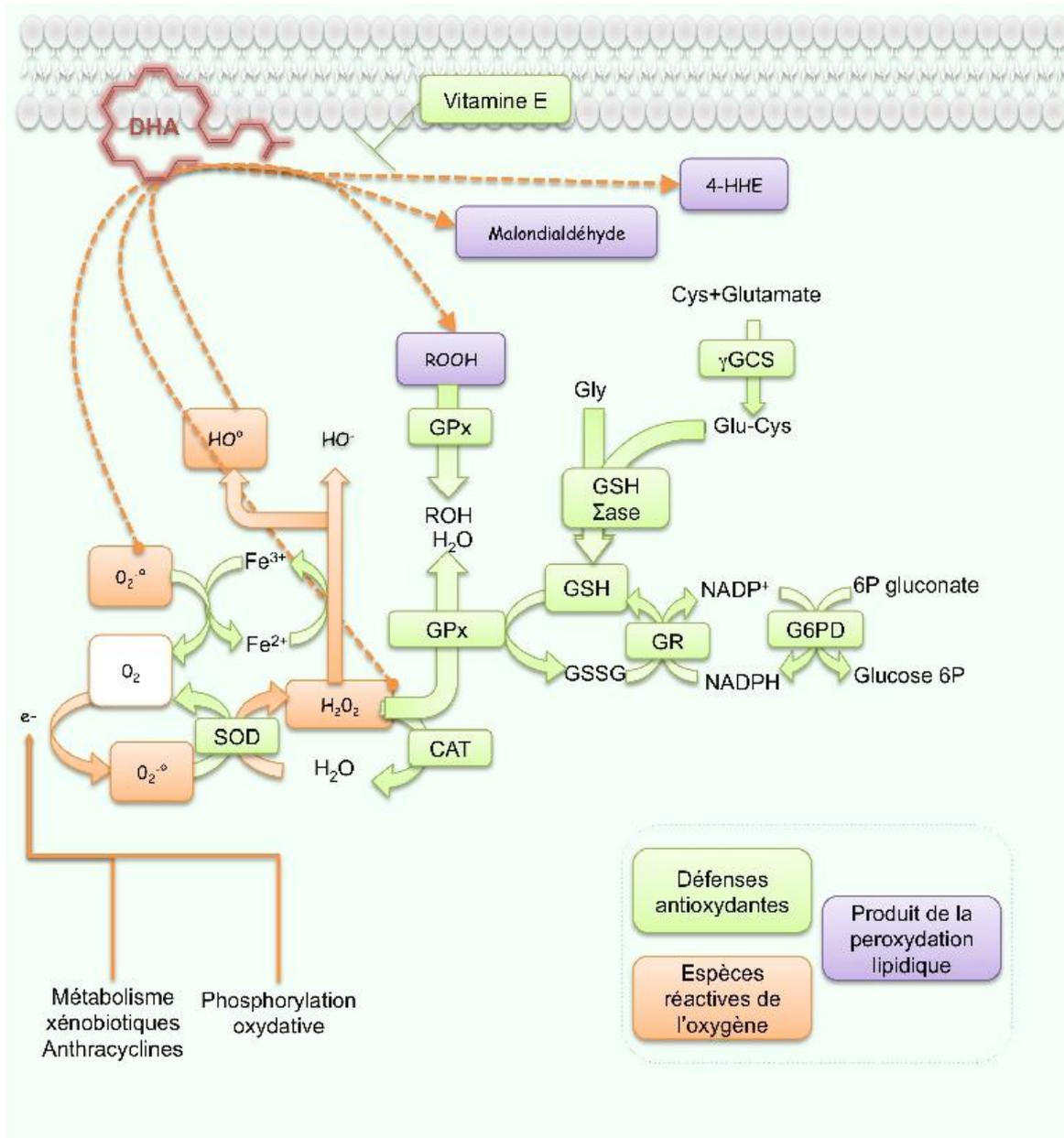


Figure 9 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Mates et al., 1999)



**Figure 10 : Exemple de voies d'élimination des radicaux oxygénés par les vitamines A, C, E (Arousseau, 2002)**

Vit A : vitamine A, vit C : vitamine C, vit E : vitamine E, ROOH : hydro peroxyde lipidique; ROO° : radical peroxyde, X° : forme radicalaire des différents composés, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé.



**Figure 11 : Equilibre des couples redox intracellulaires (Vibetet al., 2008)**

Les espèces réactives de l'oxygène sont l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyle ( $HO^{\bullet}$ ). Les enzymes anti-oxydantes sont : la superoxydedismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx). Les enzymes de synthèse ou de régénération du glutathion sont la gamma glutamyl cystéine synthétase ( $\gamma$ GCS), la glutathion synthétase (GSH Synthase), la glutathion réductase (GR), et la glucose 6 phosphate déshydrogénase (G6PD). Les produits de peroxydation lipidique sont les hydroperoxydes lipidiques (ROOH), le malondialdéhyde, le 4- hydroxyhexenal (4HHE).

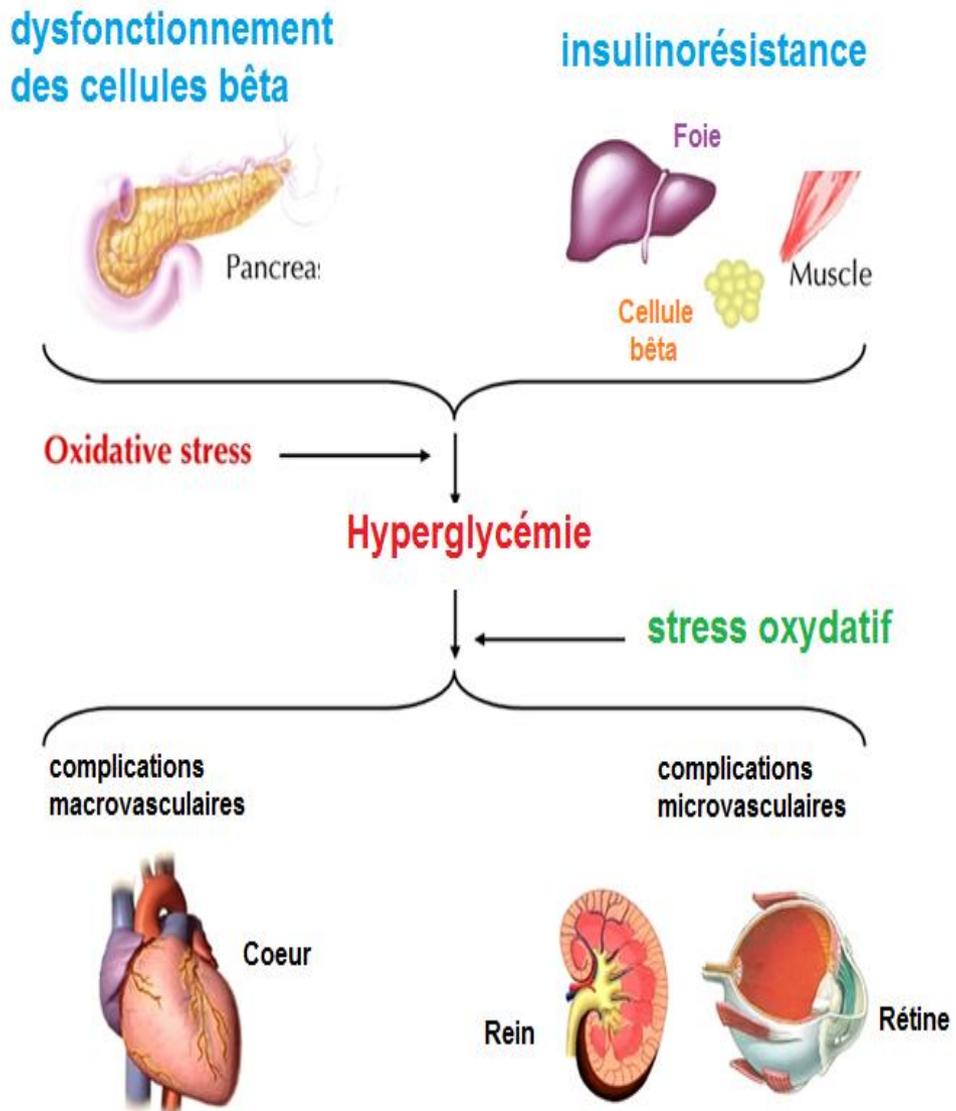


Figure 12 : Stress oxydant et diabète (Pitocco et al., 2010)

❖ **La voie des polyols:** En situation d'hyperglycémie, les voies de phosphorylation du glucose dans la glycolyse, est inhibée en présence de fortes concentrations de glucose (Figure 13). Le glucose, de ce fait, s'accumule dans les tissus non insulino-dépendants, et active la voie des polyols. La principale conséquence de l'activation de cette voie est la modification du statut redox intracellulaire résultant de la baisse des rapports de  $\text{NADPH, H}^+/\text{NADP}^+$  et  $\text{NAD}^+/\text{NADH, H}^+$ . La modification du statut redox peut altérer le fonctionnement de nombreuses enzymes antioxydantes comme la glutathion-réductase, l'ascorbate-réductase, et la NO-synthase qui utilisent le NADPH comme cofacteur (Bonnefont-Rousselot, 2004).

❖ **La formation des produits avancés de la glycation (AGE):** Une des conséquences essentielles de l'hyperglycémie est la glycosylation non enzymatique ou glycation des protéines. Le glucose réagit selon une réaction non enzymatique avec les groupements aminés des protéines, des acides nucléiques et lipidiques dans une série d'étapes qui se traduisent par la formation de base de Schiff et des produits d'Amadori et aboutit finalement à de gros polymères, les AGE (Advanced Glycation End Product) (Park et Jae, 2012).

❖ **L'activation de la protéine kinase C (PKC) :** L'hyperglycémie intracellulaire entraîne l'activation de la PKC, contribuant ainsi aux anomalies des flux sanguins locaux, consécutives à la diminution de  $\text{NO}^\bullet$  et/ou la libération d'endothéline-1 (Kinoshita et al., 2008).

❖ **L'épuisement des antioxydants sériques et cellulaires:** Chez les patients diabétiques, les concentrations de l'acide ascorbique au niveau du sang et les globules blancs sont diminués d'une façon significative alors que les produits d'oxydation sont à des concentrations très élevés. L'acide urique et le Q10 sont réduits chez les diabétiques (Moshe et al., 2000). L'élévation de la concentration des métaux de transition comme celle du cuivre ou de fer joue un rôle dans le stress oxydatif lié au diabète car ils catalysent la réaction de formation des radicaux libres. D'autre part, il y a une carence en zinc chez les diabétiques, d'où réduction de l'activité de la SOD (Dario et al., 2010).

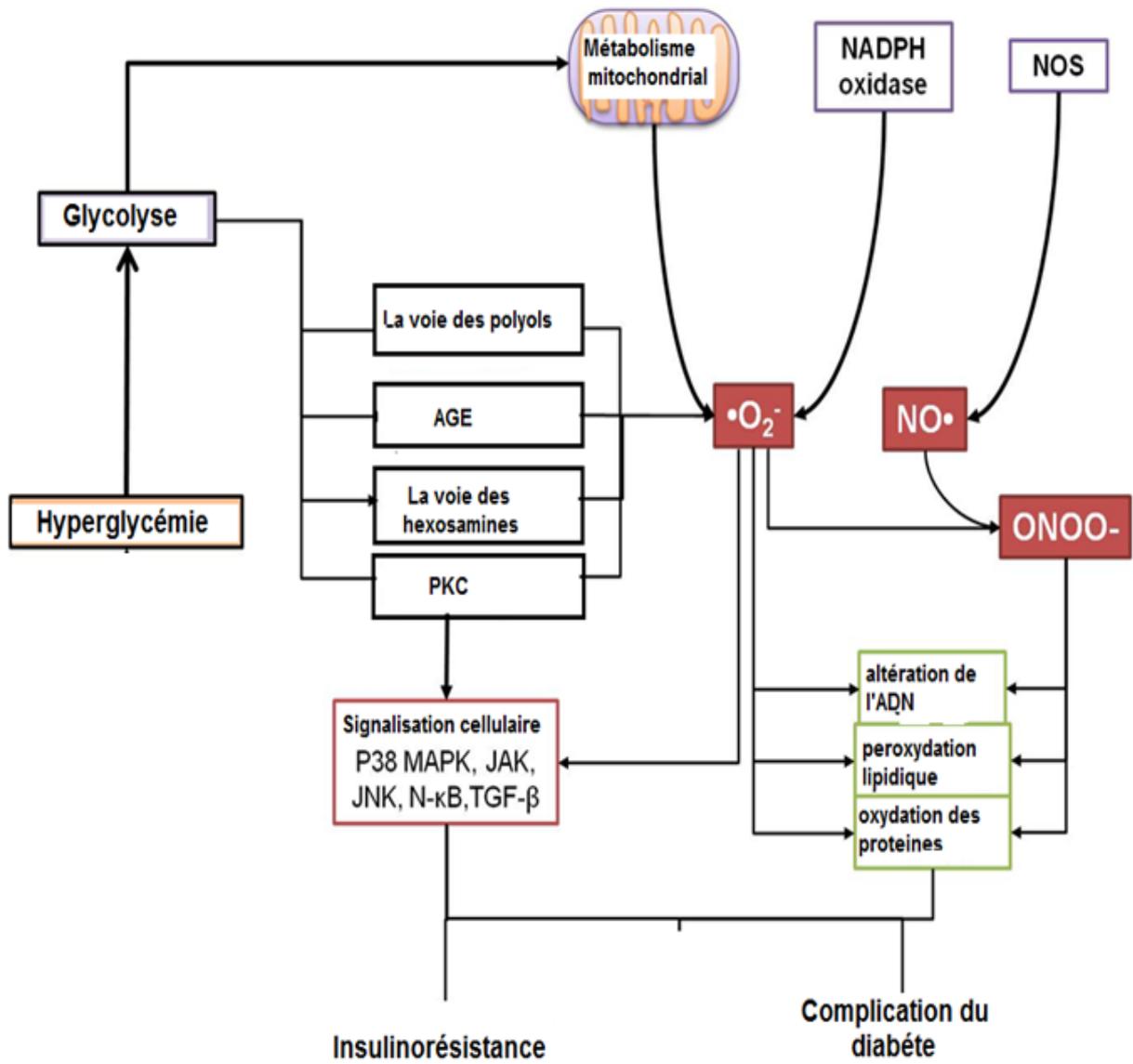


Figure 13 : Mécanismes reliant l'hyperglycémie au stress oxydant (Morales-González et al., 2014)

❖ **La production de radicaux libres par la mitochondrie:** La principale source de production des EROs dans les états hyperglycémiques est la respiration mitochondriale. En effet, il a été montré que l'hyperglycémie favorise le gradient électrochimique de la membrane interne mitochondriale suite à une activation des donneurs d'électrons. Ceci induit en retour une forte production d' $O_2^{\bullet-}$  par la cellule endothéliale. Ainsi, une augmentation des dommages de l'ADN (Brownlee, 2005).

### 2.5.2. Stress oxydatif, diabète et grossesse

La grossesse est un état physiologique qui s'accompagne d'une forte demande énergétique et d'une exigence accrue en oxygène à l'origine d'un stress oxydatif. Au cours de la gestation, l'insulinorésistance est un phénomène physiologique qui, lorsqu'elle n'est pas « maîtrisée », peut devenir pathologique, on parle alors de diabète gestationnel (DG) (Zhuang et al., 2014).

L'insulinorésistance est un état qui se caractérise par une réponse biologique diminuée des tissus périphériques à la sécrétion d'insuline. La sensibilité à l'insuline peut être réduite dans de multiples conditions physiologiques dont la grossesse, ou, en présence de pathologies comme le diabète (Lianget al., 2016). Un lien très étroit existe entre stress oxydant, diabète et DG, résultant d'une hyperproduction radicalaire associée à l'hyperglycémie et à une diminution des défenses antioxydantes (Zhuang et al., 2014).

Une augmentation de la concentration en insuline, en acide gras libres et/ou en glucides augmente la production des ERO, induit un stress oxydant, et active les voies métaboliques génératrices d'ERO, ce qui en retour aggrave à la fois l'action et la sécrétion d'insuline, et, de ce fait, accélère l'installation du diabète. Enfin, l'attaque radicalaire modifie la transcription des transporteurs du glucose, et le taux de GLUT-1 est augmenté alors que le GLUT-4 est réduit. L'activation de la PKC par des ERO pourrait aussi être impliquée dans l'insulinorésistance. L'activation de la PKC entraîne une phosphorylation des résidus sérine/thréorine des IRS, qui conduit à l'inactivation des récepteurs hormonaux inhibant ainsi la transmission du signal insulinique et la capture cellulaire du glucose qui en découle. Au niveau des myotubes L6, une inhibition du transport du glucose est observée après exposition des cellules à un stress oxydant (Justin et al., 2011).

Au cours de cette dernière décennie, une controverse est née sur les risques associés à des apports élevés en fer, en raison de son rôle pro-oxydant et du risque de diabète associé à une ferritinémie élevée. Une relation qui est également décrite dans l'augmentation du risque de DG (Zhuang et al., 2014).

### 3. Défense immunitaire et stress oxydatif

L'inflammation est une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées soumises à un phénomène appelé explosion oxydative (Hozawa et al., 2007). Elle consiste en l'activation du complexe de la NADPH oxydase capable d'utiliser de l'oxygène pour produire de grandes quantités d'anion superoxyde dans la membrane cellulaire. D'autres cellules comme les lymphocytes B possèdent sur leur membrane des systèmes NADPH oxydase similaires produisant des radicaux en quantité plus faible comme médiateurs intercellulaires. De plus, les cellules inflammatoires et immunes peuvent produire des cytokines comme le TNF $\alpha$  qui est capable de faire produire des radicaux par la mitochondrie des cellules cibles (Uchino et al., 2015).

Le burst oxydatif existe dans les leucocytes lorsque des entités oxydantes participent à la défense de l'organisme. Dans les mécanismes de défense dirigés contre les microorganismes, trois systèmes enzymatiques ont été décrits:

- \* Le système NAD(P)H-Oxydase permettant aux cellules polynucléaires neutrophiles et éosinophiles de produire des espèces réactives telles que O $2^{\bullet-}$ , H $2O_2$ , OH $\bullet$  et O $2$ .
- \* La voie de la NO synthase qui est inductible par les cytokines pro inflammatoires et certaines hormones vasoactives. Cette voie peut aboutir à la production de dérivés oxydés de l'azote comme le NO $\bullet$  qui est toxique pour les microorganismes. Les réactions inflammatoires, qu'elles soient aiguës ou chroniques, entraînent une forte production de NO $\bullet$  et de NO $2^-$ .
- \* Le système peroxydase avec la myéloperoxydase (MPO) des polynucléaires neutrophiles et la peroxydase spécifique des polynucléaires éosinophiles.

Ainsi, lors des réactions inflammatoires, il y a production des espèces précédemment décrites, à savoir des EROs et des ERNs (Poljsak, 2011 ; Nerpin et al., 2012 ; Rawdinet al., 2013).

#### 3.1.Rôles de la myéloperoxydase

La myéloperoxydase MPO est une enzyme hémique présente dans les cellules immunitaires possédant deux activités enzymatiques, à savoir une activité de

peroxydase et une activité de chloration. Ces deux activités participent notamment à la lutte contre les agents infectieux. Il se peut qu'il existe une relation entre les phénomènes d'inflammation chronique et la production de NO• par les PNN activés. En effet, l'activité de peroxydase de la MPO entraîne l'oxydation de l'ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en NO<sub>2</sub>• en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 14).

### **3.2. Défense immunitaire et diabète gestationnel**

Plusieurs études notent des altérations des cytokines inflammatoires lors du diabète gestationnel (King, 2008).

Les cellules T peuvent être classées sur la base de la production des cytokines en deux principales populations, Th1 et Th2. Les cellules Th1 sont responsables de l'immunité à médiation cellulaire et par conséquent favorisent l'inflammation, alors que les cellules Th2 diminuent les actions inflammatoires des cellules Th1 (Figuroa-Vega et al., 2015).

Les cellules Th1 sécrètent IL-2, INF- $\gamma$  et TNF- $\beta$  tandis que les cellules Th2 sécrètent IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13. Les cytokines Th1, principalement INF- $\gamma$ , jouent un rôle pathogénique tandis que les cytokines Th2, principalement IL-4 et IL-10, protègent du diabète (Muller et al., 2002 ; Bao et al., 2015). Une corrélation positive a été trouvée entre la résistance à l'insuline et les taux d'IL-6 circulants (Cieślak et al., 2015).

## **4. Acides gras et diabète gestationnel**

### **4.1. Les différents types et fonction des acides gras**

Les acides gras sont des lipides classés en deux catégories: les acides gras saturés et insaturés, en fonction de leur structure biochimique, c'est-à-dire de la présence ou non de doubles liaisons. Les acides gras « essentiels » sont polyinsaturés. Ils sont dits essentiels, car les précurseurs que sont l'acide alpha-linolénique (ALA) et l'acide linoléique (LA) ne peuvent être synthétisés par notre organisme. Leur apport par l'alimentation est donc indispensable.

Les acides gras sont une source d'énergie, mais les acides gras essentiels présentent des fonctions métaboliques diverses. Ils régulent de multiples voies métaboliques en modulant certains processus de signalisation intracellulaire, ainsi que l'expression de gènes cible via l'activation spécifique de facteurs de transcription. L'EPA et ses métabolites par exemple ont des effets directs sur l'inflammation et la réponse immunitaire (Fritsche, 2015).

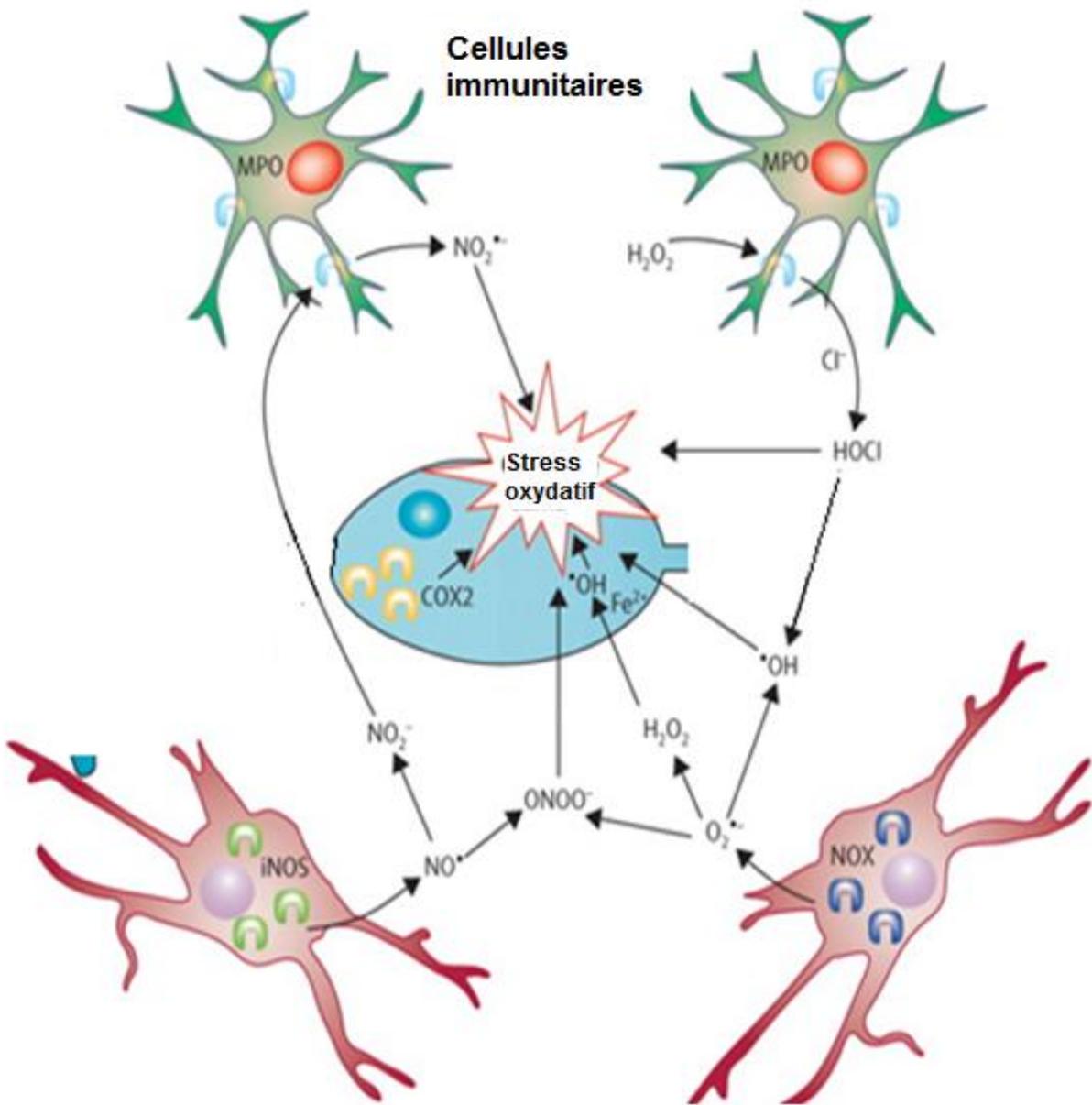


Figure 14 : Stress oxydant et défense immunitaire (Hirsch, 2009)

#### **4.2.Acides gras chez le fœtus**

Le statut en acides gras essentiels fœtal, au cours de la grossesse, est lié à l'âge gestationnel. La réserve globale en DHA du fœtus est d'environ dix grammes et son accumulation se fait principalement lors des dix dernières semaines de grossesse. La disponibilité fœtale en acides gras polyinsaturés essentiels et en leurs dérivés à longues chaînes est dépendante de l'apport alimentaire maternel, mais aussi du placenta et de nombreuses adaptations physiologiques et biochimiques pendant la grossesse. Le placenta extrait de manière sélective l'AA et le DHA de la circulation maternelle à l'aide de protéines de transport spécifiques avec une possibilité faible de conversion des acides gras essentiels en AA et DHA. Il faut souligner que les enfants prématurés ne bénéficient pas de ce stock de DHA observé chez les enfants à terme. L'absence de réserve constituée au troisième trimestre s'ajoute à une immaturité hépatique responsable d'une activité limitée de la désaturase jusqu'à la période du sevrage (Odent, 2014 ; Mennitti et al., 2015).

#### **4.3.Effets bénéfiques des acides gras polyinsaturés**

Par leur effet bénéfique sur le métabolisme, les acides gras essentiels pourraient présenter un intérêt chez les femmes ayant un diabète gestationnel. Comme cela a été décrit chez le rat, des apports en DHA et EPA pourraient réduire la macrosomie et les dyslipidémies induites par le DG. En effet, il a été montré que les apports maternels conditionnent le métabolisme lipidique fœtal et postnatal. Les acides gras polyinsaturés en (AGPI n-6), en particulier l'acide arachidonique, via la production de prostaglandines et de leucotriènes induisent des effets pro-inflammatoires. D'autre part, il a été montré que les AGPI n-3 étaient des agents anti-inflammatoires et immunosuppresseurs. Merzouk et Khan (2003) puis Yessoufou et al (2006) ont démontré qu'un régime riche en AGPI n-3 (acide eicosapentaénoïque et docosahexaénoïque), donné à des bébés obèses nés de ratte diabétiques, exerce des effets métaboliques bénéfiques. Ce régime a significativement diminué l'incidence de la macrosomie, a corrigé les anomalies du métabolisme lipidique et a restauré le statut antioxydant altéré chez ces animaux. De plus, ce régime a augmenté la différenciation des cellules Th0 en un phénotype Th2 (effet protecteur) chez ces rats obèses (Soulaïmann-Mokhtari et al., 2005 ; Khan et al., 2006 ; Yessoufou et al., 2006 ; Jones et al., 2014 ; Zhao et al., 2014).

Globalement, les AGPI n-3 diminuent l'intensité de la réponse inflammatoire et modulent le système immunitaire (Rees et al., 2006). Ces propriétés sont à l'origine de leur qualification d'immuno-nutriments, ayant un intérêt en thérapeutique chez l'Homme (Hasselmann et Reimund, 2004).

L'addition d'AGPI au milieu de culture des cellules immunitaires ou la supplémentation des régimes alimentaires par des AGPI altèrent divers paramètres de la réponse immunitaire, notamment la réponse proliférative des lymphocytes aux mitogènes (Verlengia et al., 2004), la production des cytokines, l'activité des cellules NK et l'expression des molécules de surface sur les lymphocytes T (González et al., 2013).

#### **4.4. Composition en acides gras de *Nigella sativa*, *Linum usitatissimum* et *Olea europea***

##### **4.4.1. *Nigella sativa* (Cumin noir)**

L'espèce *Nigella sativa* a été nommé d'après les graines noires caractéristiques retrouvées dans la plupart des espèces de *Nigella*. Le terme Latin « *nigellus* » est le diminutif de « *niger* », qui signifie noir (Bonnier, 1990).

Les grecs nommaient *Nigella sativa* «melanthion », de « melas » qui veut dire noir et « anthos » fleur, donc l'étymologie tire du même attribut (Aljabre et al., 2005).

Selon la classification moléculaire et cladistique, la systématique phylogénétique APG III version 2009, basée sur deux gènes chloroplastiques et un gène nucléaire du ribosome, l'espèce *Nigella sativa* appartient aux Angiospermes, Dicotylédones vraies ou Eudicotylédones, à l'ordre des Ranunculales, à la famille des Ranunculaceae et à la sous-famille des Ranunculoideae (Figure 15) (The angiosperm phylogeny group, 2009).

L'huile des graines de nigelle a de nombreuses propriétés pharmacologiques et peut être considérée comme agent antioxydant, anti-inflammatoire, immunomodulateur, anti tumoral, antidiabétique et elle joue un rôle non négligeable dans les systèmes cardio-vasculaire et gastro-intestinal (Ghedira, 2006). Sa composition en acides gras est donnée dans le Tableau 2.

##### **4.4.2. *Linum Usitatissimum* (Lin cultivé)**

Le lin (*L. usitatissimum*) est une plante herbacée annuelle dressée, dont les ramifications s'élèvent en forme de corymbe au-dessus de la tige. On cultive deux types de *L. usitatissimum* : le lin oléagineux, dont la graine produit une huile, est une



|                |                            |                       |                      |
|----------------|----------------------------|-----------------------|----------------------|
| Classification | <i>Linum usitatissimum</i> | <i>Nigella sativa</i> | <i>Olea europaea</i> |
| Règne          | <u>Plantae</u>             | <u>Plantae</u>        | <u>Plantae</u>       |
| Classe         | <u>Magnoliopsida</u>       | eudicotylédones       | <u>Equisetopsida</u> |
| Sous-classe    | <u>Rosidae</u>             | audicotarcaïque       | <u>Magnoliidae</u>   |
| Ordre          | <u>Linales</u>             | <u>Ranunculales</u>   | <u>Lamiales</u>      |
| Famille        | <u>Linaceae</u>            | <u>Ranunculaceae</u>  | <u>Oleaceae</u>      |
| Genre          | <u>Linum</u>               | <u>Nigella</u>        | <u>Olea</u>          |

Figure 15 : Description et taxonomie des trois espèces: *Nigella sativa* ; *Linum usitatissimum* et *Olea europaea* (Bonnier, 1990)

**Tableau 2 : Composition en acides gras et en vitamine E de l'huile de Nigelle, de lin et d'olive**

|                   |                                | <b>Huile de lin</b><br>(Morin, 2015) | <b>Huile de Nigelle</b><br>(Nickavar et al., 2003) | <b>Huile d'olive</b><br>(Lange et Speight, 2005) |
|-------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--|--|
|                   |                                | <b>Teneur pour (en g pour 100 g)</b> | <b>Teneur (en g pour 100 g)</b>                    | <b>Teneur (en g pour 100 g)</b>                  |
| Acide gras saturé | acide laurique<br>C12:0        | 0,01                                 | 0.6  | 0,001  |
|                   | Acide myristique<br>C14:0      | 0,041                                | 0,90   | >0 ,01   |
|                   | Acide palmitique<br>C16:0      | 6,047                                | 11,9   | 11,29  |
|                   | Acide heptadécanoïque<br>C17:0 | 0,046                                | 0,01   | 0,022  |
|                   | Acide stéarique<br>C18:0       | 3,428                                | 2,22   | 1,953  |
|                   | Acide arachidique<br>C20:0     | 0,146                                | 0,14   | 0,414  |
|                   | Acide béhénique<br>C22:0       | 0,068                                | 0,02   | 0,129  |
|                   | Acide lignocérique             | 0,078                                | 1,08   | >0,01  |

ETAT ACTUEL SUR LE SUJET

|                                 |                                     |         |          |          |
|---------------------------------|-------------------------------------|---------|----------|----------|
|                                 | C24:0                               |         |          |          |
| Acide gras mono-insaturé<br>ω-9 | Acide palmitoléique<br>C16:1        | 0,01    | 0,1      | 1,255    |
|                                 | Acide heptadécénoïque<br>C17:1      | >0,01   | -        | 0,125    |
|                                 | Acide oléique<br>C18:1              | 18,115  | 23,58    | 71,269   |
| Acide gras poly-insaturé<br>ω-6 | Acide linoléique<br>C18:2 ω6        | 15,553  | 59,34    | 9,762    |
| Acide gras poly-insaturé<br>ω-3 | Acide alpha-linolénique<br>C18:3 ω3 | 56,018  | 0,30     | 0,76     |
| Vitamine E                      |                                     | 17,5 mg | 0,016 mg | 15,29 mg |

plante relativement courte à ramifications secondaires nombreuses, tandis que le lin textile, dont la tige produit des fibres, est plus élevée et moins ramifiée (Figure 15) (Bergfjord, 2010).

L'huile de lin est une huile végétale extraite des graines de lin oléagineux. Elle est l'une des plus anciennes huiles commerciales, et le solvant d'huile de lin traité a été utilisé pendant des siècles comme une huile de séchage de la peinture et de vernissage. L'huile brute est utilisée comme astringent en lotion fongicide, insecticide et a montré des propriétés insectifuges modérées (Kaithwas et Majumdar, 2010 ; Abdel-Moneim et al., 2011), dans une étude portée sur des rats albinos mâles. Ces auteurs ont évalué l'effet de l'huile de lin sur le stress oxydatif induit par l'acétate de plomb ainsi que sa toxicité au niveau du foie, et ont montré que l'huile de lin réduit de manière significative les lésions hépatiques et l'inflammation et, évidemment, agit comme un agent hépatoprotecteur. Plusieurs modèles animaux ont été utilisés dans l'investigation des maladies chroniques qui menacent la santé publique dans plusieurs pays tel que l'obésité, le diabète, l'hypertension...etc. (Carroll et al., 2004 ; Ruth et al., 2008).

Des travaux récents ont montré que l'huile de lin corrige les anomalies lipidiques et la balance oxydante / antioxydante chez le rat obèse et au cours du syndrome métabolique (Ayad et al., 2013 ; Laissouf et al., 2013 ; Benaissa et al., 2015).

La composition en acides gras et en vitamines de l'huile de lin est donnée dans le Tableau 2 cité précédemment.

#### **4.4.3. *Olea europea* (Olivier cultivé)**

L'olivier est un arbre sempervirent (toujours vert). Il peut vivre plusieurs siècles. Il est avant tout méditerranéen et résiste à la sécheresse et au froid (jusqu'à moins 15 degrés). Ses feuilles sont lancéolées et persistantes. Elles sont vert grisâtre, coriaces à bords révoluté. Ses fleurs s'épanouissent en petites grappes blanches. Chaque grappe donnera un seul fruit. Son fruit ovoïde, une drupe, l'olive, est vert puis noir à maturité complète. L'espèce *olea europea* appartient au genre *Olea*, qui est constitué de 30 espèces différentes comme le troène, le lilas, le frêne, le forsythia... Cette famille est celle des oléacées, elle possède deux sous espèces: *olea europaea sylvestris* : l'olivier sauvage ou oléastre poussant spontanément dans la garrigue et *olea europaea sativa*, l'olivier cultivé (Rhizopoulou, 2007).

Les propriétés de l'huile d'olive reviennent majoritairement à sa richesse en acide oléique et en composés phénoliques (Tableau 2). Des études sur le cancer du côlon ont montré que des extraits phénoliques d'huile d'olive semblaient réduire la capacité d'adhésion des cellules cancéreuses, ce qui ralentirait la prolifération du cancer du côlon du sein ainsi qu'une forte activité antioxydante (Hashim et al., 2008 ; Menendez et al., 2009 ; Garcia-Villalba et al., 2010 ; Sales-Campos et al., 2013 ; Kalaiselvan et al., 2015 ; Venturini et al., 2015).

# **MATÉRIEL ET MÉTHODES**



## 1. Population étudiée

Notre étude porte sur des femmes enceintes venant accoucher au service de gynécologie obstétrique de l'Établissement Hospitalier Spécialisé Mère-Enfant du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen.

Quatre populations sont choisies et incluses dans ce travail :

- Femmes témoins en bonne santé, non obèses, ne présentant aucune pathologie (n= 80).
- Les nouveau-nés en bonne santé de mères témoins ne présentant aucune pathologie (n=80).
- Femmes diabétiques (n=40) atteintes de diabète gestationnel diagnostiqué entre la 24<sup>ème</sup> et la 28<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée.
- Les nouveau-nés de mères diabétiques (n=40).

Les critères d'inclusion sont:

- ✓ Les cas pathologiques recrutés et interrogés doivent être de la même région.
- ✓ Les grossesses sont à terme ( $\geq 38$  semaines).

Les femmes témoins sont sélectionnées en même temps que les cas. Les critères d'inclusion pour les témoins sont:

- ✓ Les femmes recrutées et interrogées doivent être de la même région.
- ✓ être indemnes de toute pathologie.
- ✓ Elles présentent des grossesses à terme ( $\geq 38$  semaines).
- ✓ Les témoins sont de la même tranche d'âge que les diabétiques et elles ont un IMC  $\leq 25$  kg /m<sup>2</sup>.

Les caractéristiques de la population étudiée sont données dans le Tableau 3.

### 1.1. Questionnaire individuel

Les informations sont recueillies en s'appuyant sur un questionnaire de base complété par les femmes sélectionnées. Le questionnaire a été développé, évalué et testé par des études antérieures. Il a été administré de manière standardisée aux femmes. Les informations recueillies par le questionnaire de base comprenaient:

- Age ; Taille ; Poids.
- Indice de Masse Corporelle (IMC : poids/ taille<sup>2</sup>, kg/m<sup>2</sup>).
- Tension artérielle ; Voie d'accouchement.
- Age gestationnel ; Nombre de parité ; Nombre de gestation.
- Ancienneté du diabète (pour les femmes diabétiques).

- Antécédents familiaux.
- Prise de contraceptifs oraux.
- Sexe et poids de naissance de leurs nouveau-nés.

## **1.2. Considérations éthiques**

Toutes les femmes sélectionnées sont informées sur le but de l'étude et leurs consentements sont obtenus préalablement (Formulaire en Annexe).

Toutes les précautions visant le respect de l'anonymat et la confidentialité des informations sont rigoureusement respectées.

## **2. Analyses biochimiques**

### **2.1. Prélèvements sanguins et Préparation des échantillons**

Les prélèvements sanguins se font le matin à jeun, au niveau de la veine du pli du coude chez les femmes enceintes, au moment de l'accouchement. Après délivrance et coupure du cordon ombilical, le sang fœtal est prélevé sur la veine ombilicale.

Le sang prélevé est recueilli à raison de 10 ml dans des tubes à EDTA, préalablement étiquetés et numérotés pour chaque patiente. Les échantillons collectés sont centrifugés à 3000 tours/min pendant 15 min, à température ambiante pour séparer le plasma du culot cellulaire.

Le plasma sert à la détermination des paramètres biochimiques et des marqueurs du stress oxydatif plasmatiques. Le culot restant est lavé avec l'eau physiologique. Les érythrocytes sont lysées par addition d'eau distillée glacée. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 4000 tours / min pendant 10 minutes. Le lysat érythrocytaire est ensuite récupéré afin de doser les paramètres du statut oxydant / antioxydant intracellulaire.

Les dosages du glucose et de la vitamine C se font le jour même du prélèvement. Les échantillons ont été stockés au congélateur pendant un temps très court, ne dépassant pas un mois, afin d'éviter la dégradation des protéines et des lipides.

### **2.2. Détermination des teneurs plasmatiques en glucose (Kit Sigma Compagny, St Louis, MO, USA)**

Le glucose plasmatique est déterminé par la méthode enzymatique et colorimétrique en présence du glucose oxydase (GOD). Le glucose est oxydé en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier en présence de peroxydase et de phénol, oxyde un chromogène (le 4-amino-antipyrine) incolore en couleur rouge à structure quinonéimine. La coloration obtenue

est proportionnelle à la concentration en glucose présente dans l'échantillon. La lecture se fait à une longueur d'onde de 505 nm.

### **2.3. Détermination des teneurs plasmatiques en urée (Kit Prochima)**

L'urée plasmatique est dosée par une méthode colorimétrique basée sur l'utilisation du diacétyl monooxine et des ions  $\text{Fe}^{3+}$ . En présence d'ions  $\text{Fe}^{3+}$  et d'un réducteur, l'urée réagit avec le diacétyl monooxine pour donner un complexe coloré en rose. La coloration obtenue est proportionnelle à la quantité d'urée présente dans l'échantillon. La lecture se fait à une longueur d'onde de 525 nm.

### **2.4. Détermination des teneurs plasmatiques en créatinine (Kit Prochima)**

La créatinine plasmatique est dosée par une méthode colorimétrique basée sur la réaction de l'acide picrique avec la créatinine en milieu basique formant un complexe coloré en jaune orange. L'intensité de la coloration est mesurée à une longueur d'onde de 530 nm.

### **2.5. Séparation des lipoprotéines plasmatiques**

Les lipoprotéines totales sont isolées à partir du plasma par précipitation selon la méthode de Burstein et al. (1970, 1989). A pH neutre, les poly-anions, en présence de cations divalents, peuvent former des complexes insolubles avec les lipoprotéines (lipopoly-anions-cations).

Généralement, les poly-anions utilisés sont les sulfates ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), les polysaccharides (héparine) et l'acide phosphotungstique, alors que les cations sont les  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ . L'utilisation du même réactif de précipitation à différentes concentrations permet de précipiter sélectivement les fractions de lipoprotéines ; et ainsi à concentration de plus en plus élevée, ce réactif permet la séparation à partir du plasma, d'abord des VLDL, ensuite des LDL et en dernier des HDL. Ce principe est analogue à celui de l'ultracentrifugation en gradient de densité des lipoprotéines. En effet, lorsque la concentration du réactif varie, la densité du milieu varie aussi et permet une précipitation sélective. Les lipoprotéines précipitées par l'acide phosphotungstique et le  $\text{MgCl}_2$  à différentes concentrations, sont par la suite solubilisées grâce à une solution de solubilisation contenant du tampon citrate trisodique et  $\text{NaCl}$ .

**Tableau 3 : Caractéristiques de la population étudiée**

| <b>Paramètres</b>                  | <b>Témoins</b> | <b>Diabétiques</b> |
|------------------------------------|----------------|--------------------|
| <b>Nombre</b>                      | 80             | 40                 |
| <b>Age (années)</b>                | 27,35± 4,93    | 28,25± 3,01        |
| <b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>      | 22,80 ± 2,32   | 21,14 ± 1,70       |
| <b>Parité</b>                      | 3 ± 1          | 2 ± 1              |
| <b>Age Gestationnel (semaines)</b> | 38,40 ± 0,50   | 38,50 ± 0,40       |
| <b>Poids de naissance (g)</b>      | 3445 ± 390     | 3980 ± 350         |
| <b>Score Apgar</b>                 | 9,20 ± 0,30    | 8,70 ± 0,50        |
| <b>Rapport M/F</b>                 | 40 / 40        | 23/ 17             |

Chaque valeur représente la moyenne ± écart type ou le nombre.

## **2.6. Détermination des teneurs en cholestérol (Kit Sigma Compagny, St Louis, MO, USA)**

Le cholestérol du plasma et des lipoprotéines est dosé par une méthode colorimétrique enzymatique. Les esters de cholestérol sont hydrolysés par la cholestérol ester hydrolase en cholestérol libre et acides gras. Le cholestérol libre produit et celui préexistant est oxydé par une enzyme cholestérol oxydase en  $\Delta^4$  cholesterone et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier en présence de peroxydase, oxyde le chromogène en un composé coloré en rouge. La concentration en quinoneimine colorée mesurée à 510 nm est directement proportionnelle à la quantité de cholestérol contenu dans l'échantillon.

## **2.7. Détermination des teneurs en triglycérides (Kit Sigma Compagny, St Louis, MO, USA)**

Les triglycérides sont dosés par une méthode colorimétrique enzymatique au niveau du plasma et des lipoprotéines. Les triglycérides sont hydrolysés par une lipase en glycérol et en acides gras. Après phosphorylation et oxydation du glycérol, la réaction aboutit au peroxyde d'hydrogène. L'indicateur est la quinoneimine formée à partir de peroxyde d'hydrogène, le 4-amino-antipyrine et du 4-chlorophenol sous l'action catalytique de la peroxydase. La concentration en triglycérides est déterminée à une longueur d'onde de 505 nm.

## **2.8. Détermination des protéines totales (Kit Quimica Clinica Aplicada S.A, Espagne)**

Les protéines totales plasmatiques sont dosées par la méthode colorimétrique de Biuret. En milieu alcalin, les protéines se combinent aux sels de cuivre pour former un complexe bleu violet.

L'absorption du complexe est mesurée à 540 nm. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration en protéines dans l'échantillon testé.

## **2.9. Hémogramme**

Les hémogrammes sont déterminés sur un automate de type compteur électronique de particules (hematology auto-analyzer Sysmex KX-21N). Les paramètres étudiés sont les paramètres érythrocytaires: numération érythrocytaire, hémoglobine, hématocrite, volume globulaire moyen (VGM), concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH), teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TGMH); numération plaquettaire et les paramètres leucocytaires: numération leucocytaire, formule sanguine (polynucléaires ; lymphocytes; monocytes). Pour les formules sanguines, un frottis sanguin coloré au

May-Grünwald Giemsa est aussi préparé et est observé au microscope et la formule recomptée manuellement.

Le dosage de l'hémoglobine glyquée Hb A1c est réalisé par la chromatographie d'échanges d'ions (Kit Fortress Diagnostics, UK). Le principe est fondé sur le fait que la charge nette de l'hémoglobine glyquée sur l'extrémité N-terminale des chaînes  $\beta$  est plus négative que celle de l'HbA totale, à pH neutre. L'hémolyse des globules rouges est réalisée à PH acide, puis l'hémolysat est déposé sur une mini-colonne remplie de résines chargées négativement. L'utilisation de tampons différents permet de séparer un premier éluat contenant Hb A1a+b, puis un deuxième éluat contenant Hb A1c et un dernier contenant Hb A0. Le pourcentage de ces différentes fractions est déterminé par mesure spectrophotométrique à une longueur d'onde de 415 nm.

## **2.10. Détermination du statut oxydant / antioxydant**

### **2.10.1. Dosage du Malondialdéhyde (Draper et Hadley, 1990)**

Le malondialdéhyde (MDA) érythrocytaire représente le marqueur le plus utilisé en peroxydation lipidique, notamment par la simplicité et la sensibilité de la méthode de dosage. Après traitement par l'acide à chaud, les aldéhydes réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un produit de condensation chromogénique consistant en 2 molécules de TBA et une molécule de MDA. L'absorption intense de ce chromogène se fait à une longueur d'onde de 532 nm.

La concentration du MDA est calculée en utilisant le coefficient d'extinction du complexe MDA-TBA ( $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$  à 532 nm).

### **2.10.2. Dosage des protéines carbonylées (Levine et al., 1990)**

Les protéines carbonylées érythrocytaires, marqueurs de l'oxydation protéique, sont mesurées par la réaction au 2-4 dinitrophénylhydrazine (DNPH) qui aboutit à la formation de la dinitrophénylhydrazone colorée.

Les concentrations érythrocytaires en protéines carbonylées (PC) sont déterminées par lecture à des longueurs d'onde de 350 et 375 nm. Les concentrations en PC, analysées sur le lysat sont calculées en utilisant le coefficient d'extinction des PC ( $\epsilon = 21,5 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

### **2.10.3. Dosage de la vitamine C (Jacota et Dani, 1982)**

La vitamine C plasmatique est dosée en utilisant le réactif de Folin et une gamme étalon d'acide ascorbique. Après précipitation des protéines plasmatiques par l'acide trichloroacétique (TCA) et centrifugation, le surnageant est incubé en présence du réactif de coloration folin ciocalteau dilué. La vitamine C présente dans le plasma réduit le réactif de folin donnant une coloration jaune. L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la concentration en vitamine C à une longueur d'onde de 769 nm présente dans l'échantillon. La concentration est déterminée à partir de la courbe étalon obtenu grâce à une solution d'acide ascorbique.

### **2.10.4. Dosage du Glutathion réduit (GSH) (Ellman, 1959)**

Le dosage du glutathion réduit (GSH) érythrocytaire est réalisé par la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman (DTNB). La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5 dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB).

L'acide thionitrobenzoïque (TNB) à pH (8-9) alcalin présente une absorbance à 412 nm avec un coefficient d'extinction égal à  $13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### **2.10.5. Détermination de l'activité enzymatique antioxydante de la catalase (CAT ; EC 1.11.1.6) (Aebi, 1974)**

Cette activité enzymatique est mesurée dans le lysat érythrocytaire par analyse spectrophotométrique du taux de la décomposition du peroxyde d'hydrogène. En présence de la catalase, la décomposition du peroxyde d'hydrogène conduit à une diminution de l'absorption de la solution de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en fonction du temps.

Après incubation, les concentrations du  $\text{H}_2\text{O}_2$  (substrat de l'enzyme) restant sont déterminées à partir d'une gamme étalon de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La lecture se fait à 420 nm. L'activité de la catalase est exprimée en Unité/ ml ou en Unité/mg de protéine.

### **2.10.6. Dosage du monoxyde d'azote érythrocytaire (Guevara et al., 1998)**

La formation du monoxyde d'azote (NO) est évaluée de manière indirecte par la détermination des concentrations de nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) et de nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), qui constituent les produits de dégradation oxydative du NO. En effet, le NO réagit rapidement avec des molécules telles que l'oxygène ou l'anion superoxyde pour donner des nitrites et des nitrates.

La technique utilisée pour doser les nitrites (et les nitrates après réduction) est la réaction de Griess qui représente une réaction de diazotation en deux étapes: les nitrites forment un sel de diazonium avec l'acide sulfanilique qui est ensuite couplé avec une amine (N-naphtyléthylène diamine) pour donner un colorant azoïque qui absorbe à 540 nm. L'échantillon déprotéinisé est incubé à 37 °C avec l'acide sulfanilique dissous dans HCl puis avec la N-naphtyléthylène diamine. La déprotéinisation est réalisée par le sulfate de zinc. La réaction de Griess permet uniquement la mesure des nitrites. Les nitrates devront donc être préalablement réduits en nitrites pour être quantifiés. La transformation des nitrates en nitrites est basée sur une réaction de réduction par le cadmium sous forme de granules, régénérés à l'aide d'une solution de  $\text{CuSO}_4$  dans un tampon glycine-NaOH (pH 9,7). La concentration ainsi mesurée représente la somme des nitrites et des nitrates. Les concentrations en NO sont calculées en utilisant le coefficient d'extinction molaire:  $\epsilon = 38 \cdot 10^3 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### **2.10.7. Dosage de l'anion superoxyde érythrocytaire (Auclair et al., 1985)**

La méthode est basée sur la réduction du nitro blue tetrazolium (NBT) en monoformazon en présence des radicaux superoxydes. La couleur jaune obtenue est mesurée à 550 nm.

#### **2.10.8. Détermination du pouvoir antioxydant total du plasma (ORAC) (Blache et Prost, 1992)**

Le pouvoir antioxydant total du plasma, c'est à dire sa capacité à absorber les radicaux oxygènes libres (ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity) est estimé par la capacité des hématies à résister à l'hémolyse induite par les radicaux libres in vitro en présence du plasma. Cette méthode est basée sur le suivi en fonction du temps de l'hémolyse des globules rouges induite par un générateur de radicaux libres.

Il s'agit de soumettre une suspension d'hématies à une agression radicalaire dans des conditions strictement contrôlées et standardisées. Tous les systèmes enzymatiques et chimiques de l'échantillon se mobilisent pour protéger l'intégrité des cellules jusqu'à leur lyse. Ainsi l'hémolyse se fait graduellement en fonction du temps. La mesure, toutes les dix minutes, de l'augmentation de l'absorbance à 450 nm permet de suivre la cinétique de l'hémolyse.

L'addition d'une quantité déterminée d'un antioxydant, vitamine E (Trolox) ou vitamine C (acide ascorbique) permet de neutraliser une quantité de radicaux libres dans le milieu d'incubation et permet donc la protection des globules rouges contre l'attaque des radicaux

libres et l'hémolyse. La courbe de cinétique de lyse des globules rouges est donc déviée et un décalage de la courbe est observé en fonction du temps.

Le plasma contient plusieurs systèmes de défenses antioxydantes et permet ainsi la protection des globules rouges contre l'attaque radicalaire. En présence du plasma, un décalage de la courbe de la cinétique d'hémolyse des globules rouges est aussi observé. Le pouvoir antioxydant total du plasma représente donc la capacité du plasma à neutraliser les radicaux libres générés *in vitro* et donc à freiner l'hémolyse des globules rouges attaquées, donc indirectement, ralentir l'augmentation de la densité optique à 450 nm.

Afin de permettre une quantification de ce pouvoir antioxydant total, l'utilisation des antioxydants purifiés (Trolox, vitamine C) à concentrations connues permet l'étalonnage. L'hémolyse est donc suivie dans un intervalle de temps allant de 2 à 6 heures. Les densités optiques (DO) sont lues toutes les dix minutes à 450 nm.

L'ORAC de chaque échantillon est calculé par la formule suivante :

$$1U \text{ ORAC} = \sum (DO_{\text{Blanc}} - DO_{\text{Etalon}}) / \text{nombre DO.}$$

$$\text{ORAC}_{\text{Echantillon}} = [\sum (DO_{\text{Blanc}} - DO_{\text{Echantillon}}) / \text{nombre DO}] / [\sum (DO_{\text{Blanc}} - DO_{\text{Etalon}}) / \text{nombre DO}] \times 1 U \text{ ORAC.}$$

Blanc = incubation de globules rouges avec le générateur de radicaux libres

Etalon= Trolox (1 $\mu$ M) ou vitamine C (2 $\mu$ M).

### 3. Etude *in vitro*

#### 3.1. Choix des huiles et du modèle d'étude *in vitro*

Pour notre étude, nous avons choisi de tester des huiles riches en acides gras mono insaturés (n-9) ou en acides gras polyinsaturés (n-3) et (n-6) présentes dans notre région: l'huile de nigelle, l'huile d'olive et l'huile de lin. La composition de ces trois huiles est donnée dans le Tableau 4.

Une solution mère de chaque huile à 10 mM TG est préalablement préparée dans de l'éthanol absolu et est gardée à -20°C jusqu'à utilisation. A partir de chaque solution mère, une solution à 300  $\mu$ M TG est utilisée pour les différentes incubations.

Pour étudier les effets de ces 3 huiles (lin, nigelle et olive) *in vitro*, nous avons travaillé sur un modèle de cellules humaines d'origine lymphocytaire extraites du sang total prélevé des femmes enceintes diabétiques ou témoins ainsi que de leurs nouveau-nés. Le suivi *in vitro* de la prolifération des lymphocytes est un test simple largement utilisé pour apprécier la réponse immune.

**Tableau 4 : Composition des huiles utilisées**

|                             | <b>Huile de lin</b> | <b>Huile d'olive</b> | <b>Huile de nigelle</b> |
|-----------------------------|---------------------|----------------------|-------------------------|
| <b>AGS (%)</b>              | 9                   | 15                   | 15                      |
| <b>AGMI (%)</b>             | 18                  | 60                   | 28                      |
| <b>C18:2 n-6 (%)</b>        | 14                  | 22                   | 55                      |
| <b>C18:3 n-3 (%)</b>        | 57                  | 1                    | 1                       |
| <b>C20:4 n-6 (%)</b>        | 2                   | 2                    | 1                       |
| <b>Tocophérol (mg/kg)</b>   | 570                 | 288                  | 361                     |
| <b>Caroténoïdes (mg/Kg)</b> | 8                   | -                    | 100                     |

La composition en acides gras est réalisée par CPG au laboratoire UPRES lipides, Faculté des sciences Gabriel, Université de Bourgogne, Dijon, France. Les teneurs en vitamines sont déterminées par HPLC (Dijon, France).

### 3.2. Isolement des lymphocytes

L'isolement des lymphocytes se fait à partir d'un prélèvement sanguin réalisé au niveau de la veine du pli du coude de la mère au moment de l'accouchement et au niveau du cordon ombilical. Le sang prélevé est recueilli dans des tubes héparinés. Un gradient d'Histopaque (Sigma) est utilisé afin de récolter les lymphocytes après centrifugation. L'histopaque, dont la densité est de 1,075, permet l'agrégation des hématies. La migration différentielle durant la centrifugation résulte en la formation de différentes couches contenant les différents types de cellules sanguines. Ainsi, les globules rouges et les granulocytes sédimentent complètement et se retrouvent dans le culot. Les lymphocytes ayant une densité inférieure à celle d'histopaque (Tableau 5) se trouvent à l'interface entre l'histopaque et le plasma après centrifugation.

Ils sont par contre contaminés par d'autres cellules à sédimentation lente (Monocytes, plaquettes) (Figure 16). Les lymphocytes sont récupérés de l'interface puis sont lavés pour éliminer les contaminants (Histopaque, plasma, plaquettes,...). Le lavage se fait avec une solution saline équilibrée.

Après mélange et centrifugation, le surnageant est éliminé. Le lavage est recommencé deux fois, et les lymphocytes isolés sont prêts à l'emploi.

Les lymphocytes lavés sont par la suite remis en suspension dans 400µl de milieu de culture RPMI 1640.

Afin de tester la viabilité des cellules isolées, 50µl de cette suspension cellulaire sont prélevés dans un tube sec et sont mélangés à 50µl d'une solution de bleu de trypan 0,4 % et 50µl de milieu RPMI 1640. La numération cellulaire est effectuée sur une chambre quadrillée «Cellule de Malassez ». Par la suite, la suspension cellulaire est ajustée à une concentration de  $4.10^6$  cellules/ml.

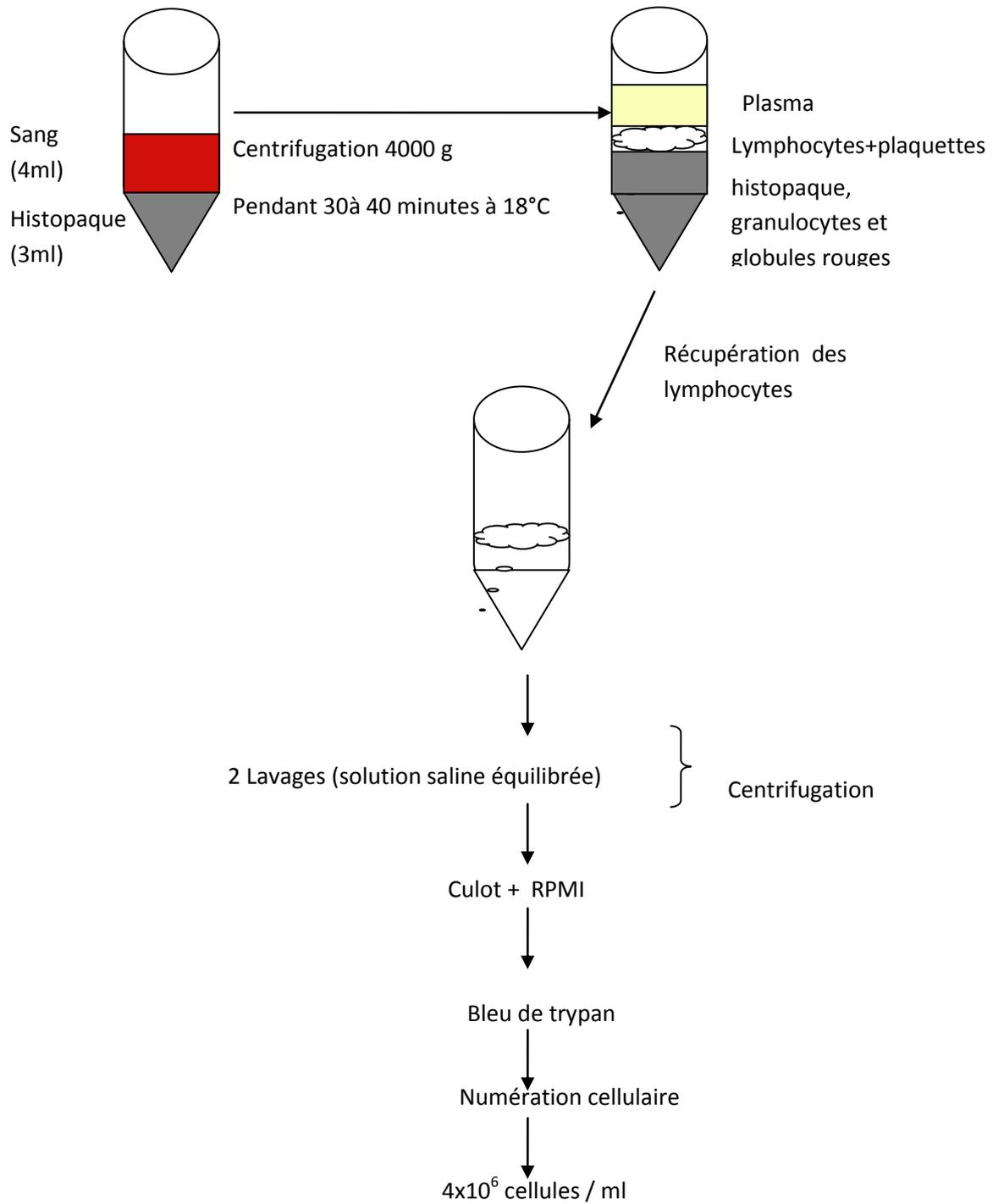
### 3.3. Test de transformation lymphoblastique (TTL)

Le TTL permet d'étudier la prolifération in vitro des lymphocytes T stimulés par des agents mitogènes spécifiques. La Concanavaline A (Con A, Sigma, St. Louis, MO, USA), mitogène spécifique des cellules T est utilisée à une concentration finale de 5 µg/ml. Les cultures sont réalisées sur des plaques ELISA de 96 puits à fond plat (Nunc- Elisa).

Les lymphocytes sont mis en culture ( $4 \times 10^5$  cellules/puit) dans le milieu RPMI 1640 au quel sont ajoutés le tampon HEPES (25 mM), 10% sérum du veau foetal, L - Glutamine (2mM), 2-mercaptoethanol ( $5 \times 10^{-5}$ M), pénicilline (100 UI/ml) et streptomycine (100 µg/ml) en présence ou en absence de la Con A (5 µg/ml).

**Tableau 5 : Taille et densité des cellules sanguines**

|                        | Taille ( $\mu\text{M}$ ) | Densité             | Vitesse de sédimentation |
|------------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------|
| <b>Globules rouges</b> | 7 (6.5-7.5)              | 1.098 (1.098-1.105) | +                        |
| <b>Éosinophiles</b>    | 12 (12-15)               | 1.091 (1.087-1.096) |                          |
| <b>Neutrophiles</b>    | 12 (12-15)               | 1.088 (1.082-1.097) |                          |
| <b>Basophiles</b>      | 9.5 (9-10)               | 1.078 (1.074-1.082) |                          |
| <b>Monocytes</b>       | 15 (15-20)               | 1.071 (1.065-1.075) |                          |
| <b>Lymphocytes</b>     | 9 (8-10)                 | 1.063 (1.057-1.067) |                          |
| <b>Plaquettes</b>      | 2-3                      | 1.040               | -                        |



**Figure 16 : Méthode d'isolement et purification des lymphocytes**

Les essais sont réalisés en triples. Afin de déterminer les effets des huiles sur la prolifération in vitro des lymphocytes, les cellules sont mises en culture en présence des trois huiles (lin, olive, nigelle) à une concentration finale de 30  $\mu$ M TG. Les plaques sont ensuite mises à incuber 48 heures à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

A la fin de l'incubation, les cellules sont prélevées dans une nouvelle plaque Elisa 96 puits. Les puits sont lavés avec le milieu RPMI 1640 afin de récupérer l'ensemble des cellules.

La détermination de la prolifération lymphocytaire se fait par comptage des cellules (cellule de malassez), confirmée par la méthode du MTT [3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium bromide] et le dosage des protéines.

Une prise aliquote des suspensions cellulaires est centrifugée à 6000 tours/min pendant 5 minutes. Le surnageant est récupéré pour le dosage des interleukines IL-2, IL-4, et INF $\gamma$ .

### **3.3.1. Comptage des lymphocytes**

Le comptage des lymphocytes se fait à l'aide de la cellule de Malassez. Le principe est basé sur le décompte au microscope optique des cellules après coloration au bleu de Trypan, contenues dans un volume de suspension cellulaire déterminé et à dilution connue.

### **3.3.2. Détermination de la prolifération lymphocytaire par la méthode du MTT**

La méthode du MTT est une méthode colorimétrique basée sur la capacité des enzymes mitochondriales (succinate déshydrogénase) dans les cellules vivantes de transformer les sels de tétrazolium (couleur jaune) en produits insolubles de formazan (couleur bleue violacée).

La concentration de Formazan obtenue est directement proportionnelle au nombre de cellules présentes dans la suspension cellulaire. Cette technique permet de mesurer la viabilité et la prolifération lymphocytaire, et les résultats sont parallèles à ceux obtenus par la méthode de référence utilisant la thymidine radioactive incorporée dans l'ADN (Mosmann, 1983). La solution de MTT [3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium bromide] (Sigma, USA) est préparée à une concentration de 5 mg/ml dans le tampon phosphate (PBS, PH 7.5), filtrée puis conservée à 4° C à l'abri de la lumière.

A la fin des incubations et après récolte des cellules, une prise aliquote de la suspension cellulaire est de nouveau incubée en présence du MTT (5 mg/ml) à 37° C, 5% CO<sub>2</sub> pendant 3 heures. L'addition du HCL 0,04M dans l'isopropanol permet la dissolution des cristaux bleus Formazan. La lecture des densités optiques se fait au spectrophotomètre à 630 nm. L'indice de stimulation (IS) est calculé :

IS= (densité optique des cellules stimulées/ densité optique des cellules non stimulées) ×100 (Moussa et al., 2000).

NB : Cellules stimulées: cellules prélevées des puits après les incubations en présence de l'agent mitogène.

Cellules non stimulées: cellules provenant de la suspension cellulaire initiale avant incubation, ou cellules incubées sans l'agent mitogène.

### **3.3.3. Dosage des protéines (Lowry et al., 1951)**

Après incubation, récolte des suspensions cellulaires et centrifugation à 6000 tours/min pendant 5 minute, le tampon de lyse (NaOH 0,5 N) est ajouté au culot cellulaire. Après mélange et centrifugation à 6000 tours/min pendant 5 minutes, le surnageant est prélevé pour le dosage des protéines totales.

La méthode de Lowry combine une réaction au biuret et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu. En effet, les protéines réagissent d'abord avec un réactif cuivrique alcalin, puis avec un second réactif de Folin (mélange de tungstate de sodium et du molbydate de sodium). Le Folin réagit spécifiquement avec les acides aminés aromatiques, conduisant à la formation d'un complexe coloré bleu foncé dont l'absorbance est mesuré à 650 nm. Pour la gamme étalon, l'albumine sérique bovine (SBA) est utilisée comme standard (SIGMA chemical company, Saint Louis, MO).

## **3.4. Dosage des Interleukines**

### **3.4.1. Dosage des Interleukines 2 (IL-2)**

Le dosage des interleukines 2 (IL-2) se fait selon le protocole du kit ELISA (RD System, Oxford, UK) pour IL2. Le principe est basé sur l'utilisation de deux anticorps : un anticorps monoclonal anti-IL-2 et un polyclonal conjugué à la biotine. Un revêtement d'anticorps monoclonal anti- IL-2 est administré dans les micropuits de la plaque ELISA. L'IL-2 présente dans l'échantillon ou le standard, se lie aux anticorps adsorbés dans les micropuits. L'anticorps anti- IL2 polyclonal conjugué à la biotine est ajouté et se lie à IL2 capturée par le premier anticorps. L'anti- IL2 conjugué à la biotine non lié est enlevé pendant l'étape de lavage. La streptavidine-HRP est ajoutée et se lie à l'anti- IL2 conjugué à la biotine. Pour l'incubation suivante, la streptavidine-HRP non lié est enlevé durant le lavage, et la solution de substrat réagissant avec le HRP est ajoutée aux puits. Un produit coloré est formé proportionnellement à la quantité des IL2 présents dans l'échantillon. La réaction est terminée

par l'addition d'acide et l'absorbance est mesurée à 450 nm. Une courbe étalon est préparée à partir du standard IL-2 fourni par le Kit de dosage.

### **3.4.2. Dosage des Interleukines 4 (IL-4)**

Le principe du dosage des interleukines 4 (IL-4) repose sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-IL-4 et un polyclonal anti-IL-4 conjugué à la biotine. La technique utilisée est comparable à celle du dosage des IL-2. La gamme étalon est préparée à partir d'un standard IL-4 (R D System, Oxford, UK).

## **3.5. Détermination des marqueurs du stress oxydatif au niveau des lymphocytes**

### **3.5.1. Détermination des taux en Glutathion réduit des lymphocytes**

Les taux en Glutathion réduit (GSH) sont mesurés par une méthode colorimétrique suivant le protocole du Kit BIOXYTECH GSH-400 (OXIS International, Inc., Portland, OR, USA). Les lymphocytes sont suspendus dans l'acide métaphosphorique (5%, P/V). Après centrifugation à 3000g pendant 10 min, le surnageant est mélangé au tampon phosphate de potassium contenant l'acide diethylene triamine, Penta-acétique et le lubrol (pH 7,8). Le chromogène est par la suite ajouté dans le milieu réactionnel. Le mélange est incubé à 25°C pendant 10min à l'abri de la lumière. La lecture se fait à 400 nm. Les concentrations en GSH sont obtenues grâce à une courbe étalon préparé avec le GSH standard.

### **3.5.2. Détermination de l'activité de la Superoxyde dismutase des lymphocytes (SOD; EC 1.15.1.1)**

L'activité de l'enzyme SOD est mesurée selon la méthode d'Elstner et al. (1983) après lyse des lymphocytes. Le principe est basé sur la réaction chimique qui génère l'ion superoxyde ( $O_2^-$ ) à partir de l'oxygène moléculaire en présence d'EDTA, de  $MnCl_2$  et du mercaptoéthanol.

L'oxydation du NADPH est liée à la disponibilité des ions superoxyde dans le milieu. Dès que la SOD est ajoutée dans le milieu réactionnel, elle entraîne l'inhibition de l'oxydation du NADPH. La lecture se fait à 540 nm, après incubation de 20 min. L'activité de la SOD est exprimée en Unité/ml ou Unité/mg de protéine.

### **3.5.3. Détermination de l'activité de la Catalase des lymphocytes (CAT ; EC 1.11.1.6)**

Cette activité enzymatique est mesurée dans le lysat lymphocytaire par analyse spectrophotométrique du taux de la décomposition du peroxyde d'hydrogène (Aebi, 1974).

### 3.5.4. Teneurs en malondialdéhyde (MDA) des lymphocytes

Le MDA est dosé au niveau du lysat lymphocytaire en utilisant l'acide thiobarbiturique selon la méthode de Draper et Hadley (1990).

### 3.5.5. Teneurs en Protéines Carbonylées des lymphocytes

Les protéines carbonylées sont mesurées dans le lysat lymphocytaire par la réaction au 2,4-dinitrophénylhydrazine selon la méthode de Levine et al. (1990).

### 3.6. Détermination de la composition en acides gras des membranes des lymphocytes

Après incubation, récolte des suspensions cellulaires et centrifugation à 6000 tours/min pendant 5 minutes, le tampon de lyse (NaOH 0,5 N) est ajouté au culot cellulaire. Après mélange et centrifugation à 6000 tours/min pendant 5 minutes, le culot, constitué des membranes lymphocytaires, est prélevé pour la composition en acides gras.

L'extraction lipidique se fait à partir du culot membranaire par un mélange méthanol/chloroforme/NaCl (2M) (1/1/0,9 ; v/v/v), selon la méthode de Bligh et Dyer (1959). Une quantité déterminée d'étalon interne (acide heptadécanoïque 17:0, C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>) est ajoutée. Après extraction, les acides gras sont saponifiés avec NaOH méthanolique 0,5N, mélangés au vortex et chauffés à 80°C pendant 15 min. La réaction est arrêtée par un choc thermique en mettant les tubes dans de la glace. Les acides gras sont par la suite méthylés en ajoutant le BF<sub>3</sub> méthanol (Bromotrifluorométhanol à 14%) (Slover et Lanza, 1979). Après mélange au vortex, les tubes sont fermés sous azote, étuvés à 80°C pendant 20 min. La réaction est arrêtée par un choc thermique. Le NaCl saturé (35%) et l'hexane sont ensuite ajoutés aux tubes. Après passage au vortex, deux phases se forment. La phase supérieure est prélevée pour l'injection dans le chromatographe.

L'analyse se fait par la CPG (chromatographie en phase gazeuse ; Becker instruments, downersgrove, IL) ; la colonne capillaire (Applied Sciences Labs, State college, PA) est en pyrex de 50 m de longueur et 0,3 mm de diamètre interne, remplie avec du carbowax 20m (Spiral-RD, Couternon, France). Le chromatographe est équipé d'un injecteur de type ROS et d'un détecteur à ionisation de flamme relié à un intégrateur- calculateur Enica 21 (DELSI instruments, Suresnes, France). L'identification des acides gras est réalisée par comparaison de leur temps de rétention avec ceux des standards d'acides gras (Nucheck-prep, Elysiam, MN, USA). La surface des pics d'acides gras est proportionnelle à leur quantité; elle est calculée à l'aide d'un intégrateur. Les résultats sont donnés sous forme de pourcentage d'acides gras totaux.

#### **4. Analyse statistique**

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart type. L'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel STATISTICA (version 4.1, Statsoft, Paris, France). La comparaison entre deux groupes (diabète versus témoin) est réalisée par le test « t » de Student. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de la différence significative minimale (LSD, least significant difference) afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, ...) sont significativement différentes.

# **RESULTATS ET INTERPRETATION**

## **1. Paramètres biochimiques chez les mères et les nouveau-nés**

### **1.1. Teneurs plasmatiques en glucose et en protéines totales chez les mères et leurs nouveau-nés (Figure 17 ; Tableau A1 en annexes)**

Les teneurs plasmatiques en glucose sont augmentées significativement chez les mères atteintes de diabète gestationnel comparées aux valeurs obtenues chez les mères témoins. Aucune différence significative entre le groupe témoin et diabétique n'est notée concernant les teneurs plasmatiques en protéines totales. Chez les nouveau-nés de mères diabétiques, aucune différence significative n'est observée concernant les teneurs plasmatiques en glucose et en protéines totales par rapport à celles des nouveau-nés de mères témoins.

### **1.2. Teneurs plasmatiques en cholestérol, triglycérides, HDL-cholestérol et LDL-cholestérol chez les mères et leurs nouveau-nés (Figures 18 et 19 ; Tableau A1 en annexes)**

Les teneurs plasmatiques en cholestérol et en triglycérides ne varient pas significativement entre les deux groupes de mères ainsi qu'entre leurs nouveau-nés. Les teneurs en HDL et LDL-cholestérol sont aussi similaires chez les mères diabétiques et témoins, et chez leurs nouveau-nés.

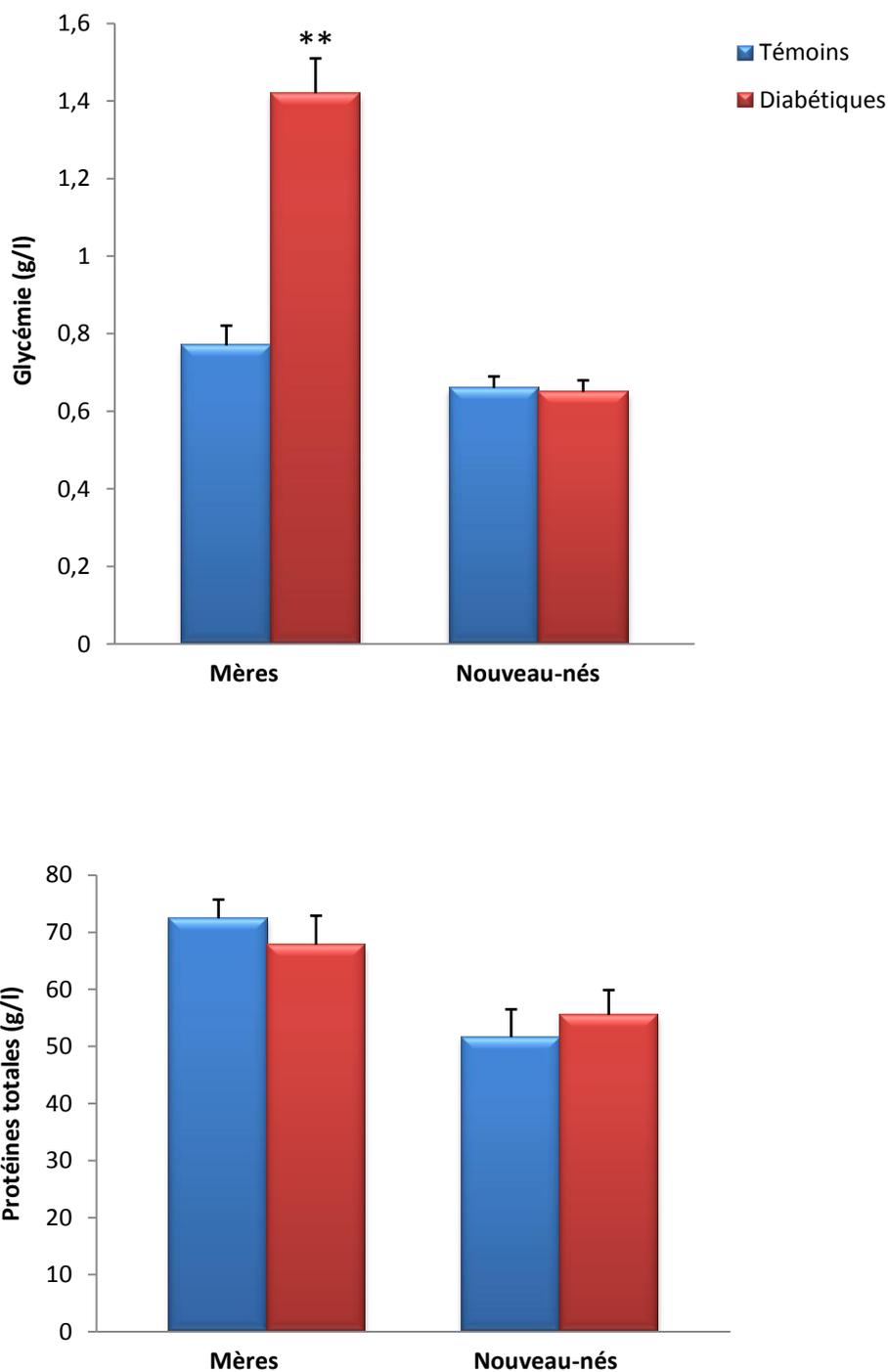
### **1.3. Teneurs plasmatiques en urée, créatinine et acide urique chez les mères et leurs nouveau-nés (Figure 20 ; Tableau A1 en annexes)**

Aucune variation significative concernant les teneurs plasmatiques en urée, créatinine et acide urique n'est notée chez les mères diabétiques comparées aux mères témoins ainsi qu'entre leurs nouveau-nés.

## **2. Statut oxydant / antioxydant chez les mères et les nouveau-nés**

### **2.1. Pouvoir antioxydant total chez les mères et leurs nouveau-nés (Figure 21 ; Tableau A2 en annexes)**

Le pouvoir antioxydant total, nommé ORAC, est significativement faible chez les mères diabétiques et chez leurs nouveau-nés comparés aux valeurs obtenues chez les mères témoins et leurs nouveau-nés.

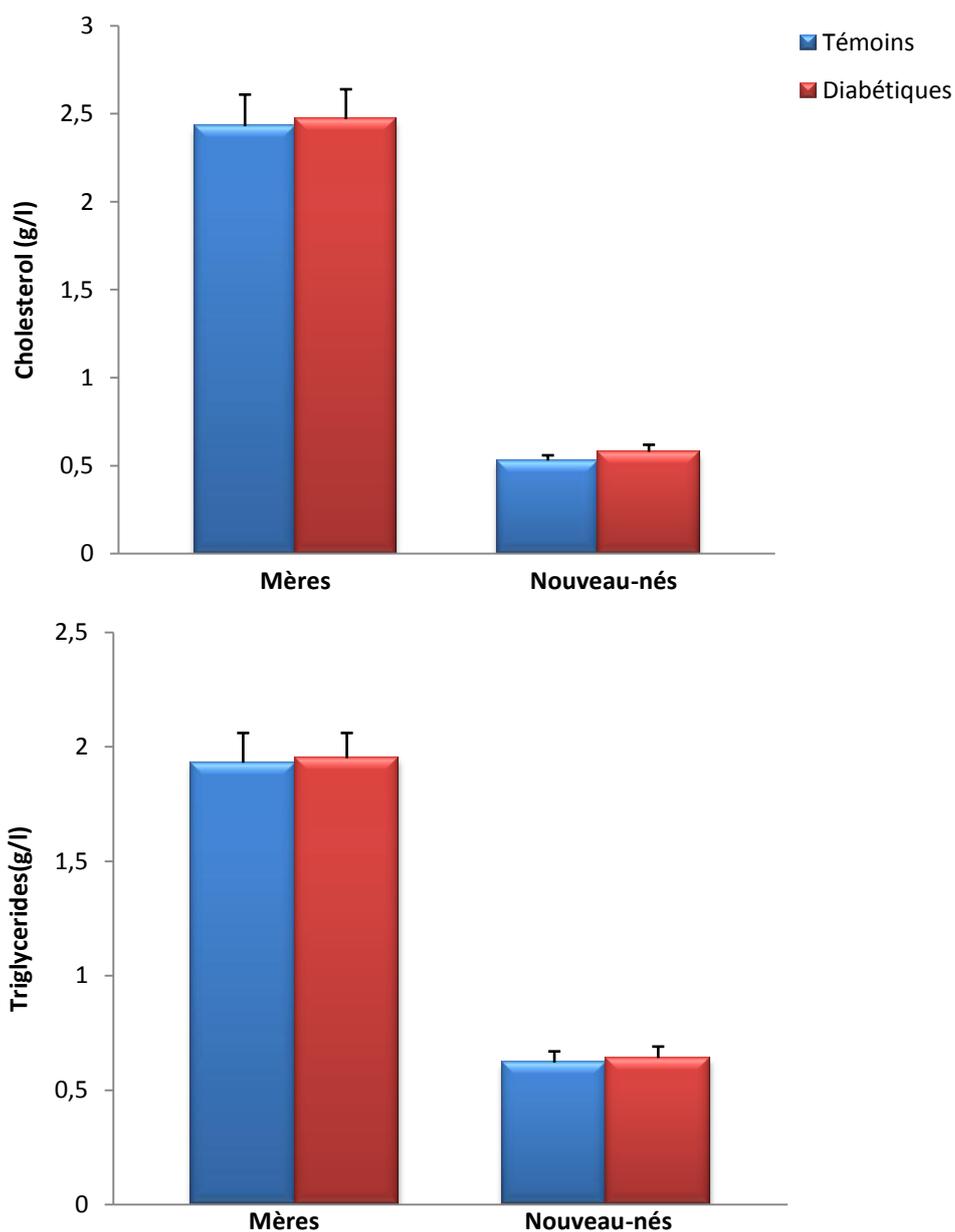


**Figure 17. Teneurs plasmatiques en glucose et en protéines totales chez les mères et leurs nouveau-nés.**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Écart type. La comparaison des moyennes entre les deux groupes de mères et de nouveau-nés est effectuée par le test « t » de Student :

Mères diabétiques ou leurs nouveau-nés comparés aux mères ou nouveau-s témoins:

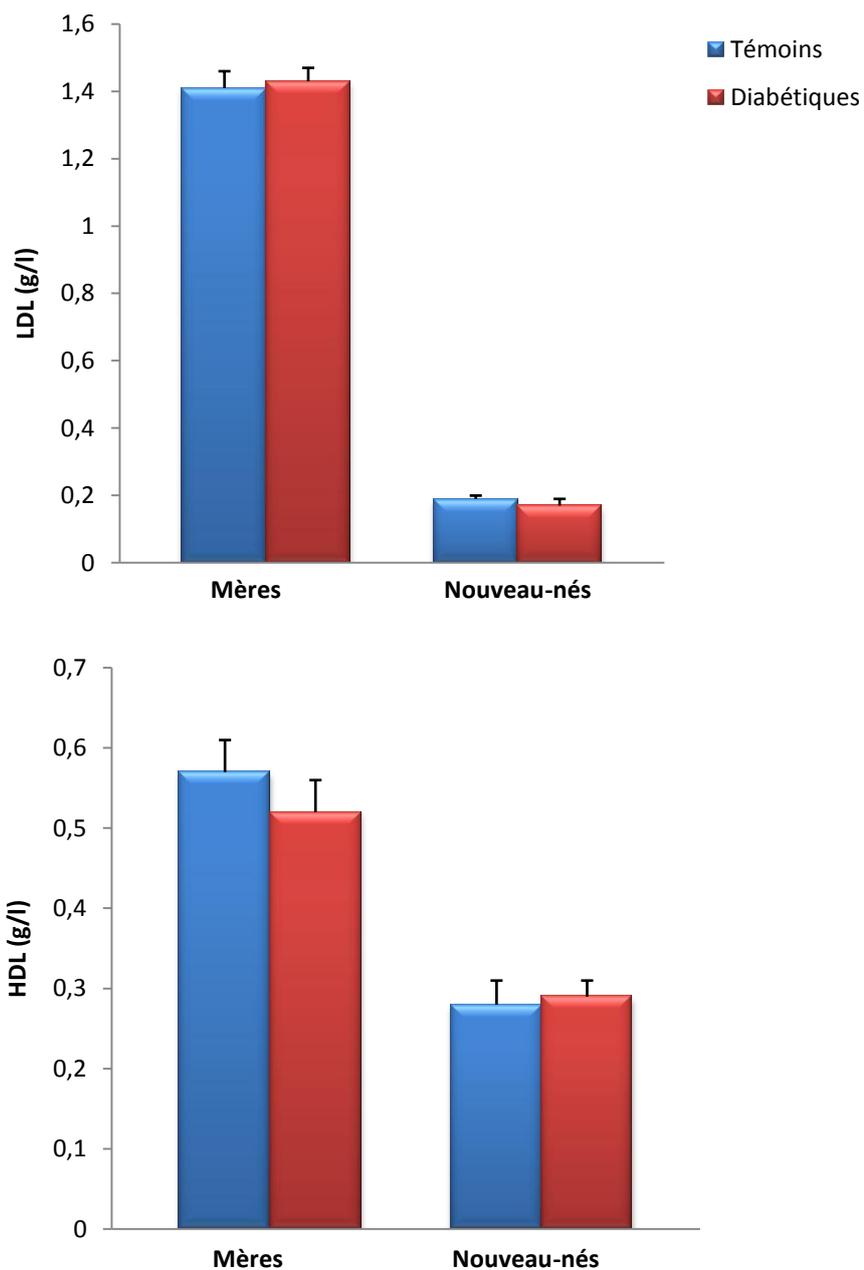
\*\* P < 0,001.



**Figure 18 : Teneurs plasmatiques en cholestérol et en triglycérides chez les mères et leurs nouveau-nés.**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Écart type. La comparaison des moyennes entre les deux groupes de mères ou de nouveau-nés est effectuée par le test « t » de student.

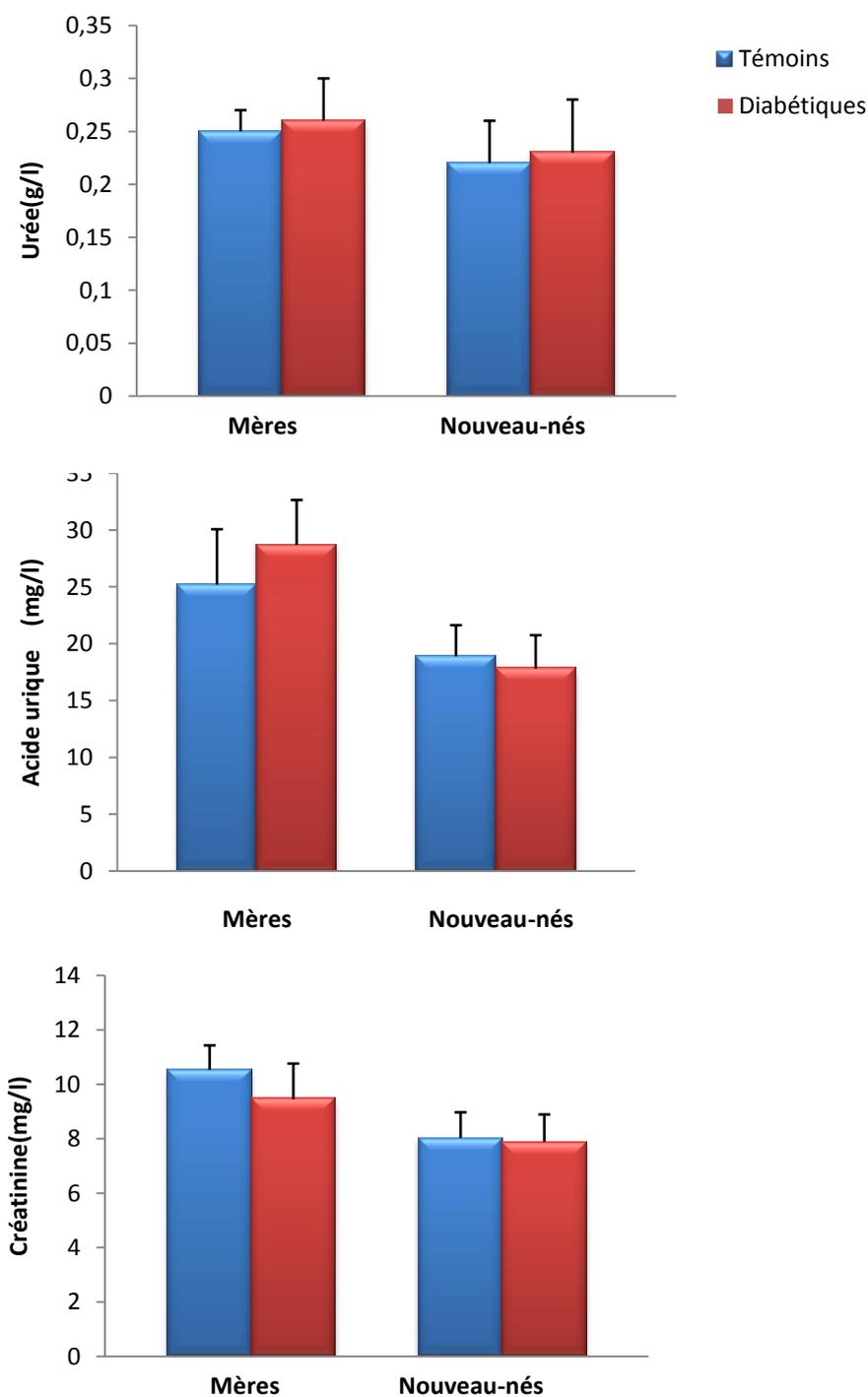
NB : aucune différence significative.



**Figure 19 : Teneurs plasmatiques en LDL et HDL-cholestérol chez les mères et leurs nouveau-nés.**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Écart type. La comparaison des moyennes entre les deux groupes de mères ou de nouveau-nés est effectuée par le test « t » de student :

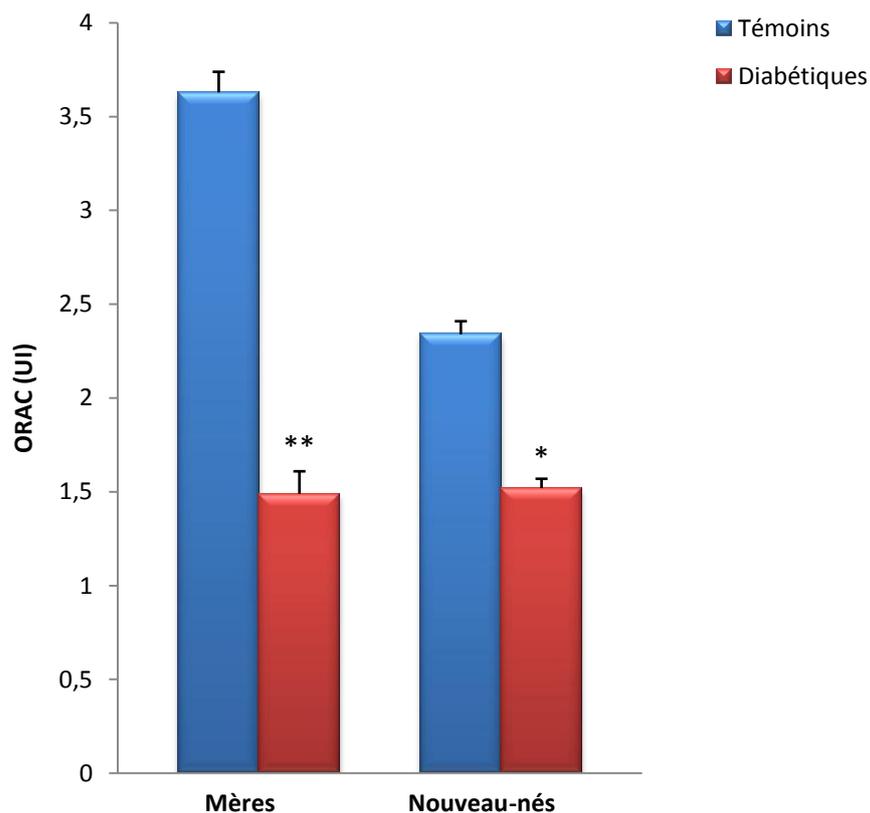
NB : aucune différence significative.



**Figure 20 : Teneurs plasmatiques en urée, créatinine et acide urique chez les mères et leurs nouveau-nés.**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Écart type. La comparaison des moyennes entre les deux groupes de mères ou de nouveau-nés est effectuée par le test « t » de student:

NB : aucune différence significative.



**Figure 21 : Pouvoir antioxydant total du plasma chez les mères et leurs nouveau-nés**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Écart type. La comparaison des moyennes entre les deux groupes de mères ou de nouveau-nés est effectuée par le test « t » de student.

Mères diabétiques ou leurs nouveau-nés comparés aux mères ou nouveau-nés témoins:  
 \*  $P < 0,01$  ; \*\*  $P < 0,001$ .

## **2.2. Teneurs plasmatiques en vitamine C chez les mères et leurs nouveau-nés (Figure 22 et Tableau A2 en annexes)**

On remarque une diminution significative des teneurs plasmatiques en vitamine C chez les mères diabétiques comparées aux mères témoins. Cependant, chez leurs nouveau-nés, les teneurs plasmatiques en vitamine C sont similaires à celles des nouveau-nés témoins.

## **2.3. Teneurs érythrocytaires en glutathion réduit et en activité de la catalase chez les mères et leurs nouveau-nés (Figure 22 et Tableau A2 en annexes)**

Les activités érythrocytaires de la catalase montrent une diminution hautement significative chez les mères diabétiques et leurs nouveau-nés comparés à leurs témoins respectifs.

Chez les mères diabétiques et leurs nouveau-nés, les teneurs érythrocytaires en glutathion réduit montrent une diminution significative comparés à leurs témoins respectifs.

## **2.4. Teneurs érythrocytaires en malondialdéhyde et en protéines carbonylées chez les mères et leurs nouveau-nés (Figure 23 et Tableau A2 en annexes)**

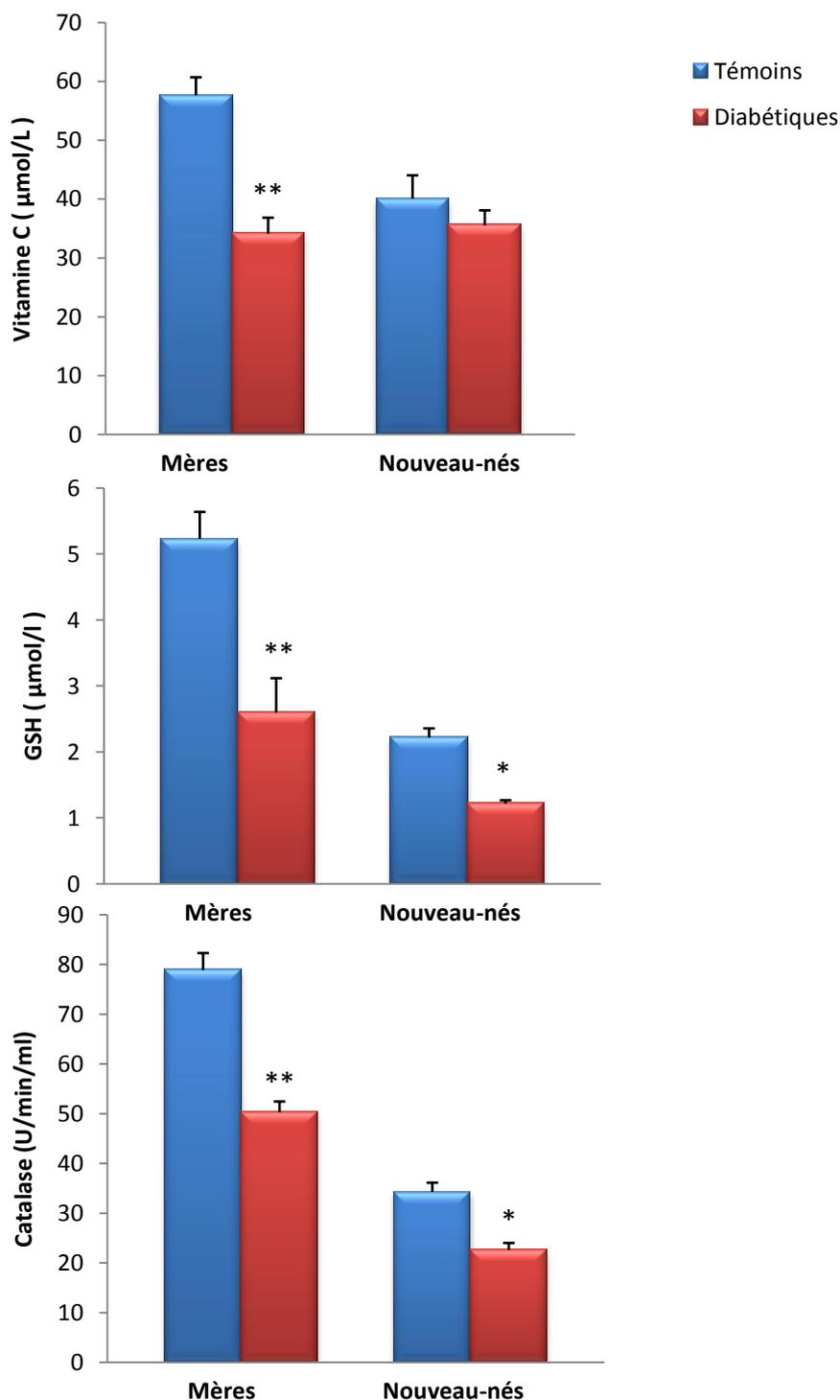
Chez les mères diabétiques et leurs nouveau-nés, une augmentation hautement significative est notée concernant les taux érythrocytaires en malondialdéhyde comparés au groupe témoin.

Une augmentation hautement significative des teneurs érythrocytaires en protéines carbonylées est aussi notée chez les mères diabétiques et leurs nouveau-nés par rapport aux témoins respectifs.

## **2.5. Teneurs érythrocytaires en anion superoxyde et en monoxyde d'azote chez les mères et leurs nouveau-nés (Figure 24 et Tableau A2 en annexes)**

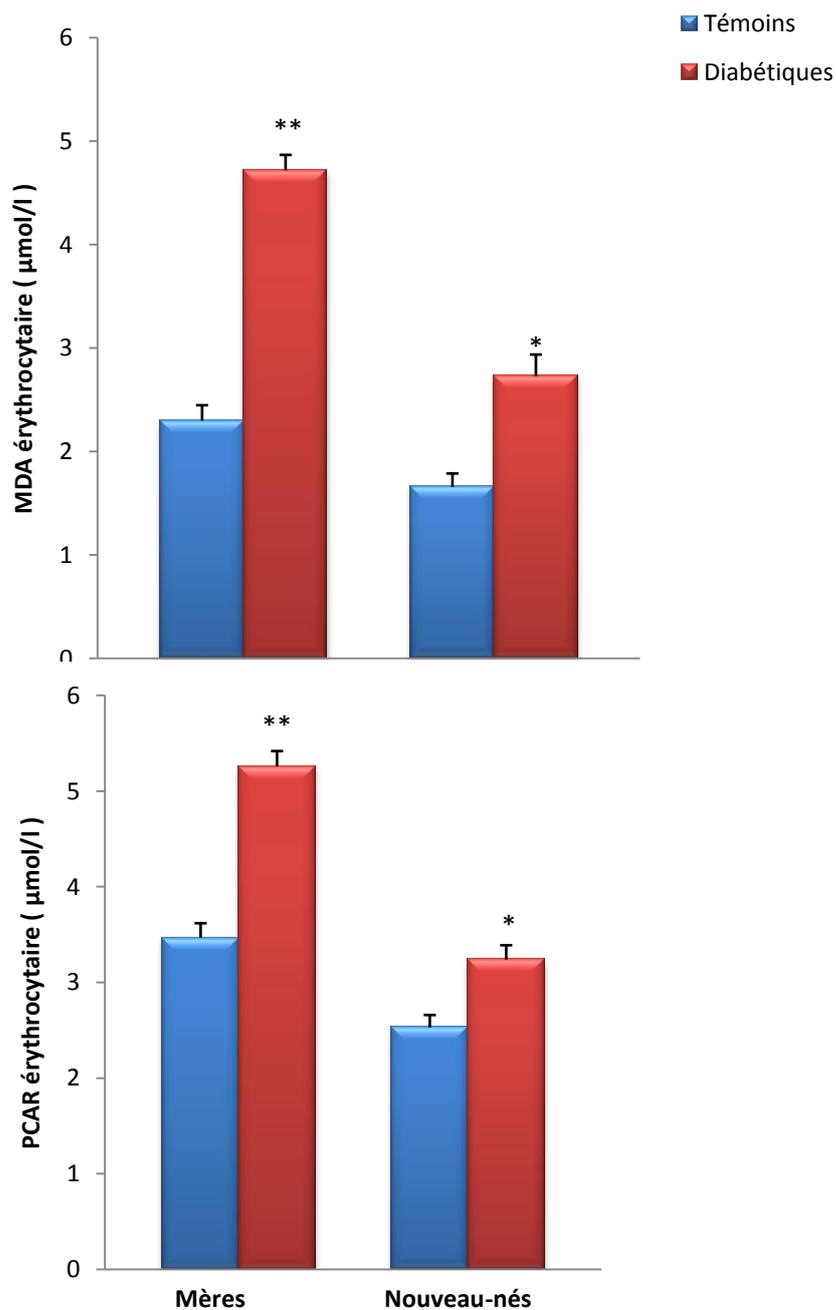
Les teneurs érythrocytaires en anion superoxyde sont significativement augmentées chez les mères diabétiques comparées aux témoins. Chez les nouveau-nés, une augmentation significative est aussi notée chez le groupe né des mères diabétiques par rapport aux nouveau-nés témoins.

En ce qui concerne le monoxyde d'azote, aucune différence significative n'a été marquée chez les mères diabétiques et leurs nouveau-nés comparés à leurs témoins respectifs.



**Figure 22 : Statut antioxydant chez les mères et leurs nouveau-nés**

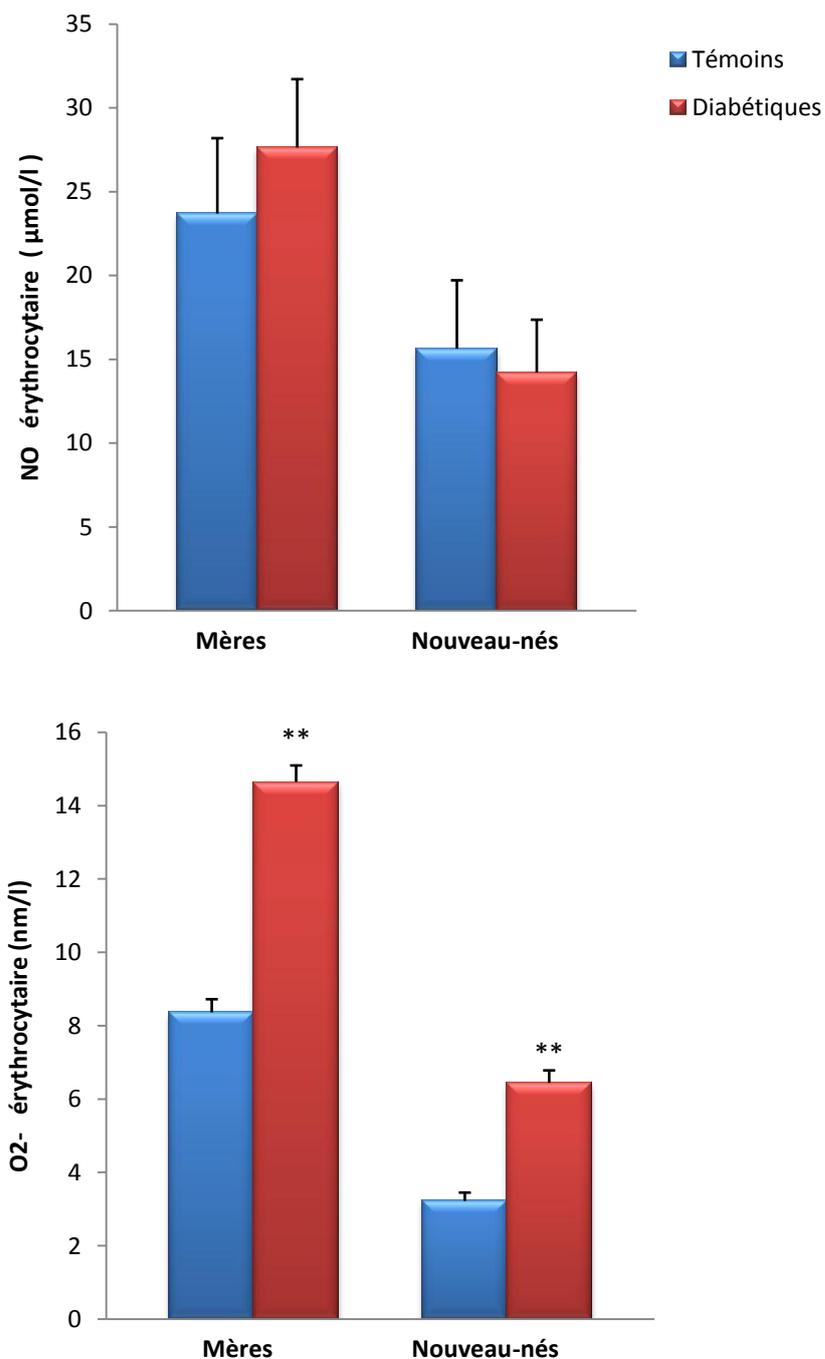
Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Écart type. La comparaison des moyennes entre les deux groupes de mères ou entre les deux groupes de nouveau-nés est effectuée par le test « t » de student : Mères diabétiques ou leurs nouveau-nés comparés aux mères ou nouveau-nés témoins : \* P < 0,01 ; \*\* P < 0,001.



**Figure 23 : Statut oxydant chez les mères et leurs nouveau-nés**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Écart type. MDA : malondialdéhyde ; PCAR : protéines carbonylées. La comparaison des moyennes entre les deux groupes de mères ou entre les deux groupes de nouveau-nés est effectuée par le test «t» de student:

Mères diabétiques ou nouveau-nés comparées aux mères ou nouveau-nés témoins :  
 \* P < 0,01 ; \*\* P < 0,001.



**Figure 24 : Teneurs érythrocytaires en monoxyde d'azote (NO) et en anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) chez les mères et leurs nouveau-nés**

Chaque valeur représente la moyenne ± Écart type. La comparaison des moyennes entre les deux groupes de mères ou entre les deux groupes de nouveau-nés est effectuée par le test « t » de student : Mères diabétiques ou nouveau-nés comparées aux mères ou nouveau-nés témoins: \*\* P < 0,001.

### **3. Formule de la numération sanguine chez les mères et leurs nouveau-nés (Tableau 6)**

Aucune différence significative n'est notée entre les groupes témoins et diabétiques concernant le nombre de globules blancs, globules rouges, plaquettes et monocytes ainsi que les taux en l'hémoglobine.

Une augmentation hautement significative du taux de l'hémoglobine glyquée (Hb A1c) est constatée chez les femmes enceintes diabétiques ainsi que chez leurs nouveau-nés comparés aux témoins respectifs.

Chez les mères diabétiques ainsi que leurs nouveau-nés, une augmentation significative du nombre de polynucléaires ainsi qu'une diminution du nombre de lymphocytes sont notées en comparaison avec les valeurs obtenues chez les témoins.

### **4. Effets des différentes huiles sur la fonction lymphocytaire in vitro**

#### **4.1. Effets des différentes huiles sur la prolifération des lymphocytes in vitro**

La prolifération lymphocytaire en présence d'agent mitogène, la Concanavaleine A (Con A), est représentée sous forme de l'indice de prolifération en présence ou en absence des huiles (l'huile de lin, l'huile de nigelle, l'huile d'olive) (Figure 25; Tableau A3 en annexes).

La prolifération des lymphocytes montre une diminution significative chez le groupe diabétique comparé au groupe témoin en présence de la Con A, d'insuline, d'huile de nigelle, d'huile d'olive et de vitamine E. Par contre, aucune différence significative entre les deux groupes n'est remarquée en présence de l'huile de lin.

La présence de l'insuline, de l'huile de nigelle et de vitamine E dans le milieu de culture potentialise l'effet de la Con A et stimule la prolifération lymphocytaire chez le groupe témoin et le groupe diabétique. Par contre, l'huile de lin provoque une réduction de la prolifération cellulaire alors que l'huile d'olive n'a aucun effet.

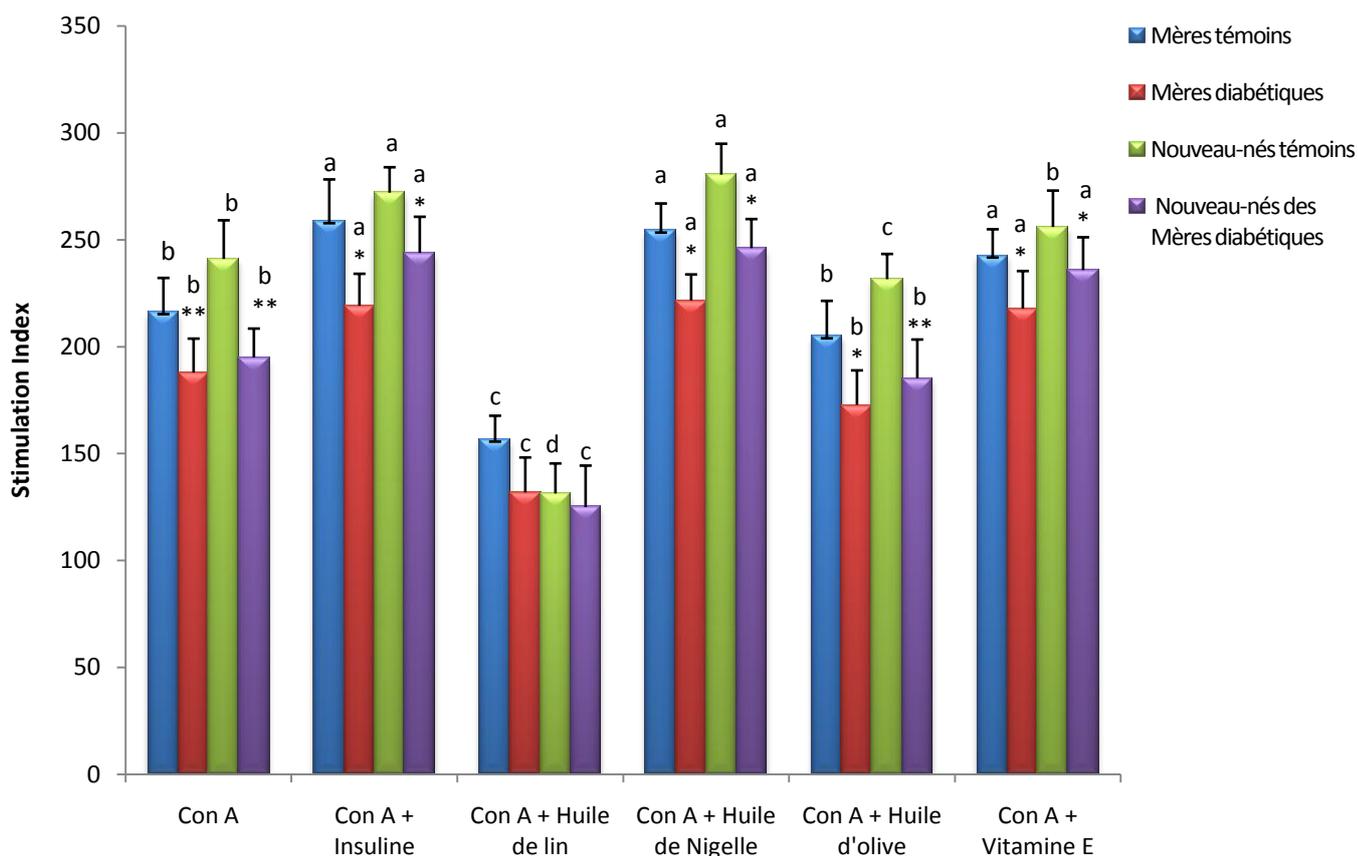
Les variations entraînées par les huiles et la vitamine E sont similaires chez le groupe témoin et le groupe diabétique. De plus, les lymphocytes des nouveau-nés répondent de la même façon que ceux des mères.

**Tableau 6 : Hémogramme chez les mères et leurs nouveau-nés**

| Hémogramme                                      | Groupe témoin  |                | Groupe diabétique |              |
|---|----------------|----------------|-------------------|--------------|
|   | Mères          | Nouveau-nés    | Mères             | Nouveau-nés  |
| <b>Globules blancs (<math>10^3/mm^3</math>)</b> | 7,97 ± 1,56    | 14,36 ± 1,90   | 8,53 ± 1,01       | 16,59 ± 2,28 |
| <b>Globules rouges (<math>10^6/mm^3</math>)</b> | 4,44 ± 0,43    | 4,25 ± 0,38    | 4,13 ± 0,49       | 4,36 ± 0,29  |
| <b>Plaquettes (<math>10^3/mm^3</math>)</b>      | 282,70 ± 52,11 | 290,41 ± 43,81 | 219 ± 53,34       | 238 ± 49,73  |
| <b>Hémoglobine (g/dL)</b>                       | 12,01±0,88     | 13,40±0,96     | 11,64±1,22        | 12,55±0,85   |
| <b>Hb A1c (%)</b>                               | 4,43±0,25      | 2,71±0,48      | 7,11±0,42**       | 4,35±0,37**  |
| <b>Monocytes (%)</b>                            | 5,12 ± 1,67    | 4,37±1,25      | 6,07±1,47         | 5,76±0,96    |
| <b>Lymphocytes (%)</b>                          | 25,47 ± 4,98   | 34,62±3,66     | 14,9±2,38**       | 23,77±5,09*  |
| <b>Polynucléaires (%)</b>                       | 66,99±3,39     | 60,70±2,60     | 78,55±3,01*       | 66,27±3,32*  |

Chaque valeur représente la moyenne ± écart type. CCMH : Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine ; TCMH : Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine ; VGM: Volume globulaire moyen. La comparaison des moyennes entre les mères témoins et les mères diabétiques, et entre les nouveau-nés témoins et les nouveau-nés de mères diabétiques, est réalisée par le test t de student:

\* P < 0,01 ; \*\* P < 0,001.



**Figure 25 : Effets des différentes huiles sur la prolifération des lymphocytes in vitro**

Les cellules sont incubées en présence de la ConA, insuline, huile de lin, huile de nigelle, huile d'olive ou vitamine E pendant 48 h. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  ET. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de LSD afin de déterminer les différences significatives.

\* indique différence significative entre le groupe diabétique et le groupe témoin:

\*  $P < 0,01$  ; \*\*  $P < 0,001$ .

a, b, c..... indiquent des différences significatives entre les différentes incubations dans le même groupe :  $P < 0,05$ .

## **4. 2. Effets des différentes huiles sur la sécrétion des cytokines**

La sécrétion des interleukines IL2 par les lymphocytes du groupe témoin (mère et nouveau-né) et du group diabétique est modulée significativement par la présence des huiles et de la vitamine E dans le milieu d'incubation (Figure 26, Tableau A4 en annexes).

La sécrétion des IL2 par les lymphocytes des mères diabétiques et de leurs nouveau-nés est significativement réduite comparée à celle des lymphocytes des mères témoins et leurs nouveau-nés, et ceci se produit en présence de l'agent mitogène Con A, de l'insuline, de l'huile de nigelle et de l'huile d'olive. Par contre, en présence de l'huile de lin aucune différence significative n'est observée entre les deux groupes.

De plus, en présence d'insuline, d'huile de nigelle et de la vitamine E, le taux de sécrétion des IL2 est augmenté significativement comparé à celui en présence de la Con A seule, variation observée aussi bien chez les témoins que chez les diabétiques. Au contraire, l'huile de lin induit une réduction de la sécrétion des IL2 alors que l'huile d'olive n'a aucun effet.

La sécrétion des interleukines IL4 par les lymphocytes du groupe témoin et diabétique ne présente pas de variations significatives en présence des huiles et de la vitamine E (Figure 10). Cette cytokine est cependant affectée par la présence de l'insuline dans le milieu de culture. En effet, l'insuline induit une augmentation de la sécrétion des IL4 aussi bien chez les mères diabétiques et leurs nouveau-nés que chez les mères témoins et leurs nouveau-nés. L'effet est plus marqué chez les mères diabétiques.

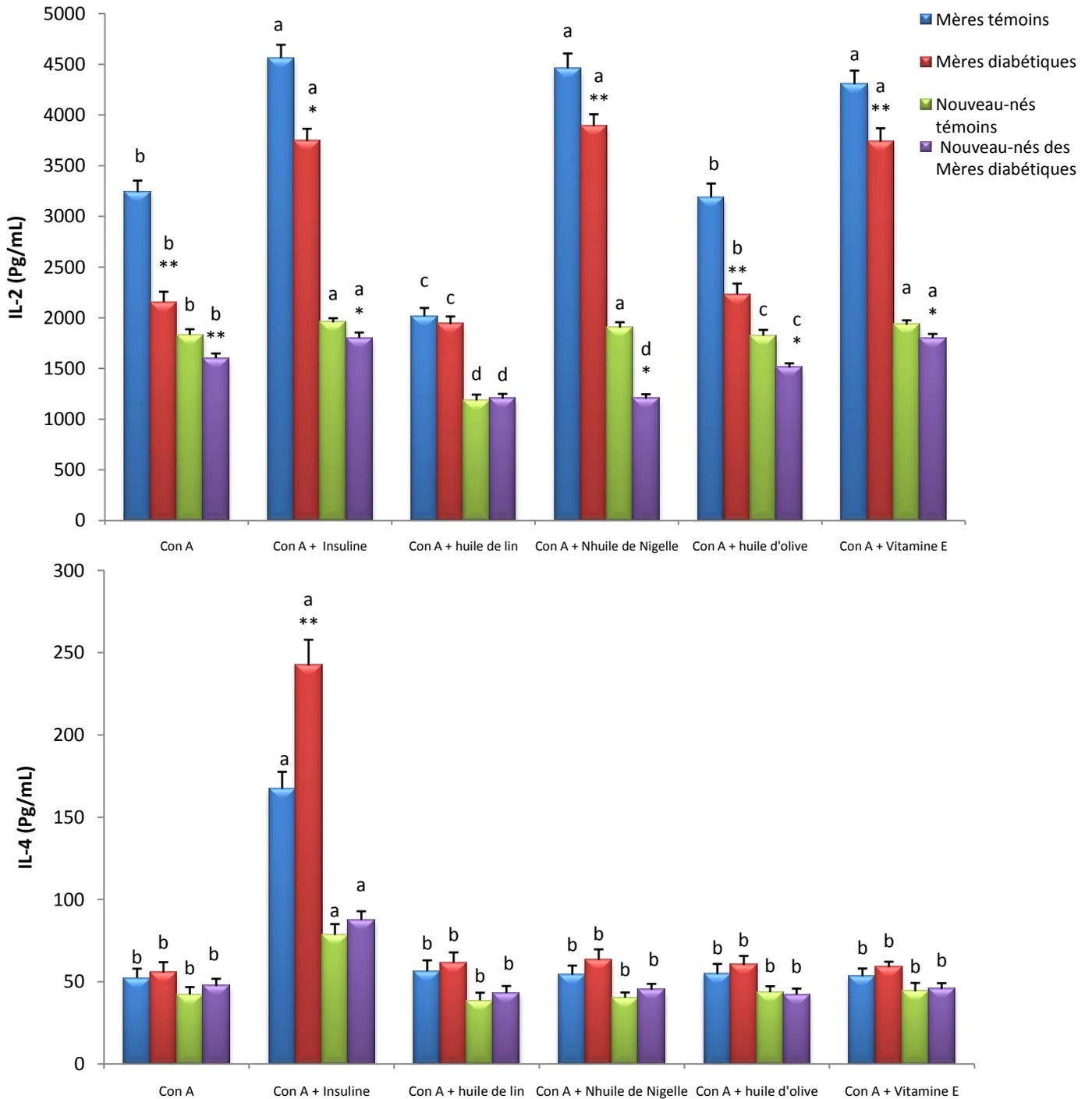
Chez les mères diabétiques et chez les mères témoins, le rapport Th1/Th2 représenté par le rapport IL2/IL4 est augmenté significativement en présence de l'huile de nigelle ainsi qu'en présence de la vitamine E par rapport à l'incubation en présence de la Con A seule (Tableau 7). L'insuline et l'huile de lin induisent une réduction de ce rapport, alors que l'huile d'olive n'a aucun effet. Les mêmes variations sont notées chez les nouveau-nés des deux groupes.

Le rapport IL2/IL4 est significativement réduit chez les diabétiques comparés aux témoins.

## **4.3. Effets des différentes huiles sur le statut Redox lymphocytaire**

### **4.3.1. Effets des différentes huiles sur les teneurs en glutathion réduit (GSH) des lymphocytes (Figure 27 ; Tableau A5 en annexes)**

Le taux de GSH lymphocytaire est diminué d'une manière significative en présence de la Con A seule et de l'insuline chez les femmes diabétiques et leurs nouveau-nés comparés aux femmes témoins et leurs nouveau-nés. En présence de la vitamine E seulement les mères diabétiques présentent une augmentation des teneurs lymphocytaires en GSH comparés aux mères témoins.



**Figure 26 : Effets des différentes huiles sur la sécrétion des cytokines par les lymphocytes**

Les cellules sont incubées en présence de la Con A, insuline, huile de lin, huile de nigelle, huile d'olive ou vitamine E pendant 48 h. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de LSD afin de déterminer les différences significatives.

\* indique différence significative entre le groupe diabétique et le groupe témoin: \* P < 0,01 ; \*\* P < 0,001. a, b, c..... indiquent des différences significatives entre les différentes incubations dans le même groupe : P < 0,05.

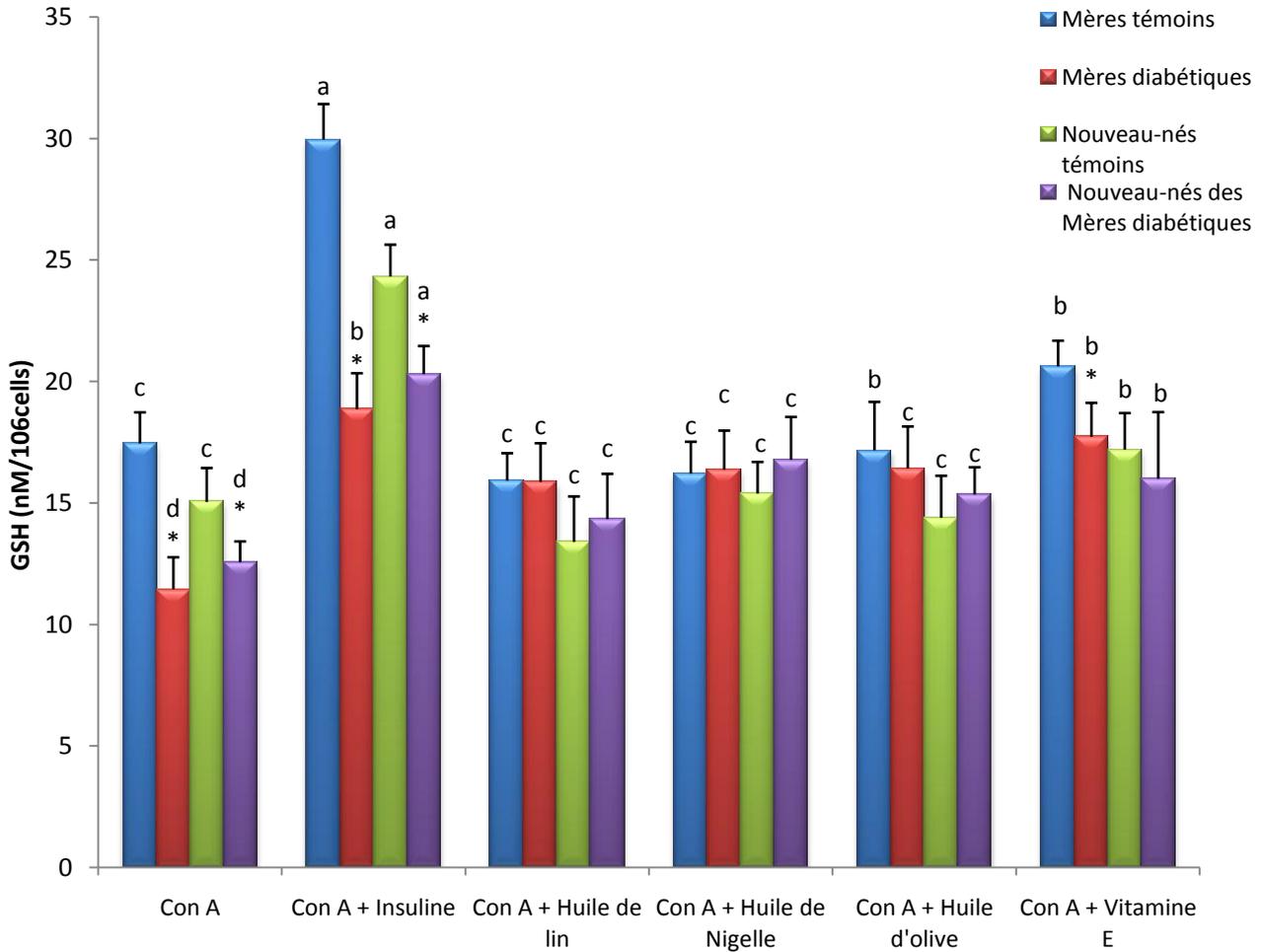
**Tableau 7 : Rapports Th1/Th2 (IL-2/IL-4) en présence des différentes huiles**

| Cytokines                | Groupe témoin            |                          | Groupe diabétique          |                           |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                          | Mères                    | Nouveau- nés             | Mères                      | Nouveau- nés              |
| <b>IL-2 / IL-4</b>       |                          |                          |                            |                           |
| Con A                    | 61,91±8,14 <sup>b</sup>  | 43,32±4,97 <sup>a</sup>  | 38,75±6,13 <sup>** b</sup> | 33,71±5,73 <sup>* a</sup> |
| Con A + Insuline         | 27,26± 3,68 <sup>d</sup> | 24,90±3,22 <sup>c</sup>  | 10,93±2,80 <sup>* d</sup>  | 20,56±3,19 <sup>c</sup>   |
| Con A + Huile de lin     | 35,76±2,39 <sup>c</sup>  | 30,57±2,40 <sup>b</sup>  | 31,49± 3,05 <sup>c</sup>   | 27,83±3,93 <sup>b</sup>   |
| Con A + Huile de nigelle | 82,18± 6,34 <sup>a</sup> | 47,22±6,48 <sup>a</sup>  | 61,46± 4,12 <sup>* a</sup> | 41,09±4,11 <sup>a</sup>   |
| Con A + Huile d'olive    | 58,21± 3,63 <sup>b</sup> | 39,51± 5,36 <sup>a</sup> | 37,05± 3,23 <sup>* b</sup> | 33,35± 5,32 <sup>a</sup>  |
| Con A + Vitamine E       | 80,56± 8,88 <sup>a</sup> | 43,70± 4,22 <sup>a</sup> | 63,40± 5,83 <sup>* a</sup> | 39,40± 5,79 <sup>a</sup>  |

Les cellules sont incubées en présence de la Con A, insuline, huile de lin, huile de nigelle, huile d'olive ou vitamine E pendant 48 h. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de LSD afin de déterminer les différences significatives.

\* indique différence significative entre le groupe diabétique et le groupe témoin: \* P< 0,01 ;  
\*\* P<0,001.

a, b, c..... indiquent des différences significatives entre les différentes incubations dans le même groupe : P < 0,05.



**Figure 27 : Effets des différentes huiles sur les taux en glutathion réduit (GSH) lymphocytaire**

Les cellules sont incubées en présence de la Con A, insuline, huile de lin, huile de nigelle, huile d'olive ou vitamine E pendant 48 h. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  ET. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de LSD afin de déterminer les différences significatives.

\* indique différence significative entre le groupe diabétique et le groupe témoin: \*  $P < 0,01$  ; \*\*  $P < 0,001$ .

a, b, c..... indiquent des différences significatives entre les différentes incubations dans le même groupe :  $P < 0,05$ .

Aucune différence significative n'est marquée en présence de l'huile de lin, l'huile d'olive et de Nigelle entre les deux groupes étudiés.

L'insuline et la vitamine E induisent une augmentation des taux de GSH lymphocytaire chez les deux groupes étudiés, mères et nouveau-nés.

#### **4.3.2. Effets des différentes huiles sur les teneurs en malondialdéhyde (MDA) et en protéines carbonylées des lymphocytes (Figure 28 ; Tableau A5 en annexes)**

Les teneurs en MDA lymphocytaires augmentent significativement chez le groupe diabétique en présence de Con A, insuline et vitamine E

Tandis que la présence de l'insuline induit une augmentation des taux de MDA lymphocytaire ; la vitamine E et les huiles provoquent une diminution des teneurs en MDA au niveau des lymphocytes comparés aux autres incubations, chez les deux groupes étudiés.

Une augmentation significative des teneurs en protéines carbonylées est marquée chez les lymphocytes des femmes diabétiques en présence de la Con A, de l'insuline, et de la vitamine E comparés aux lymphocytes des femmes témoins tandis qu'aucune différence n'est notée en présence des différentes huiles utilisé dans les incubations. La présence de l'insuline dans le milieu de culture induit une augmentation des teneurs en protéines carbonylés lymphocytaires chez le groupe témoin et le groupe diabétique respectivement. Cependant, en présence des huiles et de la vitamine E, les teneurs en protéines carbonylés lymphocytaires sont réduites dans les deux groupes.

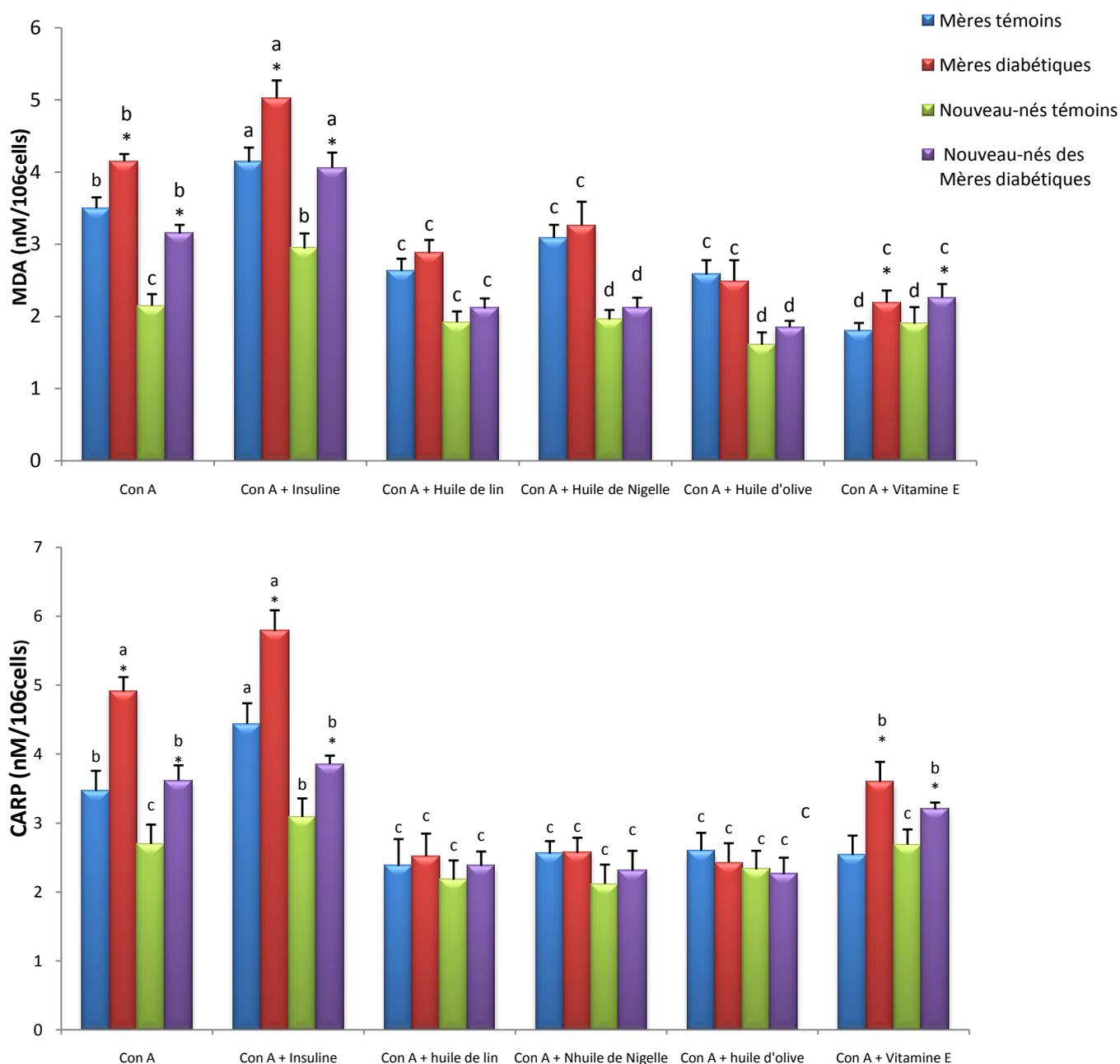
#### **4.3.3. Activités de la Superoxyde dismutase (SOD) et de la Catalase des lymphocytes en présence des différentes huiles (Figure 29 ; Tableau A5 en annexes)**

L'activité de la catalase lymphocytaire est diminuée significativement chez les mères diabétiques et chez leurs nouveau-nés, en présence de la Con A et de l'insuline mais augmentée significativement en présence de la vitamine E comparée aux valeurs témoins. Cette activité ne présente aucune variation significative en présence d'huile de lin, d'huile de nigelle et d'huile d'olive entre le groupe diabétique et témoin.

Chez les témoins et les diabétiques, l'insuline, l'huile de lin, l'huile de nigelle, l'huile d'olive et la vitamine E provoquent une augmentation de l'activité catalase lymphocytaire.

L'activité du superoxyde dismutase (SOD) diminue significativement au niveau des lymphocytes des mères diabétiques et de leurs nouveau-nés incubés en présence de la Con A et de l'insuline comparée aux valeurs chez les mères témoins et leurs nouveau-nés.

La présence de l'insuline, des huiles et de la vitamine E dans les incubations stimulent l'activité SOD lymphocytaire chez les deux groupes étudiés.

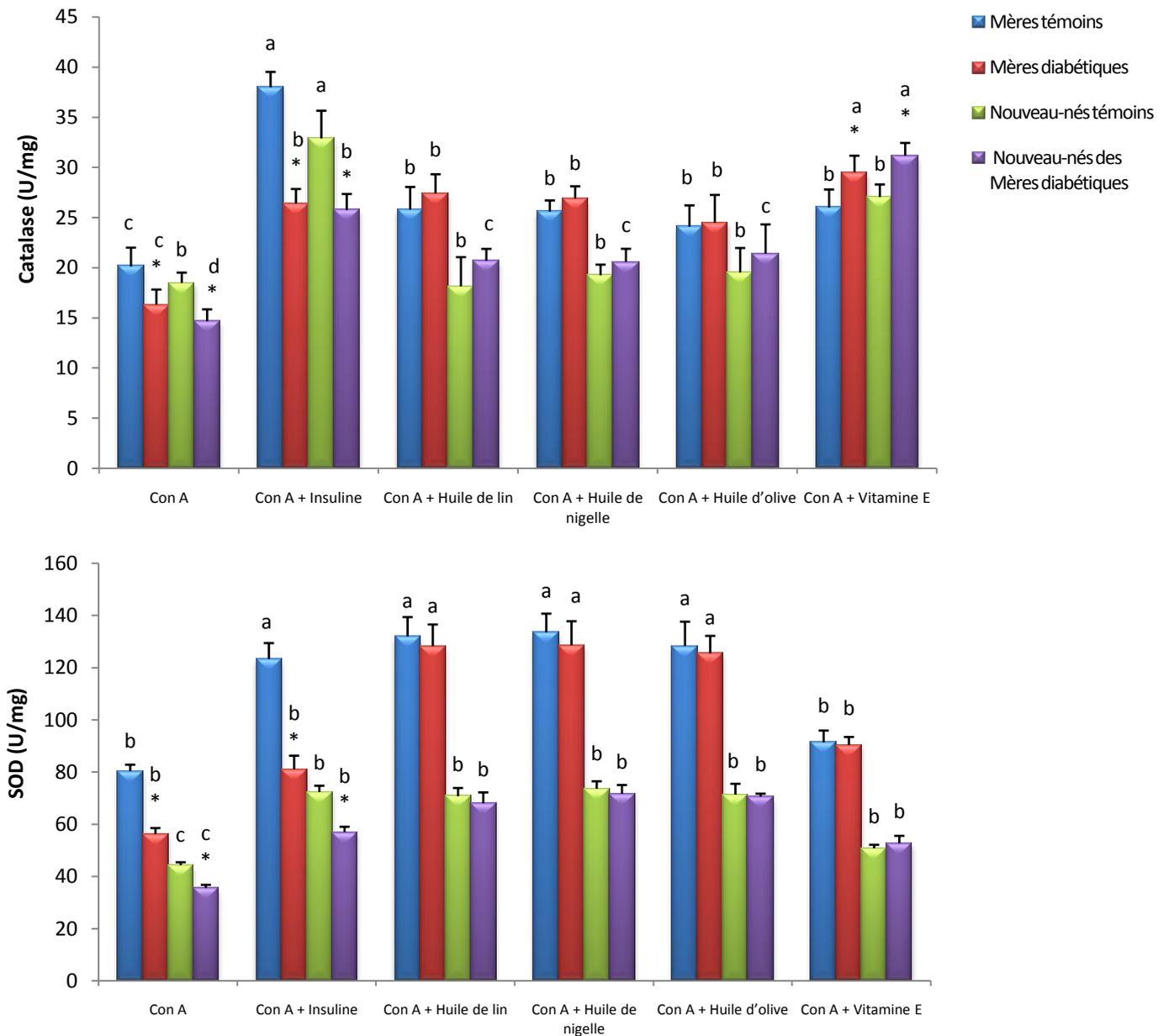


**Figure 28 : Effets des différentes huiles sur les teneurs lymphocytaires en malondialdéhyde (MDA) et protéines carbonylées (CARP)**

Les cellules sont incubées en présence de la Con A, insuline, huile de lin, huile de nigelle, huile d'olive ou vitamine E pendant 48 h. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  ET. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de LSD afin de déterminer les différences significatives.

\* indique différence significative entre le groupe diabétique et le groupe témoin: \*  $P < 0,01$  ; \*\*  $P < 0,001$ .

a, b, c..... indiquent des différences significatives entre les différentes incubations dans le même groupe :  $P < 0,05$ .



**Figure 29 : Activité de la Superoxyde dismutase (SOD) et de la Catalase des lymphocytes en présence des différentes huiles**

Les cellules sont incubées en présence de la Con A, insuline, huile de lin, huile de nigelle, huile d'olive ou vitamine E pendant 48 h. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  ET. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de LSD afin de déterminer les différences significatives.

\* indique différence significative entre le groupe diabétique et le groupe témoin: \* P< 0,01 ; \*\* P<0,001.

a, b, c..... indiquent des différences significatives entre les différentes incubations dans le même groupe : P < 0,05.

#### **4.4. Composition en acides gras des membranes des lymphocytes chez les mères et leurs nouveau-nés (Tableau 8)**

##### **4.4.1. Composition en acide gras saturée (AGS) des phospholipides membranaires chez les mères et leurs nouveau-nés**

Aucune différence significative concernant les teneurs en acides gras saturés des membranes lymphocytaires n'est marquée chez le groupe diabétique comparé au témoin, quelque soit l'incubation considérée.

La présence de l'insuline, l'huile de lin et de la vitamine E n'affecte pas les AGS membranaires comparés à ceux dans l'incubation avec la Con A seule. Cependant, les pourcentages des AGS membranaires sont réduits en présence d'huile de nigelle et d'huile d'olive chez les groupes témoins et diabétiques. Des variations parallèles sont observées chez les mères et les nouveau-nés.

##### **4.4.2. Composition en C18:1 n-9 des phospholipides membranaires chez les mères et leurs nouveau-nés**

La composition en C18:1 n-9 des phospholipides membranaires ne diffère pas significativement entre les groupes témoins et diabétiques.

Les incubations en présence de l'insuline et la vitamine E ne modifient pas les taux de C18 :1 n-9 membranaires. Cependant, l'huile d'olive et l'huile de nigelle entraînent une augmentation alors que l'huile de lin provoque une réduction des pourcentages des acides gras C18:1 n-9 membranaires chez les groupes témoins et diabétiques.

##### **4.4.3. Composition en C18:2 n-6 des phospholipides membranaires chez les mères et leurs nouveau-nés**

Les lymphocytes des femmes enceintes diabétiques montrent une augmentation significative des proportions des acides gras C18:2 n-6 en milieu de culture stimulé avec la Con A seule ou en présence de l'huile de lin, l'huile de nigelle, l'huile d'olive et la vitamine E ; mais aucune différence significative n'est marquée en présence de l'insuline.

La composition en C18:2 n-6 des phospholipides des membranes lymphocytaires ne montre aucune différence significative chez nouveau nés de mères diabétiques comparés aux nouveau-nés de mères témoins.

L'huile de nigelle entraîne une augmentation des pourcentages des C18:2 n-6 comparés aux autres incubations chez les deux groupes témoins et diabétiques, mères et nouveau-nés. De plus, l'insuline et l'huile de lin réduisent les taux de C18 :2 n-6 seulement chez les mères diabétiques.

**Tableau 8 : Composition en acides gras des membranes des lymphocytes chez les mères et leurs nouveau-nés**

| Acides gras              | Groupe témoin             |                           | Groupe diabétique          |                           |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                          | Mères                     | Nouveau- nés              | Mères                      | Nouveau- nés              |
| <b>AGS</b>               |                           |                           |                            |                           |
| Con A                    | 51,20 ± 1,15 <sup>a</sup> | 48,67 ± 1,33 <sup>a</sup> | 52,30 ± 2,33 <sup>a</sup>  | 48,06 ± 1,21 <sup>a</sup> |
| Con A + Insuline         | 49,50 ± 2,61 <sup>a</sup> | 49,02 ± 2,19 <sup>a</sup> | 51,18 ± 1,85 <sup>a</sup>  | 49,04 ± 2,38 <sup>a</sup> |
| Con A + Huile de lin     | 50,11 ± 2,11 <sup>a</sup> | 49,73 ± 2,52 <sup>a</sup> | 51,43 ± 1,66 <sup>a</sup>  | 49,75 ± 1,42 <sup>a</sup> |
| Con A + Huile de nigelle | 40,42 ± 1,76 <sup>c</sup> | 42,33 ± 1,74 <sup>b</sup> | 39,03 ± 1,58 <sup>c</sup>  | 42,65 ± 1,77 <sup>b</sup> |
| Con A + Huile d'olive    | 46,33 ± 1,12 <sup>b</sup> | 43,76 ± 1,41 <sup>b</sup> | 45,05 ± 1,75 <sup>b</sup>  | 44,06 ± 1,63 <sup>b</sup> |
| Con A + Vitamine E       | 51,88 ± 1,25 <sup>a</sup> | 49,74 ± 1,03 <sup>a</sup> | 53,01 ± 2,27 <sup>a</sup>  | 48,44 ± 1,28 <sup>a</sup> |
| <b>C18:1 n-9</b>         |                           |                           |                            |                           |
| Con A                    | 16,14 ± 1,24 <sup>c</sup> | 17,03 ± 1,22 <sup>c</sup> | 16,63 ± 1,56 <sup>c</sup>  | 17,32 ± 1,52 <sup>c</sup> |
| Con A + Insuline         | 17,48 ± 1,33 <sup>c</sup> | 17,74 ± 1,53 <sup>c</sup> | 17,22 ± 1,72 <sup>c</sup>  | 16,98 ± 1,42 <sup>c</sup> |
| Con A + Huile de lin     | 11,74 ± 1,02 <sup>d</sup> | 13,03 ± 1,32 <sup>d</sup> | 10,68 ± 1,01 <sup>d</sup>  | 13,98 ± 1,37 <sup>d</sup> |
| Con A + Huile de nigelle | 20,06 ± 1,26 <sup>b</sup> | 20,11 ± 1,15 <sup>b</sup> | 21,02 ± 1,35 <sup>b</sup>  | 20,73 ± 1,51 <sup>b</sup> |
| Con A + Huile d'olive    | 23,55 ± 1,04 <sup>a</sup> | 24,95 ± 1,28 <sup>a</sup> | 23,06 ± 1,20 <sup>a</sup>  | 24,84 ± 1,38 <sup>a</sup> |
| Con A + Vitamine E       | 17,55 ± 1,27 <sup>c</sup> | 16,99 ± 1,84 <sup>c</sup> | 17,38 ± 1,65 <sup>c</sup>  | 17,04 ± 1,52 <sup>c</sup> |
| <b>C18:2 n-6</b>         |                           |                           |                            |                           |
| Con A                    | 10,58 ± 1,07 <sup>b</sup> | 8,11 ± 0,56 <sup>b</sup>  | 15,20 ± 1,03 <sup>*b</sup> | 9,46 ± 0,44 <sup>b</sup>  |
| Con A + Insuline         | 10,74 ± 1,65 <sup>b</sup> | 8,56 ± 0,57 <sup>b</sup>  | 12,20 ± 2,15 <sup>c</sup>  | 9,11 ± 0,63 <sup>b</sup>  |
| Con A + Huile de lin     | 9,93 ± 0,86 <sup>b</sup>  | 8,71 ± 0,44 <sup>b</sup>  | 13,35 ± 1,11 <sup>*c</sup> | 8,88 ± 0,51 <sup>b</sup>  |
| Con A + Huile de nigelle | 16,77 ± 1,27 <sup>a</sup> | 12,33 ± 0,83 <sup>a</sup> | 18,83 ± 1,04 <sup>*a</sup> | 12,83 ± 0,67 <sup>a</sup> |
| Con A + Huile d'olive    | 9,07 ± 1,02 <sup>b</sup>  | 8,82 ± 0,66 <sup>b</sup>  | 15,55 ± 1,21 <sup>*b</sup> | 9,02 ± 0,34 <sup>b</sup>  |
| Con A + Vitamine E       | 10,47 ± 1,37 <sup>b</sup> | 8,25 ± 0,47 <sup>b</sup>  | 15,45 ± 1,11 <sup>*b</sup> | 9,51 ± 0,38 <sup>b</sup>  |
| <b>C18:3 n-3</b>         |                           |                           |                            |                           |
| Con A                    | 1,38 ± 0,39 <sup>b</sup>  | 1,54 ± 0,11 <sup>b</sup>  | 1,27 ± 0,21 <sup>b</sup>   | 1,44 ± 0,25 <sup>b</sup>  |
| Con A + Insuline         | 1,36 ± 0,40 <sup>b</sup>  | 1,63 ± 0,23 <sup>b</sup>  | 1,30 ± 0,28                | 1,56 ± 0,35 <sup>b</sup>  |
| Con A + Huile de lin     | 9,43 ± 1,33 <sup>a</sup>  | 7,62 ± 0,38 <sup>a</sup>  | 9,66 ± 0,85 <sup>a</sup>   | 7,18 ± 0,28 <sup>a</sup>  |
| Con A + Huile de nigelle | 1,55 ± 0,41 <sup>b</sup>  | 1,52 ± 0,23 <sup>b</sup>  | 1,52 ± 0,33 <sup>b</sup>   | 1,47 ± 0,36 <sup>b</sup>  |
| Con A + Huile d'olive    | 1,33 ± 0,37 <sup>b</sup>  | 1,68 ± 0,37 <sup>b</sup>  | 1,35 ± 0,35 <sup>b</sup>   | 1,50 ± 0,31 <sup>b</sup>  |

RESULTATS ET INTERPRETATION

|                          |                           |                           |                            |                           |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Con A + Vitamine E       | 1,40 ± 0,22 <sup>b</sup>  | 1,61 ± 0,21 <sup>b</sup>  | 1,24 ± 0,18 <sup>b</sup>   | 1,50 ± 0,18 <sup>b</sup>  |
| <b>C20:4 n-6</b>         |                           |                           |                            |                           |
| Con A                    | 15,83 ± 1,45 <sup>b</sup> | 17,04 ± 1,53 <sup>b</sup> | 10,16 ± 0,66 <sup>*c</sup> | 16,08 ± 1,11 <sup>b</sup> |
| Con A + Insuline         | 16,62 ± 1,82 <sup>b</sup> | 17,81 ± 1,32 <sup>b</sup> | 14,37 ± 1,61 <sup>b</sup>  | 17,65 ± 1,34 <sup>b</sup> |
| Con A + Huile de lin     | 11,48 ± 1,03 <sup>c</sup> | 13,43 ± 1,27 <sup>c</sup> | 8,44 ± 0,65 <sup>*d</sup>  | 13,17 ± 1,26 <sup>c</sup> |
| Con A + Huile de nigelle | 18,05 ± 1,16 <sup>a</sup> | 19,33 ± 1,21 <sup>a</sup> | 15,83 ± 1,05 <sup>*a</sup> | 19,52 ± 1,21 <sup>a</sup> |
| Con A + Huile d'olive    | 14,33 ± 1,89 <sup>b</sup> | 16,88 ± 1,33 <sup>b</sup> | 11,22 ± 0,75 <sup>*c</sup> | 16,73 ± 1,36 <sup>b</sup> |
| Con A + Vitamine E       | 15,34 ± 1,52 <sup>b</sup> | 17,11 ± 1,38 <sup>b</sup> | 10,07 ± 0,54 <sup>*c</sup> | 16,01 ± 1,24 <sup>b</sup> |
| <b>C20:5 n-3</b>         |                           |                           |                            |                           |
| Con A                    | 2,85 ± 0,48 <sup>b</sup>  | 1,66 ± 0,31 <sup>b</sup>  | 2,07 ± 0,37 <sup>b</sup>   | 1,57 ± 0,29 <sup>b</sup>  |
| Con A + Insuline         | 2,80 ± 0,55 <sup>b</sup>  | 1,54 ± 0,26 <sup>b</sup>  | 2,65 ± 0,34 <sup>b</sup>   | 1,58 ± 0,33 <sup>b</sup>  |
| Con A + Huile de lin     | 4,56 ± 0,73 <sup>a</sup>  | 5,11 ± 0,42 <sup>a</sup>  | 4,93 ± 0,83 <sup>a</sup>   | 5,25 ± 0,38 <sup>a</sup>  |
| Con A + Huile de nigelle | 2,52 ± 0,33 <sup>b</sup>  | 1,72 ± 0,28 <sup>b</sup>  | 2,31 ± 0,55 <sup>b</sup>   | 1,60 ± 0,31 <sup>b</sup>  |
| Con A + Huile d'olive    | 2,46 ± 0,31 <sup>b</sup>  | 1,75 ± 0,34 <sup>b</sup>  | 2,22 ± 0,40 <sup>b</sup>   | 1,64 ± 0,28 <sup>b</sup>  |
| Con A + Vitamine E       | 2,88 ± 0,42 <sup>b</sup>  | 1,57 ± 0,32 <sup>b</sup>  | 2,11 ± 0,28 <sup>b</sup>   | 1,59 ± 0,24 <sup>b</sup>  |

Chaque valeur représente la moyenne ± écart type. AGS : acides gras saturés. La comparaison des moyennes entre les mères témoins et les mères diabétiques, et entre les nouveau-nés témoins et les nouveau-nés de mères diabétiques, à chaque incubation, est réalisée par le test t de student: \* P < 0,01 ; \*\* P < 0,001.

Les multiples comparaisons (entre les différentes incubations dans chaque groupe) sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de la différence significative minimale (LSD, least significant difference) afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes (P < 0,05).

#### **4.4.4. Composition en C18:3 n-3 des phospholipides membranaires chez les mères et leurs nouveau-nés**

Aucune différence significative des teneurs en acides gras C18:3 n-3 au niveau des membranes lymphocytaires n'est marquée entre les témoins et les diabétiques.

En présence de l'huile de lin, les taux des C18:3 n-3 augmentent significativement chez les mères témoins et diabétiques ainsi que chez leurs nouveau-nés comparés aux autres incubations.

#### **4.4.5. Composition en C20:4 n-6 des phospholipides membranaires chez les mères et leurs nouveau-nés**

Les lymphocytes des mères diabétiques montrent une diminution significative des proportions des acides gras C20:4 n-6 en milieu de culture stimulé avec la Con A seule ou en présence de l'huile de lin, l'huile de nigelle, l'huile d'olive et la vitamine E, comparés aux valeurs chez les mères témoins. Cependant, le pourcentage des C20:4 n-6 en présence de l'insuline ne diffère pas chez les mères diabétiques comparées aux témoins. Parallèlement, aucune différence n'est marquée chez les nouveau-nés des deux groupes témoins et diabétiques.

L'incubation en présence de l'huile de nigelle montre une augmentation des pourcentages des acides gras C18:2 n-6 comparé au reste des incubations chez les deux groupes témoins et diabétiques.

#### **4.4.6. Composition en C20:5 n-3 des phospholipides membranaires chez les mères et leurs nouveau-nés**

La composition en C20:5 n-3 des phospholipides membranaires ne diffère pas significativement entre les groupes témoins et diabétiques.

En présence de l'huile de lin, le taux des acides gras C20:5 n-3 au niveau des phospholipides membranaires est augmenté significativement chez les deux groupes témoins et diabétiques comparé aux autres incubations. Ces variations sont observées aussi bien chez les mères que chez les nouveau-nés.

# Discussion

Le diabète gestationnel est un problème majeur de santé publique, une pathologie en pleine croissance et aux lourdes conséquences aussi bien humaines que socio-économiques (Danilack et al., 2015). Cette pathologie voit une augmentation de sa prévalence dans le temps. Elle s'accompagne de complications materno-fœtales à court et à long terme (Schoenaker et al., 2016).

De nos jours, la santé des femmes enceintes occupent une place de choix auprès de bon nombre de pays en voie de développement dont l'Algérie (Touati-Mecheri et al., 2007). C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail de recherche dont l'objectif principal est de déterminer les conséquences du diabète gestationnel sur le statut redox de la femme enceinte diabétique ainsi que son nouveau né dans la région de Tlemcen situé à l'ouest de l'Algérie, et de rechercher des moyens nutritionnels simples pour les corriger.

En dehors de tout état pathologique, l'alimentation, par la qualité et la quantité des nutriments, peut modifier directement l'état nutritionnel et par conséquent la réponse immunitaire dans de nombreuses situations physiologiques tel que la grossesse ainsi que d'autres situations pathologiques liées au dysfonctionnement métabolique comme le diabète (Caimari et al., 2015 ; Demmelmair et al., 2015 ; Spencer et al., 2015). Parmi les nombreux facteurs de la réponse immunitaire, les cytokines semblent actuellement prédominantes dans les interactions entre immunité et nutrition. Ce sont des médiateurs polypeptidiques solubles libérés par des cellules du système réticulo-endothélial. Les cytokines ont des récepteurs partout et des actions multiples (Biswas et al., 2015).

Les acides gras modifient la réponse immunitaire en changeant les propriétés de la membrane des lymphocytes et le nombre des récepteurs, en modifiant la production des leucotriènes (qui participent à cette réponse), en interférant sur la réactivité des cellules immunitaires. De plus, on sait que les prostaglandines et la thromboxane dérivent de l'acide arachidonique alimentaire. Or elles permettent la synthèse des leucotriènes, qui modulent l'activité immunitaire (Qin et al., 2015).

L'idée que les acides gras polyinsaturés (AGPI) de la famille oméga-3 diminuent les fonctions des cellules inflammatoires est interprétée dans un sens favorable, avec la conclusion qu'ils sont anti-inflammatoires et seront donc bénéfiques pour la santé (Su, 2015).

Plusieurs études expérimentales menées in vitro, sur des lymphocytes d'origine animale ou d'origine humaine, et in vivo chez l'animal et l'homme ont permis de

mettre en évidence un effet immunomodulateur des acides gras. L'addition d'AGPI au milieu de culture de cellules immunitaires ou la supplémentation des régimes alimentaires par des AGPI influence divers paramètres de la réponse immunitaire, notamment la réponse proliférative des lymphocytes aux mitogènes (Rodacki et al., 2015). C'est dans ce contexte que notre travail de thèse comporte une partie orientée vers la recherche des effets de certaines acides gras poly insaturés (AGPI) présents dans les huiles sur la prolifération lymphocytaire et le statut redox intracellulaire des lymphocytes au cours du diabète gestationnel. L'ensemble de ces caractéristiques n'a pas été réuni dans la littérature sur le sujet, notamment en Algérie, ce qui confère à ce travail une certaine originalité.

Notre travail repose sur une étude « cas-contrôle ». Le recrutement des cas diabétiques est un problème important relié à la nature même de la condition étudiée qui n'est susceptible d'être rencontrée que chez un nombre limité des femmes enceintes. Cette étude a été réalisée dans un centre de référence (service de gynécologie obstétrique de l'Etablissement Hospitalier Spécialisé Mère-Enfant du Centre Hospitalo-universitaire de Tlemcen) pour les grossesses à risque. Le recrutement des cas et des témoins s'est fait selon une méthodologie correcte puisque le lieu de recrutement, la période dans le temps et le lieu des différents examens ont été rigoureusement identiques pour les patientes diabétiques et les témoins. L'effectif de l'échantillon est de 40 femmes diabétiques au troisième trimestre de gestation (37-40 semaines) comparées à 80 femmes témoins exemptes de toute pathologie métabolique. Les deux groupes de femmes enceintes, appartiennent à la même tranche d'âge, et ont un indice de masse corporelle (IMC) similaire. L'âge des parturientes compris entre 20 et 30 ans constitue pour certains auteurs un facteur de mauvais pronostic fœtal. Cette tranche d'âge est prépondérante dans notre population et un grand pourcentage des complications sont relevées chez les nouveau-nés de mères appartenant à ce groupe (Wing et al., 2008).

La première partie de ce travail consiste en une étude *in vivo* afin d'analyser les conséquences du diabète gestationnel sur le métabolisme et le statut oxydant/antioxydant des femmes enceintes ainsi que leurs nouveau nés comparés au groupe de mères et nouveau-nés témoin.

Nos résultats ne montrent aucune différence significative des taux plasmatiques de triglycérides et de cholestérol chez les mères diabétiques et leurs nouveau-nés comparés à leurs témoins respectifs. Toutefois, on observe de fortes concentrations de

glucose plasmatique à jeun chez les mères diabétiques par rapport aux témoins. Cette hyperglycémie est une caractéristique du diabète sucré et existe chez les femmes enceintes dont le diabète n'est pas équilibré (Cho et al., 2015 ; Makeba, 2008). Nos résultats concordent avec ceux de Buchanan et al. 2007 qui notent une hyperglycémie associée à des taux lipidiques normaux au cours du diabète gestationnel. De plus, aucune différence significative n'a été marquée concernant les paramètres hématologiques, sauf pour le nombre de lymphocytes qui est réduit et le taux d'HbA1c qui augmente significativement chez les mères diabétiques comparées à leurs témoins. Les concentrations élevées en HbA1c chez les mères diabétiques est un signe du mauvais contrôle du diabète. L'hémoglobine glyquée est devenue un paramètre essentiel pour le suivi du patient diabétique. Sa mesure est maintenant utilisée pour révéler le niveau de contrôle glycémique du patient sur une longue période et estimer le risque de développement de complications .

L'hyperglycémie maternelle conduit directement à l'hyperglycémie fœtale puisque le glucose est transporté à travers le placenta vers le fœtus. Cette hyperglycémie fœtale est responsable de la macrosomie fœtale observée dans certains cas de diabète gestationnel (Alsammani et Ahmad, 2012). Cependant, dans notre étude, le poids de naissance des nouveau-nés est similaire dans les deux groupes. De plus, les nouveau-nés de mères diabétiques ont une glycémie normale. Ceci montre que plusieurs facteurs, autre que la glycémie maternelle, peuvent provoquer la macrosomie fœtale, comme par exemple les facteurs génétiques, l'hyperlipidémie ou anomalies hormonales.

Les niveaux inférieurs de la glycosylation d'hémoglobine au niveau du sang de cordon ombilical comparée à celle de l'hémoglobine maternelle est le résultat direct de plusieurs facteurs, notamment la courte vie de globules rouges fœtaux comparés à celle des érythrocytes maternels, l'acétylation de l'hémoglobine fœtale à l'extrémité N-terminale de la chaîne gamma, le niveau de glucose fœtal inférieur à celui de la mère qui maintient un gradient materno-fœtal (Cho et al., 2015). Néanmoins, les nouveau-nés de mères diabétiques présentent des taux élevés d'HbA1c comparés aux nouveau-nés témoins. Certains auteurs ont montré l'existence d'une forte corrélation entre l'HbA1c et le devenir néonatal en particulier en terme d'hypoglycémie après la naissance ou les conséquences à long terme (Legardeur et al., 2011).

Dans notre travail, aucune différence significative n'est notée concernant les taux plasmatiques de cholestérol, de triglycérides, LDL-C et HDL-C chez les femmes

enceintes diabétiques par rapport à ceux observés chez les témoins. La même observation est notée chez les nouveau-nés avec des concentrations lipidiques similaires entre les deux groupes. Plusieurs études ont aussi montré des similitudes concernant les paramètres lipidiques et lipoprotéiques entre les mères atteintes de diabète gestationnel ainsi que chez leurs nouveau-nés comparés aux témoins (Akinci et al., 2011 ; Lauenborg, 2005 ; Marseille-Tremblay, 2008 ; Sokup et al., 2012 ; Vitoratos et al., 2002).

Par contre, les résultats de Merzouk et al. (2000) montrent une augmentation significative des taux sériques des triglycérides et du cholestérol total des nouveau-nés des mères diabétiques comparés aux témoins. Ces différences peuvent être expliquées par le fait que, dans l'étude de Merzouk et al. (2000), les mères diabétiques avaient des nouveau-nés macrocosmiques, signe de la présence d'un diabète plus grave.

Concernant les marqueurs de la fonction rénale (urée, créatinine et acide urique), nos résultats ne montrent aucune différence significative chez les mères diabétiques comparées aux mères témoins. Ces résultats sont en accord avec Monnier et Colette. (2010) qui indiquent, que dans la population diabétique, les concentrations en urée et créatinine plasmatiques étaient inchangées, signe d'une fonction rénale normale.

Par ailleurs, l'hyperglycémie ainsi que les autres troubles métaboliques liés au diabète peuvent induire un stress oxydatif qui correspond à un déséquilibre entre la production des radicaux libres et les défenses antioxydantes (Ayaz et al., 2015 ; Monnier et al., 2007).

La grossesse est un état physiologique qui s'accompagne d'une forte demande d'énergie et d'une exigence accrue d'oxygène (Hracsko et al., 2007). Des niveaux élevés de stress oxydatif sont consécutifs à l'apport et l'utilisation accrue de l'oxygène. Les preuves suggèrent des niveaux élevés de stress oxydatif pendant la grossesse normale en comparaison avec des femmes non enceintes (Ademuyiwa et al., 2007). Les radicaux libres font partie intégrante du fonctionnement de l'organisme et jouent un rôle important, notamment pour la reproduction, la nidation de l'œuf fécondé et le développement de l'embryon (Gabbe et Niebyl, 2002). En effet, les phénomènes radicalaires sont impliqués dans la multiplication, la différenciation, la croissance et le fonctionnement des différents types de cellules. Ils jouent un rôle très important pendant la gestation. Mais un déséquilibre entre leur production, intense pendant la

gestation, et leur élimination peut engendrer un stress oxydant. Ce dernier peut conduire à l'altération de l'organisme de la mère et de son fœtus (Myatt et Cui, 2004). Les antioxydants sont énormément importants dans le maintien de la fonction cellulaire pendant la grossesse normale. Ils inhibent la peroxydation lipidique, protégeant ainsi les enzymes, les protéines et l'intégrité cellulaire (Al-Gubory et al., 2010). Physiologiquement, au cours d'une grossesse normale, des mécanismes de protection contre la production des radicaux libres et leur toxicité existent et augmentent au cours du temps afin de protéger le fœtus (Myatt et Cui, 2004). Pour cela, le stress oxydatif reste difficile à mettre en évidence puisque l'augmentation des pro-oxydants est suivie d'une élévation des antioxydants de façon à garder l'équilibre. Cependant, chez les femmes enceintes diabétiques, des modifications importantes de l'équilibre oxydant/antioxydant existent au cours de la grossesse. L'évaluation du stress oxydatif est donc primordiale par la mesure des marqueurs adaptés aux phénomènes pathologiques qui peuvent apparaître au cours de la grossesse.

Nos résultats indiquent une diminution du pouvoir antioxydant total (ORAC) chez les mères diabétiques par rapport aux témoins. Nos résultats peuvent s'expliquer par une défaillance du système de défense antioxydant et/ou une élévation de la production des radicaux libres comme précédemment observés chez les adultes diabétiques (Merzouk et al., 2004). Cette étude montre également que les patients diabétiques ont une protection antioxydante significativement déficiente susceptible d'augmenter leur vulnérabilité aux dommages oxydatifs et de favoriser le développement de complications diabétiques.

Pour se défendre des effets délétères des radicaux libres, l'organisme humain possède une variété de système de protection, capable de neutraliser ou dégrader les ROS. Les systèmes antioxydants sont soit des molécules qui captent rapidement les ROS (antioxydants proprement dits), soit des systèmes enzymatiques qui catalysent la conversion des molécules pro-oxydantes.

Concernant les marqueurs de la défense antioxydante, nous avons mesuré le taux de la vitamine C, l'activité de la catalase et le glutathion réduit dont les valeurs sont faibles chez les mères diabétiques comparées aux témoins ainsi que chez leurs nouveau-nés comparés aux témoins. Le statut en vitamine C dépend de l'interaction entre la consommation alimentaire de cette vitamine et les concentrations plasmatiques d'insuline et de glucose (Abraham et Kappas, 2005). Ainsi, la diminution de la vitamine C au cours du diabète peut être la conséquence d'une réduction de la

captation cellulaire de l'acide ascorbique, puisque le glucose (qui se trouve en excès) entre en compétition avec l'acide ascorbique, et d'une augmentation d'excrétion urinaire de l'acide ascorbique ainsi qu'une réduction de la concentration du glutathion indispensable à la régénération enzymatique de l'acide ascorbique à partir du déhydrOscorbate (Violi et Cangemi, 2005). Les faibles teneurs plasmatiques en vitamine C peuvent être en faveur de son utilisation accrue, suggérant des besoins importants afin de réduire le stress oxydatif chez les mères diabétiques. D'un autre côté, ceci peut refléter une consommation réduite en cette vitamine ou d'une réduction de sa captation cellulaire due à l'hyperglycémie.

La catalase est l'enzyme spécialisée dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène et sa transformation en oxygène et une molécule d'eau. Nos résultats révèlent une diminution significative de l'activité de la catalase érythrocytaire chez les mères diabétiques et chez leurs nouveau-nés par rapport aux témoins. Ces résultats sont en accord avec ceux de plusieurs auteurs qui décrivent une diminution de l'activité de la catalase érythrocytaire chez les diabétiques (Merzouk et al., 2004).

Le glutathion réduit est un autre marqueur pris en considération pour évaluer le statut antioxydant. Il joue un rôle multifactoriel dans le mécanisme de la défense antioxydante. Le glutathion est un tripeptide, formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Le glutathion a une forte capacité de donneur d'électrons combinée à une concentration intracellulaire élevée qui lui confèrent un grand pouvoir de réduction, lui permettant de prendre une part active dans la destruction des composés oxygénés réactifs. C'est le principal antioxydant hydrosoluble dans les cellules avec de fortes propriétés enzymatiques de cofacteur (Orhan et al., 2003 ; Patil et al., 2006 ; Shekhar, 2004). Nos résultats montrent une différence significative des teneurs érythrocytaires en GSH chez les mères diabétiques ainsi que chez leurs nouveau-nés comparés à leurs témoins respectifs, en faveur d'une réduction de la défense antioxydante. Ces résultat concordent avec ceux de plusieurs travaux (Ademuyiwa et al., 2007 ; Biri et al., 2006).

Le stress oxydatif chez les diabétiques est lié à la résistance à l'insuline (Merzouk et al., 2004 ; Tinahones et al., 2008) et il est considéré comme un mécanisme important à l'origine des lésions des cellules  $\beta$  dans le diabète type 2 (Lupi et al., 2007). Ces cellules, seraient particulièrement vulnérables au stress oxydatif, en raison d'une faible expression d'enzymes anti-oxydantes, comme la catalase et la glutathion peroxydase.

L'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) est une espèce oxygénée réactive qui réagit rapidement avec le monoxyde d'azote (NO) dans le système vasculaire pour produire du peroxyde d'azote ayant des effets destructeurs sur les biomolécules à fortes doses. Nos résultats montrent une augmentation très significative des taux érythrocytaires en anion superoxyde chez les mères diabétiques comparées aux mères témoins. L'hyperglycémie maternelle favorise la production des anions superoxyde (Beucher et al., 2010). De plus, les nouveau-nés de mères diabétiques présentent aussi une augmentation des anions superoxyde, en faveur d'une augmentation de la production des radicaux libres.

Les espèces réactives de l'azote sont associées à l'arthrite, au diabète, à de nombreuses maladies dégénératives neuronales, au cancer et à l'athérosclérose. Le NO est un médiateur clé dans de nombreuses fonctions importantes, y compris la régulation du tonus vasculaire des muscles lisses, de la pression artérielle, l'activation plaquettaire et la signalisation des cellules vasculaires (Guzik et al., 2002 ; Weitzberg et al., 2010). Le NO, une des plus petites molécules gazeuses connues, est synthétisé à partir d'un substrat, la L-arginine, sous l'action d'une famille d'enzymes, les NO-synthases (NOS). Ces dernières ont été identifiées durant la grossesse à différents niveaux de l'unité fœto-maternelle (utérus, placenta, vaisseaux ombilicaux...). Nos résultats montrent une augmentation significative des concentrations érythrocytaires en NO chez les mères diabétiques comparées aux témoins.

Les radicaux libres sont difficiles à mesurer à cause de leur grande instabilité. Ainsi, les produits de la peroxydation lipidique sont utilisés comme un indicateur fiable de l'activité des radicaux libres (Chaudhari et al., 2003).

La peroxydation lipidique est un processus qui se produit dans toutes les cellules et les tissus. Elle implique la conversion des acides gras insaturés en hydroperoxydes lipidiques. Ce processus est initié par des radicaux libres. L'organisme possède des mécanismes antioxydants qui limitent ce processus. Par ailleurs, des concentrations faibles en peroxydes lipidiques peuvent agir en tant que messagers intracellulaires (Vijayalakshmi et al., 2010). Les marqueurs de la peroxydation lipidique (MDA) augmentent au cours de la grossesse normale (Patil et al., 2006).

Les teneurs en MDA érythrocytaires sont élevées chez les mères diabétiques et leurs nouveau-nés par rapport à leurs témoins respectifs, indiquant l'existence d'un stress oxydatif intracellulaire élevé chez les mères diabétiques et leurs nouveau-nés. Nos

résultat sont en accord avec ceux d'autres auteurs (Kocić et al., 2007 ; López-Tinoco et al., 2013 ; Orhan et al., 2003).

Les protéines carbonylées sont considérées comme les marqueurs de l'oxydation des protéines. Les protéines carbonylées sont des molécules chimiquement stables. Cette caractéristique les rend facile à détecter (Jamel et al., 2010). Une augmentation significative des teneurs en protéines carbonylées érythrocytaires est observée chez les mères diabétiques comparées aux témoins. Ces teneurs érythrocytaires sont aussi significativement augmentées chez les nouveau-nés de mères diabétiques comparées à leurs témoins. Ces résultats marquent l'existence d'un stress oxydatif intracellulaire évident avec oxydation des protéines chez les diabétiques et leurs bébés. Ces données sont en accord avec ceux d'études précédentes qui montrent que les teneurs en protéines carbonylées augmentent au cours du diabète (Merzouk et al., 2004 ; Vincent et al., 2007 ; Zhuang et al., 2014). L'oxydation des protéines est un signe de l'endommagement tissulaire, causé par le stress oxydatif, l'augmentation du taux des carbohydrates ou les deux (Wadley et al., 2016).

L'hyperglycémie induit une augmentation de l'oxydation des protéines chez les diabétiques. Cette augmentation serait susceptible de contribuer au développement des complications vasculaires liées au diabète (Vincent et al., 2007).

La deuxième partie de cette thèse de doctorat est consacrée à l'étude des effets des acides gras poly insaturés (AGPI) contenus dans trois huiles, l'huile de lin , de nigelle et d'olive, à une concentration de 30  $\mu$ M, sur la fonction proliférative des cellules T isolées des femmes enceintes atteintes d'un diabète gestationnel ainsi que leurs nouveau-nés, cultivées in vitro en présence d'un agent mitogène la concanavaleine A, et/ou l'insuline, et sur la variation des marqueurs du statut oxydant/ antioxydant intracellulaire

Le suivi in vitro de la prolifération cellulaire et de la production des cytokines sont largement utilisés et sont considérés comme des techniques indispensables afin de déterminer la réponse immunitaire suite à l'exposition des cellules à différentes concentrations d'acides gras issus de différentes huiles.

Les lymphocytes sont isolés à partir du sang maternel ou du sang de cordon ombilical grâce à l'histopaque et sont mis en culture dans le milieu RPMI contenant tous les nutriments nécessaire pour permettre la survie cellulaire. L'utilisation de la concanavaleine A (Con A), agent mitogène spécifique des lymphocytes T, permet d'activer seulement la prolifération des cellules T. L'insuline est aussi considérée

comme un agent activant la prolifération des lymphocytes *in vitro*. L'insuline induit une augmentation de l'entrée du glucose, du transport des acides aminés, du métabolisme lipidique et de la synthèse des protéines et favorise donc l'activation et la réponse des lymphocytes. Il est à noter qu'en présence de Con A et d'insuline, les lymphocytes isolés des femmes enceintes diabétiques prolifèrent moins que ceux isolés des femmes témoins. De la même façon, la prolifération *in vitro* des lymphocytes activés est réduite chez les nouveau-nés de mères diabétiques comparés aux nouveau-nés témoins. Des études antérieures ont signalé une diminution de cellules T naïves dans les grossesses diabétiques (Mahmoud et al., 2012). Les nouveau-nés de mères diabétiques ont un taux de lymphocytes NK réduit par rapport aux valeurs normales (Lapolla et al., 2005).

Nos résultats montrent que la prolifération des cellules T *in vitro* augmente significativement en présence de l'agent mitogène (Con A). Cette augmentation est accentuée en présence d'insuline. En effet, il a été démontré que les lymphocytes possèdent sur leurs membranes un récepteur appelé IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor) qui est considéré comme un récepteur contrôlant la croissance cellulaire, la prolifération et la différenciation cellulaire. La liaison de l'insuline à son récepteur induit l'autophosphorylation du récepteur sur les tyrosines, ce qui stimule l'activité tyrosine kinase du récepteur envers des substrats intracellulaires et empreinte plusieurs voies de signalisation comme la voie de MAP kinases (Smith, 2010).

La mesure de la production des cytokines est précédemment utilisée dans différentes études comme un moyen efficace pour détecter la présence des différents types de lymphocytes, Th1 ou Th2. Les cellules Th1 sont principalement responsables de la défense cellulaire par le phénomène de la phagocytose, et ces cellules sont les effecteurs de l'immunité cellulaire, provoquant une réaction d'hypersensibilité de type retardé et l'inflammation chronique par l'intermédiaire des cytokines Th1 (IL-2, INF $\gamma$ ). Les lymphocytes Th2 sont responsables de la défense immunitaire humorale avec recrutement des éosinophiles, provoquant des réactions allergiques par l'intermédiaire des cytokines Th2 (IL4). Ces cytokines de type Th2 sont considérées comme anti-inflammatoires. Dans notre étude, la présence de Con A et d'insuline dans le milieu de culture induit une augmentation de la sécrétion de l'IL-2 et de l'IL-4 aussi bien par les lymphocytes isolés du groupe témoin et du groupe diabétiques. Cependant, le rapport IL-2/IL-4 diminue en présence d'insuline qui semble avoir

généraliser le type Th2, ceci est en accord avec les études précédentes (Viardot et al., 2007). Nous avons aussi observé que la production d'IL-4 par les cellules T stimulées par le mitogène est normale alors que la production d'IL-2 est réduite chez les mères diabétiques et leurs nouveau-nés par rapport à leurs témoins respectifs. Nos résultats sont en accord avec d'autres études montrant que le diabète gestationnel provoque la diminution de la prolifération des lymphocytes ainsi que de la sécrétion d'IL-2 par rapport à la grossesse normale (Lapolla et al., 2005 ; Mahmoud et al., 2005; Mahmoud et al., 2012). En présence d'insuline, la sécrétion de l'IL-2 est toujours réduite chez les diabétiques par rapport aux témoins, par contre celle de l'IL-4 devient plus importante chez les mères diabétiques versus mères témoins. La modulation de la sécrétion lymphocytaire des cytokines en présence d'insuline est en accord avec les constatations antérieures (Smith, 2010).

Notre étude met en relief l'effet modulateur des huiles sur la fonction lymphocytaire aussi bien chez les mères et nouveau-nés témoins que chez les diabétiques (Djelti et al., 2015).

L'effet immuno-modulateur des acides gras peut se traduire par une immunosuppression ou par une immunostimulation de la prolifération lymphocytaire et de la production des cytokines et/ou de l'homéostasie entre les lymphocytes Th1 (cellules à médiation immunitaire) et les lymphocytes Th2 (cellules à réponse humorale). De plus, pour certains auteurs, les acides gras peuvent induire une augmentation des radicaux libres dans les lymphocytes provoquant un stress oxydatif intracellulaire (Campoio et al., 2011 ; Kiecolt-Glaser et al., 2013 ; Schönfeld et al., 2010).

Les lymphocytes T sont responsables de la réponse immunitaire cellulaire spécifique, qui vise à détruire les cellules pathogènes, que ça soit des bactéries ou des cellules cancéreuses. La structure globale des lymphocytes T est identique. Ces cellules se distinguent par leurs TCR toujours accompagné du cluster de différenciation CD3, ainsi que du CD4 ou du CD8 suivant le lymphocyte considéré. Les TCR sont des récepteurs membranaires caractéristiques des lymphocytes T. Les clusters de différenciation sont des molécules associées au TCR et ayant des fonctions complètement différentes les uns des autres. Le complexe protéique CD3, toujours associé au TCR, est indispensable à l'expression du récepteur. Le CD4, protéine monomérique membranaire, est exprimé par certains lymphocytes T (T-CD4). Le CD8, protéine hétéro-dimérique membranaire, est aussi exprimé par certains

lymphocytes (T-CD8). Les T-CD8 évoluent vers les lymphocytes cytotoxiques, alors que les T-CD4 donnent les lymphocytes helper (Th ou auxiliaires) qui ont un rôle de régulation de la réponse immunitaire adaptative par activation d'autres cellules immunitaires. Ils agissent par interactions cellules-cellules ainsi que par des cytokines. Les lymphocytes Th activés présentent une hétérogénéité fonctionnelle, avec différents profils de sécrétion cytokinique. Les lymphocytes Th1 sécrètent majoritairement des cytokines pro-inflammatoires, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  et IL-2 et induisent les réponses immunes cellulaires les plus efficaces contre les virus et bactéries. Les Th2, avec une sécrétion majoritaire d'IL-4, IL-5 et IL-13, soutiennent la différenciation des lymphocytes B pour la production d'anticorps (Zabrodski et al., 2015).

Les effets des acides gras polyinsaturés (AGPI) ont été énormément étudiés sur les cellules mononucléaires. Il a été démontré que le DHA, EPA, l'acide oléique, et l'acide linoléique inhibent *in vitro* la prolifération des lymphocytes stimulés par des mitogènes. Cette inhibition dépend de la concentration et du degré d'insaturation de l'acide gras utilisé. Les acides gras les plus inhibiteurs sont de la série n-3 (Akadiri et al., 2015 ; Calder, 2006).

Nos résultats montrent que les AGPI de l'huile de lin ou de Nigelle ont des effets modulateurs importants sur la fonction des cellules T *in vitro*, avec un profil cinétique similaire chez les lymphocytes de la mère et du nouveau-né. L'effet immunomodulateur de l'huile d'olive n'était pas évident concernant la prolifération des lymphocytes maternels et fœtaux ainsi que la sécrétion de cytokines mais on a remarqué une réduction significative du stress oxydatif intracellulaire.

Les lymphocytes isolés de femmes témoins ou diabétiques ainsi que leurs nouveau-nés en présence des AGPI de l'huile de lin prolifèrent moins que ceux des lymphocytes sous influence des AGPI des autres huiles (Nigelle et olive). Ces effets peuvent être liés à l'enrichissement des membranes des cellules T en AGPI n-3 dont les effets immunosuppresseurs sont bien connus notamment au cours du diabète gestationnel (Dasilva et al., 2015 ; Khan et al., 2006 ; Rosa et al., 2010 ; Wallace et al., 2003 ; Zhao et al., 2015).

La diminution de la prolifération lymphocytaire en présence de l'huile de lin est en accord avec les données antérieures montrant que les AGPI n-3 réduisent significativement la prolifération des lymphocytes en présence d'un mitogène (Calder, 2001 ; Kaithwas et Majumdar, 2013 ; Thies et al., 2001; Stulnig, 2003). Les

effets immunosuppresseurs des AGPI n-3 sur la prolifération des lymphocytes du sang de cordon ombilical sont apparemment similaires à ceux obtenus par les lymphocytes des femmes enceintes et en accord avec les études précédentes (Gold et al., 2006).

L'explication possible des effets inhibiteurs de l'huile de lin peut être due à la réduction de la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes stimulés, sachant que l'IL-2 est requise pour la prolifération des lymphocytes T (Park et al., 2011; Jang et al., 2014), ou bien l'effet immunosuppresseur peut être dû à un changement potentiel de la production de l'acyl-CAO binding protein, protéine intracellulaire liant les AGPI et contrôlant leur métabolisme au niveau des lymphocytes T (Collison et al., 2005).

L'huile de lin contient essentiellement de l'acide  $\alpha$ -linoléinique (ALA, C18:3 n-3) (Corino et al., 2014). Certaines études sur les avantages de l'huile de lin impliquent l'acide ALA dans l'inhibition de la synthèse des cytokines pro inflammatoires et la stimulation de la production de cytokines anti-inflammatoires (Cohen et al., 2005). L'acide ALA subit une série de réactions d'élongation et de désaturation pour donner l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) qui ont démontré leur vertu sur la modulation du système immunitaire en inhibant la production de cytokines pro inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), et ont aussi un effet modulateur de la sensibilité des cellules à l'insuline (Vijaimohan et al., 2006). Certains auteurs ont suggéré que l'activation de la phospholipase D peut être responsable de l'effet antiprolifératif du DHA dans les cellules lymphoïdes et que la surexpression de la phospholipase D dans les cellules T inhibe l'expression de l'ARNm des IL-2 (Diaz et al., 2005). D'autres études ont montré que l'EPA et DHA inhibent la prolifération lymphocytaire en inhibant l'activité de la MAP kinase (Denys et al., 2002). L'immunomodulation induite par l'huile de lin peut être appliquée dans l'amélioration des désordres inflammatoires, comme les maladies auto-immunes, pourtant, les mécanismes participants à ces processus ne sont pas encore bien compris. Il est probable que la modulation du système immunitaire par les AGPI n-3 peut avoir lieu par l'altération de la fluidité membranaire, la formation de peroxyde lipidique, la libération du calcium, la production des eicosanoïdes ou la régulation de l'expression génique (Shaikh et Edidin, 2006).

Dans notre travail, l'huile de Nigelle a induit une augmentation significative de la prolifération des lymphocytes avec une augmentation apparente de la sécrétion d'IL-2 chez les deux groupes témoins et diabétiques. L'huile de Nigelle riche en acide

linoléique (LA, famille n-6) semble avoir généré un phénotype Th1 puisque les niveaux d'IL-4 n'ont pas changé alors que les niveaux d'IL-2 ont augmenté. Le rapport IL-2/IL-4 est significativement plus important en présence de l'huile de Nigelle en faveur d'un profil Th1. Nos résultats sont en accord avec les études précédentes qui montrent l'immuno-stimulation en présence des AGPI de l'huile de Nigelle (El Kadi et al., 1990 ; Meziane et al., 2014 ; Salem, 2005 ; Wang et al., 2011). Cependant, d'autres études suggèrent que l'huile de Nigelle peut avoir un effet immunosuppresseur puisqu'elle a prouvé son efficacité dans le traitement de l'allergie (Shahzad et al., 2009). L'acide LA est métabolisé en acide arachidonique (AA), le précurseur de eicosanoïdes pro-inflammatoires, telles que, principalement, la prostaglandine E2 (PGE2), thromboxane A2 (TXA2) et les leucotriènes B4, alors que l'acide  $\alpha$ -linoléique (ALA) est métabolisé en EPA et le DHA, qui sont des précurseurs des eicosanoïdes anti-inflammatoires, tels que PGE3 et PGF3 (Rosa et al., 2010).

L'huile d'olive n'a eu aucun effet sur la prolifération des lymphocytes et sur la production de cytokines chez les deux groupes témoins et diabétiques. Des études antérieures n'ont pas trouvé de différences significatives de la prolifération des lymphocytes humains ou animaux ayant un régime riche en huile d'olive (De Pablo et al., 2004 ; Kontogianni et al., 2013 ; Yaqoob et al., 1998 ). Les mêmes résultats ont été observés avec l'huile d'olive in vitro et qui ne montrent aucun effet sur la prolifération des lymphocytes et la production d'IL-2 (Granato et al., 2000).

En présence d'huile d'olive, les concentrations en acide oléique (AO, C18:1 n-9) sont augmentées tandis que les taux des acides gras saturés diminuent au niveau des membranes lymphocytaires chez tous les groupes. Nos résultats montrent que le niveau élevé de C18:3 n-3 dans l'huile de lin induit une augmentation des acides gras C18:3 n-3 et C20:5 n-3 avec une diminution simultanée des acides gras C18:1 n-9 et C20:4 n-6 dans les phospholipides des membranes lymphocytaires des mères et de leurs nouveau-nés.

Des niveaux élevés d'acide AL et acide AO dans l'huile de Nigelle induit une augmentation en acides AL, AO et AA avec une diminution concomitante des acides gras saturés des phospholipides au niveau des membranes. Des études antérieures ont montré une corrélation significative entre la fonction lymphocytaire et l'acide oléique présent dans les phospholipides des membranes des lymphocytes (Moussa et al., 2000).

L'effet immunosuppresseur en présence d'huile de lin peut être également dû à l'épuisement de l'acide AA des phospholipides membranaires comme observé dans notre étude puisque l'activation des cellules T et leur métabolisme impliquent la libération de l'acide AA (Shaikh et Edidin, 2006). De même, l'activation de la prolifération lymphocytaire par l'huile de Nigelle pouvait être liée à l'enrichissement de la membrane en l'acide AO et l'acide AA.

Toutefois, concernant les résultats des cultures lymphocytaires en présence de l'huile d'olive, en dépit de la présence d'acides gras polyinsaturés dans le milieu de culture, ces derniers n'agissent pas directement sur la prolifération des lymphocytes.

Comme les huiles alimentaires sont généralement riches en vitamine E, nous avons aussi testé les effets de cette vitamine sur la prolifération lymphocytaire et sur la sécrétion des cytokines *in vitro*. Dans l'ensemble, la vitamine E stimule la prolifération des lymphocytes et la sécrétion de l'IL-2 sans modification de celle de l'IL-4 chez les mères et leurs nouveau-nés aussi bien dans le groupe témoin et le groupe diabétique. Le rapport IL-2/IL-4 est augmenté de façon significative en présence de la vitamine E chez les mères des deux groupes, mais de façon non significative chez leurs nouveau-nés. La vitamine E semble induire un phénotype Th1 chez les mères. Ces résultats sont en accord avec les travaux précédents montrant le rôle de la vitamine E dans la stimulation de la prolifération cellulaire, la réduction de l'apoptose, l'amélioration de la fluidité membranaire et la protection des cellules (Atkinson et al., 2008).

Dans cette étude, les résultats des marqueurs de statut redox lymphocytaire prouvent la présence d'un stress oxydatif intracellulaire dans le cas de diabète gestationnel. Ce dernier peut être corrigé par la supplémentation en huiles.

Les niveaux de GSH lymphocytaire, SOD et catalase sont significativement réduits au niveau des lymphocytes des mères diabétiques et leurs nouveau-nés par rapport aux témoins. Ces résultats reflètent une diminution de la défense antioxydante dans le cas du diabète gestationnel, et ils sont en accord avec les études antérieures (Djordjevic et al., 2004 ; Biri et al., 2006 ; Lappas et al., 2011).

Le taux de MDA et les teneurs en protéines carbonylées augmentent significativement dans les lymphocytes de mères diabétiques et leurs nouveau-nés résultant probablement d'une surproduction de radicaux libres et la perturbation du système d'évacuation. Nos résultats concordent avec ceux rapportés dans des études

antérieures montrant un déséquilibre du statut pro et antioxydant dans le diabète gestationnel (Djordjevic et al., 2004 ; Lappas et al., 2011).

Nos résultats montrent que le taux de MDA et de protéines carbonylées diminuent tandis que les activités de la SOD et de la catalase augmentent dans les lymphocytes cultivés en présence de l'huile de lin chez les groupes témoins et diabétiques, en faveur d'une réduction des oxydants et une augmentation de la défense antioxydante par l'huile de lin. De plus, aucun changement dans les niveaux de GSH n'a été observé dans les cellules T témoins cultivés en présence d'huile de lin. Toutefois, chez mères diabétiques et leurs nouveau-nés, l'addition des acides gras issus de l'huile de lin dans la culture a induit une augmentation des niveaux de GSH lymphocytaire.

Nous avons observé qu'en présence d'huile de lin, l'état redox lymphocytaire du groupe diabétique se modifie pour atteindre les valeurs contrôles. Il a été suggéré que l'huile de lin améliore le statut redox de cellules T au cours du diabète gestationnel en favorisant l'expression des enzymes antioxydante (Jangale et al., 2013).

Des résultats similaires ont été obtenus dans des études antérieures montrant que l'huile de lin renforce la capacité antioxydante de cellules issues de rats diabétiques (Hussein et al., 2012). De plus, l'huile de lin réduit le taux de MDA et de glutathion oxydé dans les érythrocytes de diabétiques (Yang et al., 2012).

En présence des huiles de Nigelle et d'olive, le statut oxydant/ antioxydant a également été amélioré dans les lymphocytes de mères diabétiques et leurs nouveau-nés.

En fait, les huiles de Nigelle et d'olive ont induit une réduction significative dans les niveaux de protéines carbonyles et de MDA des lymphocytes avec une augmentation significative des taux de GSH et des activités de la SOD et de la catalase lymphocytaires dans le cas de diabète gestationnel. Nos résultats sont en accord avec des rapports antérieurs indiquant les effets bénéfiques d'huile de Nigelle et d'huiles d'Olive sur le stress oxydatif (Aftab et al., 2013 ; Covas et al., 2006 ; Salem, 2005). L'huile de Nigelle empêche la peroxydation lipidique et augmente l'activité du système de défense antioxydant. L'huile d'olive a nettement restauré le statut antioxydant en diminuant la quantité des pro-oxydants induit par le diabète dans les tissus. Il est intéressant de noter que la sensibilité des lymphocytes des nouveau-nés aux huiles utilisées était similaire et parallèle à celles des lymphocytes maternels. Les acides gras issus des huiles de lin, olive et Nigelle avaient alors des effets bénéfiques aussi bien sur les lymphocytes des mères que sur les lymphocytes de leurs nouveau-nés.

Il a été démontré que l'oxydation des macromolécules cellulaires peut induire l'apoptose et la nécrose cellulaire (Yang et al., 2012). La présence du stress oxydatif peut inhiber l'activation des récepteurs de l'insuline ou diminuer la translocation du transporteur de glucose-4 (GLUT-4) sur la membrane cellulaire (Justin et al., 2011). Les différentes huiles utilisées (lin, olive et Nigelle) peuvent avoir des effets protecteurs contre les dommages cellulaires et des effets bénéfiques sur la sensibilité à l'insuline dans le cas diabète gestationnel et ceci par le piégeage des radicaux libres et l'augmentation de la capacité anti-oxydante de l'organisme.

Le stress oxydatif a été relié à l'hyperglycémie, l'insulinorésistance et la sécrétion anormale de nombreuses cytokines (Yan, 2014 ; Zhuang et al., 2014).

De plus, les effets des AGPI sur le stress oxydatif paraissent de plus en plus évidents, passant par la modulation des activités des enzymes anti-oxydantes et de la production des cytokines, la régulation des gènes et l'amélioration des systèmes de défense antioxydants de l'organisme (Merzouk et al., 2008).

L'augmentation de la formation des ROS contribue au développement de plusieurs pathologies telles que le diabète gestationnel (Shang et al., 2015).

D'un autre côté, des résultats précédents ont montré que les teneurs en protéines carbonylées et en MDA des cellules T stimulées par la Con A ou l'insuline peuvent augmenter en présence d'acides gras issus des différentes huiles (Campoio et al., 2011 ; Merzouk et al., 2004). Ceci indique que les acides gras *in vitro* peuvent se comporter comme des substrats de lipoperoxydation en augmentant l'action oxydante des radicaux libres sur les protéines et les lipides des cellules T. Les acides gras polyinsaturés présents dans les phospholipides des membranes cellulaires sont des molécules très sensibles à l'oxydation ce qui les met en position de cible privilégiée des radicaux libres en raison de leurs doubles liaisons. Plus l'acide gras est insaturé, plus il est peroxydable (Kharroubi et al., 2015). Cependant, dans notre étude, les marqueurs intracellulaires pro-oxydants (MDA et Protéines carbonylées) sont diminués par la présence des huiles. Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par le fait que nous avons utilisé des huiles naturelles alors que les études précédentes ont utilisé des acides gras purifiés. De plus, les huiles contiennent des antioxydants qui peuvent contribuer à réduire le stress oxydatif. En effet, dans notre travail, la présence de la vitamine E dans les milieux de culture a induit une augmentation des teneurs lymphocytaires en GSH et de l'activité de la catalase associée à une réduction des taux en MDA et en protéines carbonylées par rapport aux valeurs trouvées chez

les lymphocytes incubés avec la Con A seule, aussi bien chez les mères que chez les nouveau-nés des deux groupes. La vitamine E protège les lymphocytes contre le stress oxydatif (Sharma et Vinayak, 2013).

Ainsi, la modulation de la prolifération des lymphocytes et de la sécrétion des cytokines par les huiles et par la vitamine E peut être la conséquence de la réduction du stress oxydatif intracellulaire. Ceci est particulièrement bénéfique chez la mère diabétique et son nouveau-né.

# Conclusion

Le diabète gestationnel est une pathologie liée à une perturbation du métabolisme glucidique qui surgie surtout lors du troisième trimestre de la grossesse et constitue un problème de santé publique dans de nombreux pays à travers le monde

Suite aux conséquences néfastes de cette pathologie, les femmes enceintes diabétiques sont exposées à des risques importants de complications qui peuvent affecter leur santé et celle de leurs nouveau-nés. Les modifications métaboliques peuvent être nombreuses et dangereuse pour la santé de la mère ainsi que son fœtus.

Les acides gras polyinsaturés occupent une place d'actualité dans le domaine de la recherche scientifique. Un des aspects les plus étudiés est lié à l'immuno-modulation. Les différentes preuves cliniques ont poussé de nombreuses organisations et les gouvernements à reconnaître aujourd'hui les AGPI comme une nouvelle approche thérapeutique à un large spectre de maladies modernes.

Nos résultats mettent en évidence les effets de certains acides gras polyinsaturés issus de trois huiles différentes (huile de lin, huile de nigelle, huile d'olive) sur la prolifération des lymphocytes T, la production de cytokines pro ou anti inflammatoires ainsi que sur le statut oxydant / antioxydant chez les mères et leurs nouveau-nés. L'huile de lin riche en acide gras polyinsaturé de la famille n-3 marque ses effets bénéfiques en prouvant ses propriétés immunosuppressives tandis que l'huile de Nigelle riche en acides gras de la famille n-6 joue un rôle stimulant sur la prolifération des lymphocytes T alors que l'huile d'olive n'a aucun effet sur la prolifération des lymphocytes ou la sécrétion de cytokines. Par ailleurs, notre travail révèle les effets bénéfiques des acides gras polyinsaturés des différentes huiles utilisées sur le statut oxydant/ antioxydant lymphocytaire suite à une réduction de l'altération des molécules biologiques et une augmentation des concentrations des antioxydants. Les effets des huiles sur le statut redox sont parallèles à ceux observés avec la vitamine E. Les trois huiles utilisées ont des effets positifs sur les altérations oxydatives et immunitaires chez les mères diabétiques ainsi que leurs nouveau nés. Il est important de noter que les lymphocytes des nouveau-nés répondent in vitro à la présence des huiles de la même façon que les lymphocytes des mères. L'intégration de l'huile de lin, l'huile de nigelle et l'huile d'olive dans l'alimentation humaine peut participer à améliorer le profil métabolique et réduire les conséquences du diabète gestationnel sur l'unité fœto-maternelle et ses complications à long terme.

Au cours de ce travail de recherche, nous avons pu introduire des approches expérimentales in vitro afin d'aborder la problématique des effets des acides gras polyinsaturés sur la prolifération et la fonction des lymphocytes T au cours du diabète

gestationnel. Nous avons montré que ces molécules à des faibles doses sont capables d'exercer des effets immuomodulateurs remarquables. Cependant, les résultats de notre étude ne peuvent être généralisés à la population et d'autres études *in vivo* sont donc nécessaires pour confirmer les résultats obtenus par nos travaux *in vitro*.

Par ailleurs, notre travail révèle les perturbations du métabolisme glucidique associé à un déséquilibre de la balance oxydante/antioxydante chez les mères diabétiques et leurs nouveau-nés. Celui-ci est marqué par des variations du système de défense antioxydante (vitamine C, activité de la catalase et le GSH) ainsi que des altérations des molécules biologiques notamment une accentuation de la peroxydation lipidique caractérisé par une augmentation taux de MDA et de protéines carbonylées maternels et fœtaux. On remarque aussi la présence de forte concentration de radicaux libres tels que l'anion superoxyde. Ces perturbations du statut oxydant/antioxydant peuvent être responsables, pendant la grossesse, d'une gamme de complications maternelles et fœtales, et justifient l'intérêt d'une surveillance particulière. Ainsi, la recherche de thérapies simples nutritionnelles afin d'améliorer la balance oxydante/antioxydante chez ces patientes diabétiques est nécessaire et bien justifiée. Les acides gras issus des huiles alimentaires et les antioxydants peuvent constituer une approche nutritionnelle de choix.

Tant que la physiopathologie très complexe du diabète gestationnel n'est pas complètement élucidée, il sera difficile de proposer des mesures préventives ou prédictives. Actuellement, nous possédons une partie des facteurs de risques mais il nous reste à déterminer les marqueurs biologiques puis le profil génétique. L'identification claire de marqueurs pourrait permettre à traiter ou prévenir le diabète gestationnel, diminuer la morbidité et la mortalité fœtale et maternelle.

Il existe de plus en plus d'évidence dans la littérature soulignant l'importance du stress oxydatif dans la pathogenèse du diabète gestationnel comme une augmentation des marqueurs oxydatifs au niveau plasmatique et placentaire accompagnée d'une diminution notable de la capacité détoxifiante des principales voies réductrices systémiques. Nos résultats prouvent en plus l'existence d'un stress oxydatif intracellulaire au niveau des lymphocytes, cellules jouant un rôle important dans le système immunitaire, non seulement chez les mères mais aussi chez les nouveau-nés.

La recherche des nutriments, plus spécifiquement des alicaments, capables de réduire le stress oxydatif au niveau de l'unité mère – placenta – fœtus représente une étape incontournable pour améliorer les programmes de prévention lors du diabète gestationnel.

**REFERENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**

---

1. Abdel-Moneim A, Dkhil MA, Al-Quraishy S (2011). The redox status in rats treated with flaxseed oil and lead-Induced hepatotoxicity. *Biol Trace Elem Res.* 143:457-467.
2. Abraham NG, Kappas A (2005). Heme oxygenase and the cardiovascular renal system. *Free Radic Biol Med.* 39:1-25.
3. Ademuyiwa O, Odusoga OL, Adebawo OO, Ugbaja R (2007). Endogenous antioxidant defences in plasma and erythrocytes of pregnant women during different trimesters of pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 86:1175-1182.
4. Aebi H (1974). *Methods of Enzymatic Analysis.* Verlag Chemie GmbH. Weinheim. 26:673-684.
5. Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases:rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme.* 74:636-643.
6. Aftab A, Husain A, Mohd M (2013). A review on therapeutic potential of *Nigella Sativa*: A miracle herb. *Asian Pac J Trop Biomed.* 3:337-352.
7. Akadiri Y, Magloire P, Adam G, Yohana M, Kabirou M (2015). Beneficial effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetes: consequences in macrosomia and adulthood obesity. *J Diabetes Res.* 16:1-11.
8. Akinci B, Celtik A, Genc S (2011). Evaluation of postpartum carbohydrate intolerance and cardiovascular risk factors in women with gestational diabetes. *Gynecological endocrinology.* 27:361-367.
9. Alberti-Fidanza A, Di Renzo GC, Burini G, Antonelli G, Perriello G (2002). Diet during pregnancy and total antioxidant capacity in maternal and umbilical cord blood. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 12:59-63.
10. Aljabre S, Randhawa M, Akhtar N, Alakloby O M, Alqurashi A M, Aldossary A (2005). Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle: thymoquinone. *Journal of Ethnopharmacology.* 101:116-119.
11. Alsammani M, Ahmed SR (2012). Fetal and Maternal Outcomes in Pregnancies Complicated with Fetal Macrosomia. *Am J Med Sci.* 4:283-286.
12. Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C (2010). The roles of cellular reactive oxygenspecies, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 42:1634-1650.
13. Atégbo JM, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, moutairou K, Miled A, Grissa A, Jerbi M, Tabka Z, Khan NA (2006). Modulation of

- adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *J Clin endocrinol Metab.* 91:4137-4143.
14. Atkinson J, Epand RF, Epand RM (2008). Tocopherols and tocotrienols in membranes: A critical review. *Free Radic Biol Med.* 44:739–764.
  15. Auclair C, Voisin E (1985). Nitroblue-tetrazolium reduction. Greenwald RA, eds. *Handbook of methods for oxygen radical research.* Boca Raton: CRC Press, Inc. 123-132.
  16. Aurousseau B (2002). Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod Anim.* 15:67-82.
  17. Ayad A, Merzouk H, Baba hamed Y, Merzouk SA, Gresti J, Narce M (2013). Beneficial effects of dietary olive and linseed oils on serum and tissue lipids and redox status in the aging obese rat. *J Nat Prod Plant Resour.* 3:61-71.
  18. Ayaz A, Agarwal A, Sharma R, Arafa M, Elbardisi H, Cui Z ( 2015 ). Impact of precise modulation of reactive oxygen species levels on spermatozoa proteins in infertile men. *Clin Proteomics.* 12:4-8.
  19. Bao W, Baecker A, Song Y, Kiely M, Liu S, Zhang C (2015). Adipokine levels during the first or early second trimester of pregnancy and subsequent risk of gestational diabetes mellitus: A systematic review. *Metabolism.* 64:756-64
  20. Barouki R (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Médecine sciences.* 22:266-272.
  21. Bergfjord C (2010). Comment on 30,000 Year-Old Wild Flax Fibers. *Sciences.* 25:1634-1634.
  22. Benaissa N, Merzouk H, Merzouk SA, Narce M (2015). Effects of maternal linseed oil supplementation on metabolic parameters in cafeteria diet induced obese rats. *Biomedical and Environmental Sciences.* 2:70-73.
  23. Beucher G, Viaris de Lesegno B, Dreyfus M (2010). Complications maternelles du diabète gestationnel. *Journal de Gynécologie et Biologie de la Reproduction.* 39:171-188.
  24. Biri A, Onan A, Devrim E, Babacan F, Kavutcu M, Durak I (2006). Oxidant status in maternal and cord plasma and placental tissue in gestational diabetes. *Placenta.* 27:327–32.

25. Biswas G, Nagamine R, Hikima JI, Sakai M, Kono T (2015). Inductive immune responses in the Japanese pufferfish treated with recombinant IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ rel, IL-4/13A and IL-4/13B. *Int Immunopharmacol.* 15:50-56.
26. Blache D, Prost M (1992). Free radical attack: Biological test for human resistance capability. *Chemical Analysis Laboratory Nasa Washington.* 27:82-89.
27. Ble-Castillo JL, Carmona-Diaz E, Mendez JD (2005). Effect of alpha-tocopherol on the metabolic control and oxidative stress in female type 2 diabetics. *Biomed Pharmacother.* 59:290-295.
28. Bligh EG, Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Physiol Pharmacol.* 37:911-917.
29. Bonnefont-Rousselot D (2004). The role of antioxidant micronutrients in the prevention of diabetic complications. *Treat Endocrinol.* 3:41-52.
30. Bonnier G (1990). *La grande flore en couleur.* Ed Belin, Paris. Tome 1:17-20.
31. Borut P, Rok F (2014). The protective role of antioxidants in the defence against ros/rns-mediated environmental pollution. *Oxid Med Cell Longev.* 14:67-68.
32. Bouzid MA, Hammouda O, Matran R, Robin S, Fabre C (2015). Influence of physical fitness on antioxidant activity and malondialdehyde level in healthy older adults. *Appl Physiol Nutr Metab.* 4:1-8.
33. Brownlee M (2005). The Pathobiology of Diabetic Complications A Unifying Mechanism. *Diabetes.* 54:1615-1625.
34. Buchanan TA, Xiang A, Kjos SL, Watanabe R (2007). What is gestational diabetes? *Diabetes Care.* 2:105-111.
35. Burguet A (2010). Long-term outcome in children of mothers with gestational diabetes. *Diabetes Metab.* 36:682-694.
36. Caimari F, Ramos A, Pujol I, García-Patterson A (2015). Gestational diabetes mellitus in women with multiple pregnancies: is the metabolic abnormality milder? *J Matern Fetal Neonatal Med.* 6:1-5.
37. Calder PC (2001). Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Lipids.* 36:1007-1024.
38. Calder PC (2006). N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr.* 83:1505-1519.
39. Campoio TR, Oliveira FA, Otton R (2011). Oxidative stress in human lymphocytes treated with fatty acid mixture: role of carotenoid astaxanthin. *Toxicol In Vitro.* 25:1448-1456.

40. Carroll L, Voisey J, Van Daal A (2004). Mouse models of obesity. *Clinics in dermatology*. 22:345-349.
41. Chaudhari L, Tandon OP, Vaney N, Agarwal N (2003). Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in gestational diabetics. *Indian J Physiol Pharmacol*. 47:441-446.
42. Cho GJ, An JJ, Choi SJ, Oh SY, Kwon HS, Hong SC, Kwon JY (2015). Postpartum glucose testing rates following gestational diabetes. *J Korean Med Sci*. 30:1841-1846.
43. Chong Z, Maiese K, Yan C (2007). Mechanistic insights into diabetes mellitus and oxidative stress. *Curr Med Chem*. 14:1729–1738.
44. Cieślak M, Wojtczak A, Cieślak M (2015). Role of pro-inflammatory cytokines of pancreatic islets and prospects of elaboration of new methods for the diabetes treatment. *Acta Biochim Pol*. 62:15-21.
45. CNGOF. Collège national des gynécologues et obstétriciens français (2010). Extrait des mises à jour en gynécologie et obstétrique. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*. 39:1-342.
46. Cohen SL, Moore AM, Ward WE (2005). Flaxseed oil and inflammation-associated bone abnormalities in interleukin-10 knockout mice. *J Nutr Biochem*. 16:368-374.
47. Collison LW, Collison RE, Murphy EJ, Jolly CA (2005). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids increase T-lymphocyte phospholipid mass and acyl-CoA binding protein expression. *Lipids*. 40:81-87.
48. Corino C, Rossi R, Cannata S, Ratti S (2014). Effect of dietary linseed on the nutritional value and quality of pork and pork products: systematic review and meta-analysis. *Meat Sci*. 98:679-88.
49. Covas MI, Ruiz-Gutiérrez V, De la Torre R (2006). Minor components of olive Oil: Evidence to date of health benefits in humans. *Nutr Rev*. 64: 20–30.
50. Danilack VA , Muri JH, Savitz DA, Caldwell DL, Wood CL (2015). Hospital differences in special care nursery use for newborns of gestational diabetic mothers. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 23:1-6.
51. Dario P, Zaccardi F, Di Stasio E (2010). Oxidative Stress, Nitric Oxide, and Diabetes. *Rev Diabet Stud*. Spring. 7:15-25.
52. Dasilva G, Pazos M, García-Egido E, Gallardo JM, Rodríguez , Cela R, Medina (2015). Healthy effect of different proportions of marine  $\omega$ -3 PUFAs

- EPA and DHA supplementation in Wistar rats: Lipidomic biomarkers of oxidative stress and inflammation. *J Nutr Biochem*. 26:1385-1392.
53. Datta R, Alfonso-García A, Cinco R, Gratton E (2015). Fluorescence lifetime imaging of endogenous biomarker of oxidative stress. *Sci Rep*. 20:9848-9849.
54. De Pablo MA, Puertollano MA, Álvarez de CienfuegosG (2004). Olive oil and immune system functions: Potential involvement in immunonutrition. *Grasas Aceitesv*. 55:42–51.
55. Demmelmair H, Koletzko B (2015). Importance of fatty acids in the perinatal period. *World Rev Nutr Diet*. 112:31-47.
56. Denys A, Hichami A, Khan NA (2002). Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid modulate MAP kinase enzyme activity in human T-cells. *Mol Cell Biochem*. 232:143-148.
57. DeSisto CL, Kim SY, Sharma AJ (2014). Prevalence Estimates of Gestational Diabetes Mellitus in the United States, Pregnancy Risk Assessment Monitoring System (PRAMS). *Prev Chronic Dis*. 11:415-424.
58. Diaz O, Mébarek-Azzam S, Benzaria A, Dubois M, Lagarde M, Némoz G, Prigent AF (2005). Disruption of lipid rafts stimulates phospholipase D activity in human lymphocytes and Implication in the regulation of immune function. *J Immunol*. 15:8077-8086.
59. Djordjevic A, Spasic S, Jovanovic-Galovic A, DjordjevicR, Grubor-Lajsic G (2004). Oxidative stress in diabetic pregnancy: SOD, CAT and GSHPx activity and lipid peroxidationproducts. *J Matern Fetal Neonat Med*. 16:367–372.
60. Draper H, Hadley M (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 186:421-431.
61. El Kadi M, Kandil O, Tabuni A M (1990). *Nigella sativa* and cell mediated immunity. *Arch of Aids Res*. 1:232-235.
62. Ellman G (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 82:70-77.
63. El-Tahir K , Dana M B (2006). The Black Seed *Nigella sativa* Linnaeus: A plea for urgent clinical evaluation of its volatile oil. *J T U Med Sc*. 1:1-20.
64. Fall C, Yajnik CS, Rao S, Davies AA, Brown N, Farrant HJW (2003). Micronutrients and fetal growth. *J Nutr*. 133:1747-1756.
65. Fang F (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Reviews Microbiology*. 2:820-832.

66. Favier A (2003). le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *J l'actualité chimique*. 14:111-114.
67. Fédération international du diabete (2013). Atlas du diabète de la FID. Sixième édition. 44-45.
68. Ferrara A (2007). Increasing prevalence of gestational diabetes mellitus: Public health perspective. *Diabetes Care*. 30:141-146.
69. Figueroa-Vega N, Moreno-Frías C, Malacara JM (2015). Alterations in adhesion molecules, pro-inflammatory cytokines and cell-derived microparticles contribute to intima-media thickness and symptoms in postmenopausal women. *PloS One*. 10:1-12.
70. Fisher-Wellman K , Bloomer RJ (2009). Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dynamic Medicine*. 8:1-25.
71. Ford FA, Mouratidou T, Wademan S, Fraser RB (2008). Effect of the introduction of 'Healthy Start' on dietary behaviour during and after pregnancy: early results from the 'before and after' Sheffield study. *Br J Nutr*. 19:1-9.
72. Fortas N (2012). Attention au diabète gestationnel. *Santé-MAG*. 12:1- 26
73. Friedman JE, Kalhan SC, Catalano PM (2002). TNFalpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes*. 51:2207- 2213.
74. Fritsche KL (2015). The science of Fatty acids and inflammation. *Adv Nutr*. 6:293-301.
75. Gabbe SG, Niebyl JR (2002). *Obstetrics normal and problem pregnancies*. 4th ed. New York, NY: Churchill Livingstone. 53:79-83.
76. Galtier F (2010). Définitions, épidémiologie, facteurs de risque. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*. 39:144-170.
77. García-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Oliveras-Ferraros C, Vázquez-Martín A, Menéndez JA, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A (2010). Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. *J Pharm Biomed Anal*. 51:416-429.
78. Gardès-Albert M, Jore D (2003). Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène. Aspects biologiques et pathologiques. Paris: Lavoisier. 1-23.

79. Gold DR, Willwerth BM, Tantisira KG, Finn PW, Schaub B, Perkins DL, Tzianabos A, Ly NP, Schroeter C, Gibbons F, Campos H, Oken E, Gillman MW, Palmer LJ, Ryan LM, Weiss ST (2006). Associations of cord blood fatty acids with lymphocyte proliferation, IL-13, and IFN-gamma. *J Allergy Clin Immunol.* 117:931-938.
80. González S, López P, Margolles A, Suárez A, Patterson AM, Cuervo A, De los Reyes-Gavilán CG, Gueimonde M (2013). Fatty acids intake and immune parameters in the elderly. *Nutr Hosp.* 28:474-478.
81. Goudable J, Favier A (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Metabol.* 11:115-120.
82. Granato D, Blum S, Rossle C, Le Boucher J, Malnoe A, Dutot G (2000). Effects of parenteral lipid emulsions with different fatty acid composition on immune cell functions in vitro. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 24:113-118.
83. Ghedira K (2006). La Nigelle cultivée : *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytotherapie.* 4:1-7.
84. Guevara I, Iwanejko J, Dembińska-Kieć A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, Gołabek I, Bartuś S, Malczewska-Malec M, Szczudlik A (1998). Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta.* 274:177-188.
85. Guzik TJ, West NE, Pillai R, Taggart DP, Channon KM (2002). Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertension.* 39:1088-1094.
86. Hashim Y, Rowland I, Mc Glynn H, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposito S, Montedoro G, Kaisalo K, Gill C (2008). Inhibitory effects of olive oil phenolicson invasion in human colon adenocarcinoma cells in vitro. *International Journal of Cancer.* 112:405-500.
87. Hasselmann M, Reimund JM (2004). Lipids in the nutritional support of the critically ill patients. *Curr Opin Crit Care.* 10:449-455.
88. Hirsch C (2009). Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. *Lancet Neurol.* 8:382-397.
89. Hozawa A, Jacobs D, Steffes M (2007). Relationships of circulating carotenoid concentrations with several markers of inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction. *Clin Chem.* 53:1-9.

90. Hracsko Z, Safar Z, Orvos H, Novak Z, Pal A, Varga IS (2007). Evaluation of oxidative stress markers after vaginal delivery or cesarean section. *In Vivo*. 21:703-706.
91. Hussein J, El-Khayat Z, Taha M, Morsy S, Drees E, Khateeb S(2012). Insulin resistance and oxidative stress in diabetic rats treated with flaxseed oil. *J Med Plants Res*. 42:5499–5506.
92. Innis SM, Novak EM, Keller BO (2013). Long chain omega-3 fatty acids: micronutrients in disguise. *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids*. 88: 91-95.
93. Jacqueminet S (2010). Prise en charge thérapeutique du diabète gestationnel. *J Gynécol Obstet Biol Reprod*. 39:251-263.
94. Jagota SK, Dani HM (1982). A new colorimetric technique for estimation of vitamine C using folin phenol reagent. *Analytical Biochemistry*. 127:178-182.
95. Jamel MJ, Pereira LPM, Mello NB, Eleuthério ECA, Schanaider A (2010). Blood carbonyl protein measurement as a specific oxidative stress biomarker after intestinal reperfusion in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*. 25: 59-62.
96. Jang HY, Lim K, Lee SM, Park BH (2014). Effects of n-3 PUFA on the CD4<sup>+</sup> type 2 helper T-cell-mediated immune responses in Fat-1 mice. *Mol Nutr Food Res*. 58:365-375.
97. Jangale NM, Devarshi PP, Dubal AA, Ghule AE, Koppikar SJ, Bodhankar SL, Chougale AD, Kulkarni MJ, Harsulkar AM (2013). Dietary flaxseed oil and fish oil modulates expression of antioxidant and inflammatory genes with alleviation of protein glycation status and inflammation in liver of streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Food Chem*. 141:187-195.
98. Johns M, Fyalka R, Shea JA, Neumann WL, Rausaria S, Msengi EN, Imani-Nejad M, Zollars H, McPherson T, Schober J, Wooten J, Kwon G (2015). SR-135, Peroxynitrite Decomposing Catalyst, Enhances  $\beta$ -cell Function and Survival. *Arch Biochem Biophys*. 29:10-16.
99. Jones DP (2008). Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*. 295:849-868.
100. Jones ML, Mark PJ, Waddell BJ (2014). Maternal dietary omega-3 fatty acids and placental function. *Reproduction*. 147:143-152.
101. Justin L, Rains S, Jain K (2011). Oxidative Stress, Insulin Signaling And Diabetes. *Free Radic Biol Med*. 50:567–575.

102. Kaithwas G, Majumdar DK (2010). Therapeutic effect of *Linum usitatissimum* (flaxseed/linseed) fixed oil on acute and chronic arthritic models in albino rats. *Inflammopharmacol.* 18:127-136.
103. Kaithwas G, Majumdar DK (2013). Effect of *Linum usitatissimum* (Flaxseed/Linseed) Fixed Oil against Distinct Phases of Inflammation. *ISRN Inflamm.* 73:1-58.
104. Kalaiselvan I, Samuthirapandi M, Govindaraju A, Sheeja Malar D (2015). Olive oil and its phenolic compounds (hydroxytyrosol and tyrosol) ameliorated TCDD-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of oxidative stress and apoptosis. *Pharm Biol.* 8:1-9.
105. Khan NA, Yessoufou A, Kim M, Hichami A (2006). N-3 fatty acids modulate TH1 and TH2 dichotomy in diabetics pregnancy and macrosomia. *J Autoimmun.* 26:268-277.
106. Khan R, Ali K, Khan Z, Ahmad T (2012). Lipid profile and glycosylated hemoglobin status of gestational diabetic patients and healthy pregnant women. *Indian J Med Sci.* 66:149-154.
107. Kharroubi A, Darwish H (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes.* 25:850-867.
108. Kharroubi W, Dhibi M, Chreif I, Gérard L, Hammami M, Sakly R (2015). Differential alterations of lipid status and lipid metabolism, induction of oxidative stress by sodium arsenate in female rat's liver and kidney. *Biomed Environ Sci.* 28:829-833.
109. Kheirat F, Merzouk H, Boudilmi N, Merzouk SA, Malti A, Narce M (2013). Oxidative stress biomarkers in diabetic mothers and their newborns. *Annals of Biological Research.* 4:73-80.
110. Kiecolt-Glaser JK, Epel ES, Belury MA, Andridge R, Lin J, Glaser R, Malarkey WB, Hwang BS, Blackburn E (2013). Omega-3 fatty acids, oxidative stress, and leukocyte telomere length: A randomized controlled trial. *Brain Behav Immun.* 28:16-24.
111. Kim HW, Cho SJ, Kim BY, Cho SI, Kim YK (2010). Pogostemon cablin as ROS scavenger in oxidant-induced cell death of human neuroglioma cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 7:239-247.
112. King GL (2008). The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J Periodontol.* 79:1527-1534.

113. Kinoshita H, Matsuda N, Kaba H (2008). Roles of phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt and NADPH oxidase in adenosine 5'-triphosphate-sensitive K<sup>+</sup> channel function impaired by high glucose in the human artery. *Hypertension*. 52:507–513.
114. Kocić R, Pavlović D, Kocić G, Pešić M (2007). Susceptibility to oxidative stress, insulin resistance, and insulin secretory response in the development of diabetes from obesity. *Vojnosanit Pregl*. 64:391-397.
115. Koechlin R (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires . *Nutrition clinique et métabolisme* . 20:4-10.
116. Kong JM, Lim K, Thompson DM (2015). Evaluation of the International Association of the Diabetes In Pregnancy Study Group new criteria: gestational diabetes project. *Can J Diabetes*. 39:128-132.
117. Kontogianni MD, Vlassopoulos A, Gatzieva A, Farmaki AE, Katsiogiannis S, Panagiotakos DB, Kalogeropoulos N, Skopouli FN (2013). Flaxseed oil does not affect inflammatory markers and lipid profile compared to olive oil, in young, healthy, normal weight adults. *Metabolism*. 62:686-93.
118. Koźlik J, Przybyłowska J, Mikrut K (2015). Selected oxidative stress markers in gynecological laparoscopy. *Wideochir Inne Tech Malo Inwazyjne*. 10:92-100.
119. Laissouf A, Mokhtari-soulimane N, Merzouk H, Benhabib N (2013). Dietary flaxseed oil supplementation improves the Oxidant/antioxidant status in obese aged rats. *International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences*. 3:87-94.
120. Lange N, Speight J (2005). *Lange's handbook of chemistry*, McGraw-Hill. 16<sup>e</sup> éd. 1623-1624.
121. Lamri L, Gripiotis E, Ferrario A (2014). Diabetes in Algeria and challenges for health policy: a literature review of prevalence, cost, management and outcomes of diabetes and its complications. *Global Health*. 10:11-22.
122. Lappas M, Hiden U, Desoye G, Froehlich J, Hauguel-de Mouzon S, Jawerbaum A (2011). The role of oxidative stress in the pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal*. 15:3061-3100.
123. Lapolla A, Dalfrà MG, Sanzari M (2005). Lymphocytes and cytokines in women with gestational diabetes mellitus and their newborn. *Cytokine*. 31:280-287.

124. Lauenborg J (2005). The prevalence of the metabolic syndrome in a danish population of women with previous gestational diabetes mellitus is three-fold higher than in the general population. *J Clin Endocrinol Metab.* 90:4004-4010.
125. Legardeur H, Girard G, Mandelbrot L (2011). Dépistage du diabète gestationnel. *Gynécol Obstet Fertil.* 39:174-179.
126. Levine RL, Garland D, Olivier CN, Amici A, Lenz AG, Stadtman ER (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186:464-478.
127. Li J, Tang HL, Chen Y, Fan Q, Shao YT, Jia M, Wang JC, Yang CM (2015). Malondialdehyde and SOD-induced changes of gastric tissues in acute gastric mucosal injury under positive acceleration. *Genet Mol Res.* 14:4361-4368.
128. Liang Z, Wu Y, Zhu X, Fang Q, Chen D (2016). Insulin resistance and lipid profile during an oral glucose tolerance test in women with and without gestational diabetes mellitus. *J Obstet Gynaecol.* 36:337-339.
129. Loomans EM, Van den Bergh BR, Schelling M, Vrijkotte TG, Van Eijsden M (2014). Maternal long-chain polyunsaturated fatty acid status during early pregnancy and children's risk of problem behavior at age 5-6 years. *J Pediatr.* 164:762-768.
130. López-Tinoco C, Roca M, García-Valero A, Murri M, Tinahones FJ, Segundo C, Bartha JL, Aguilar-Diosdado M (2013). Oxidative stress and antioxidant status in patients with late-onset gestational diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* 50:201-208.
131. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RI (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-275.
132. Lü J, Peter H, Qizhi Y, Chen J (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med.* 14:840-860.
133. Lupi R, Del Guerra S, Mancarella R, Novelli M, Valgimigli L, Pedulli GF, Paolini M (2007). Insulin secretion defects of human type 2 diabetic islets are corrected in vitro by a new reactive oxygen species scavenger. *Diabetes and Metabolism.* 33:340-345.
134. Maged AM, Torkey H, Fouad MA, GadAllah SH, Waked NM, Gayed AS, Salem AK (2016). Role of antioxidants in gestational diabetes mellitus and

- relation to fetal outcome: a randomized controlled trial. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 21:1-6.
135. Mahmoud F, Abul H, Dashti A, Al-Jassar W, Omu A (2012). Trace elements and cell-mediated immunity in gestational and pre-gestational diabetes mellitus at third trimester of pregnancy. *Acta Med Acad.* 41:175-185.
136. Mahmoud F, Abul H, Omu A, Haines D (2005). Lymphocyte sub-populations in gestational diabetes. *Am J Reprod Immunol.* 53: 21-29.
137. Makeba T (2008). La grossesse chez la femme diabétique. *J Adjinakou.* 1:5-10
138. Manning P, Mesc M, Frac P (2004). Effects of high-Dose Vitamin E on insulin Resistance and associated Parameters in Overweight subjects. *Diabetes Care.* 27:2166-2171.
139. Marseille-Tremblay C (2008). Impact of maternal circulating cholesterol and gestational diabetes mellitus on lipid metabolism in human term placenta. *Mol Reprod Dev.* 75:1053-1054.
140. Massion P, Balligand J (2003). Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice. *J Physiol.* 546:63-75.
141. Mates JM, Perez-Gomez C, De Castro IN (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 32:595-603.
142. Mayer-Davis EJ, Costacou T, King I, Zaccaro DJ, Bell RA (2002). Plasma and dietary vitamin E in relation to incidence of type 2 diabetes: the insulin resistance and atherosclerosis study (IRAS). *Diabetes Care.* 25:2172–2177.
143. Menendez A, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraro C, Garcia-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A (2009). Extra-virgin olive oil polyphenols inhibit HER2 (erbB-2)-induced malignant transformation in human breast epithelial cells: Relationship between the chemical structures of extra-virgin olive oil secoiridoids and lignans and their inhibitory activities on the tyrosine kinase activity of HER2. *International Journal of Oncology.* 34:43-51.
144. Mennitti LV, Oliveira JL, Morais CA, Estadella D, Oyama LM, Do Nascimento CM, Pisani LP (2015). Type of fatty acids in maternal diets during pregnancy and/or lactation and metabolic consequences of the offspring. *J Nutr Biochem.* 26:99-111.

145. Merzouk H, Khan NA (2003). Implication of lipids in macrosomia of diabetic pregnancy: can n-3 polyunsaturated fatty acids exert beneficial effects? *Clin Sci.* 105:519-529.
146. Merzouk H, Meghelli-Bouchenak M, Loukidi B, Prost J, Belleville J (2000). Impaired serum lipids and lipoproteins in fetal macrosomia related to maternal obesity. *Biology of the Neonate.* 77:17-24.
147. Merzouk S, Hichami A, Sari A, Madani S, Merzouk H, Yahia Berrouiguet A, Lenoir-Rousseaux JJ, Chabane Sari N, Khan NA (2004). Impaired oxidant/antioxidant status and ldl-fatty acid composition are associated with increased susceptibility to peroxidation of ldl in diabetic patient. *Gen Physiol Biophys.* 23:387-399.
148. Merzouk SA, Saker M, Briksi Reguig K (2008). N-3 Polyunsaturated fatty acids modulate in-vitro T cell function in type I diabetic patients. *Lipids.* 43:485-97.
149. Meziane RK, Merzouk H, Saker M, Baba Ahmed S, Narce M (2014). Effets des acides gras sur la prolifération lymphocytaire, la production d'interleukines, et le statut oxydant dans un groupe d'enfants obèses algériens. *Lebanese Science Journal.* 15:1-15.
150. Mitanchez D (2010). Foetal and neonatal complications in gestational diabetes: perinatal mortality, congenital malformations, macrosomia, shoulder dystocia, birth injuries, neonatal complications. *Diabetes Metab.* 36:617-627.
151. Mokhtari-soulimane NA, Guermouche B, Yessoufou A, Saker M, Moutairou K, Hichami A, Merzouk H, Khan NA (2005). Modulation of lipid metabolism by n-3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetic rats and their macrosomic offspring. *Obstet. Gynecol.* 104:720-726.
152. Monnier L, Colette C (2010). *Diabétologie. Diabète et grossesse.* Elsevier Masson. 404:305-310.
153. Monnier L, Colette C, Boegner C, Pham TC, Lapinski H, Boniface H (2007). Continuous glucose monitoring in patients with type 2 diabetes: Why? When? Whom?. *Diabetes and metabolism.* 33:247-252.
154. Morales González E, Contreras I, Estrada JA (2014). Effect of iron deficiency on the expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in neuronal and glial cells. *Neurologia.* 29:408-415
155. Morin O (2015). Caractéristiques des huiles de lin et de chanvre. *OCL.* 22:2-6

156. Moshe, Abraham Z, Reznick Z , Obeid R , Rafael Z (2000). Relationship of flow rate, uric acid, peroxidase, and superoxide dismutase activity levels with complications in diabetic patients. *Antioxidants and Redox Signaling*. 9:765-773.
157. Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65:55-63.
158. Moussa M, Tkaczuk J, Ragab J, Garcia J, Abbal M, Ohayon E, Ghisolfi J, Thouyenot JP (2000). Relationship between the fatty acid composition of rat lymphocytes and immune functions. *Br J Nutr*. 83:327-333.
159. Muller S, Martin S, Koenig W, Hanifi-Moghaddam P, Rathmann W, Haastert B, Giani G, Illig T, Thorand B, Kolb H (2002). Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of interleukin 6 and coregulated acute-phase proteins but not TNF-alpha or its receptors. *Diabetologia*. 45:805-812.
160. Musumeci G, Castrogiovanni P, Trovato FM, Parenti R, Szychlinska MA and Imbesi R (2015). Pregnancy, embryo-fetal development and nutrition: physiology around fetal programming. *J Histol Histopathol*. 2:1-7.
161. Myatt L, Cui X (2004). Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol*. 122:369-382.
162. Nerpin E, Johanna H, Ulf R (2012). Inflammation, oxidative stress, glomerular filtration rate, and albuminuria in elderly men: a cross-sectional study. *BMC Res Notes*. 5:537-542.
163. Nickavar B, Mojab F, Javidnia K, Amoli M (2003). Chemical composition of the fixed and volatile oils of nigella sativa. *Naturforsch*. 58:629-631.
164. Niki E (2014). Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. *Free Radic Biol Med*. 66:3-12.
165. Odent M (2014). Nutrition in pregnancy: keeping in mind the priorities. *Pract Midwife*. 17:10-2.
166. Ohnishi S, Murata M, Ida N, Oikawa S, Kawanishi S (2015). Oxidative DNA damage induced by metabolites of chloramphenicol, an antibiotic drug. *Free Radic Res*. 13:1-23.
167. Oliveira D, Pereira J, Fernandes R (2012). Metabolic alterations in pregnant women: gestational diabetes. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 25: 835-842.

168. Olmos Coelho P (2014). Anthropology of obesity and gestational diabetes. *Rev Chil Obstet Gynecol.* 79:145–153.
169. Organisation mondiale de la santé (2013). Critères de diagnostic et classification de l'hyperglycémie décelée pour la première fois pendant la grossesse. Genève, Suisse.10-11.
170. Orhan H, Onderoglu L, Yücel A, Sahin G (2003). Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies. *Arch Gynecol Obstet.* 267:189-195.
171. O'Sullivan JB (1961). Gestational Diabetes: Unsuspected, asymptomatic diabetes in pregnancy. *N Engl J Med.* 264:1082-1085.
172. Pace MC, Passavanti MB, Aurilio C, Sansone P, Aurilio R, DE Maria S, Lama S, Federico A, Ravagnan G, Caraglia M, Stiuso P (2015). Polydatin Administration Improves Serum Biochemical Parameters and Oxidative Stress Markers During Chronic Alcoholism: A Pilot Study. *In Vivo.* 29:405-408.
173. Park CH, Jae WK (2012). Effect of Advanced Glycation End Products on Oxidative Stress and Senescence of Trabecular Meshwork Cells. *Korean J Ophthalmol.* 26:123–131.
174. Park HJ, Park JS, Hayek MG, Reinhart GA, Chew BP (2011). Dietary fish oil and flaxseed oil suppress inflammation and immunity in cats. *Vet Immunol Immunopathol.* 141:301-306.
175. Patil SB, Kodliwadmth MV, Kodliwadmth SM (2006). Lipid peroxidation and nonenzymatic antioxidants in normal pregnancy. *J Obstet Gynecol India.* 56: 399-401.
176. Peng JZ, Xue L, Chen J, Chen BS, Yang YQ (2015). Influence of cyclophilin D protein expression level on endothelial cell oxidative damage resistance. *Genet Mol Res.* 14:4258-4268.
177. Persaud O (2007). Maternal Diabetes and the consequences for her Offspring. *J Dev Disabil.* 13:101–133.
178. Picone O, Marszalek A, Servely JL, Chavatte-Palmerb P (2009). Influence d'une supplémentation en omégas 3 au cours de la grossesse. *J Gynecol Obstetr Biol Reprod.* 38:117-124.
179. Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, Romitelli F, Santini SA, Zuppi C, Ghirlanda G (2010). Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *Rev Diabet Stud.* 7:15-25.
180. Poljsak B (2011). Strategies for Reducing or Preventing the Generation of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev.* 10:19-45.

181. Qin Y, Zhou Y, Chen SH, Zhao XL (2015). Fish Oil Supplements Lower Serum Lipids and Glucose in Correlation with a Reduction in Plasma Fibroblast Growth Factor 21 and Prostaglandin E2 in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Associated with Hyperlipidemia: A Randomized Clinical Trial. *PLoS One*. 10: 3-15.
182. Raccach D (2004). *Epidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré*. EMC-Endocrinologie. 1:29-42.
183. Rawdin B J, Mellon S, Dhabhar F, Epel E, Puterman E (2013). Dysregulated relationship of inflammation and oxidative stress in major depression. *Brain Behav Immun*. 31:143–152.
184. Rees D, Miles EA, Banerjee T, Wells SJ, Roynette CE, Wahle KWJ, Calder PC (2006). Dose-related effects of eicosapentaenoic acid on innate immune function in healthy humans: a comparison of young and older man. *Am J Clin Nutr*. 83:331-342.
185. Rhizopoulou S (2007). *Olea europaea L. A Botanical Contribution to Culture*. American-Eurasian J Agric & Environ Sci. 2:382-387.
186. Rice MM, Landon MB, Varner MW, Casey BM, Reddy UM, Wapner RJ, Rouse DJ, Biggio JR Jr, Thorp JM Jr, Chien EK, Saade G, Peaceman AM, Blackwell SC, VanDorsten JP (2016). Pregnancy-Associated Hypertension in Glucose-Intolerant Pregnancy and Subsequent Metabolic Syndrome. *Obstet Gynecol*. 127:771-779.
187. Rodacki AL, De Lourdes Nahhas Rodacki C, Coelho I, Pequito D, Krause M, Bonatto S, Naliwaiko K, Fernandes LC (2015). Influence of fish oil supplementation and strength training on some functional aspects of immune cells in healthy elderly women. *Br J Nutr*. 14:43-52.
188. Rosa DD, Sales RL, Moraes LF, Lourenço FC, Neves CA, Sabarense CM, Ribeiro SM, Peluzio Mdo C (2010). Flaxseed, olive and fish oil influence plasmatic lipids, lymphocyte migration and morphometry of the intestinal of Wistar rats. *Acta Cir Bras*. 25:275-280.
189. Rosa-Lima FL, Lannes L, Viana-Gomes D, Pierucci AP, Salerno VP (2015). Protein carbonyl levels correlate with performance in elite field hockey players. *Appl Physiol Nutr Metab*. 13:1-6.

190. Ruth MR, Taylor CG, Zahradka P, Field CJ (2008). Abnormal Immune Responses in fa/fa Zucker Rats and Effects of Feeding Conjugated Linoleic Acid. *Obesity*. 16:1770-1779.
191. Sabry S, Sogni P, Moreau R (1996). Hyporeactivity of mesenteric resistance arteries in portal hypertensive rats. *J Hepatol*. 24:487-490.
192. Salem ML (2005). Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* seed. *Int Immunopharmacol*. 5:1749-1770.
193. Sales-Campos H, Souza PR, Peghini BC, da Silva JS, Cardoso CR (2013). An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. *Mini Rev Med Chem*. 13:201-210.
194. Sampath P, Achuthan R, Mahdi O, Nalini S (2010). Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Methods Mol Biol*. 610:403-417.
195. Schober L, Radnai D, Spratte J, Kisielewicz A, Schmitt E, Mahnke K, Fluhr H, Uhlmann L, Sohn C, Steinborn A (2014). The role of regulatory T cell (Treg) subsets in gestational diabetes mellitus. *Clin Exp Immunol*. 177:76-85.
196. Schoenaker DA, Mishra GD, Callaway LK, Soedamah-Muthu SS (2016). The Role of Energy, Nutrients, Foods, and Dietary Patterns in the Development of Gestational Diabetes Mellitus: A Systematic Review of Observational Studies. *Diabetes Care*. 39:16-23.
197. Schönfeld P1, Wieckowski MR, Lebedzińska M, Wojtczak L (2010). Mitochondrial fatty acid oxidation and oxidative stress: lack of reverse electron transfer-associated production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*. 1797:929-938.
198. Shahzad M, Yang X, Raza Asim MB, Sun Q, Han Y, Zhang F, Cao Y, Lu S (2009). Black seed oil ameliorates allergic airway inflammation by inhibiting T-cell proliferation in rats. *Pulm Pharmacol Ther*. 22:37-43.
199. Shaikh SR, Edidin M (2006). Polyunsaturated fatty acids, membrane organization, Tcells, and antigen presentation. *Am J Clin Nutr*. 84:1277-1289.
200. Shang M, Zhao J, Yang L, Lin L (2015). Oxidative stress and antioxidant status in women with gestational diabetes mellitus diagnosed by IADPSG criteria. *Diabetes Res Clin Pract*. 109:404-410.
201. Sharma R, Vinayak M (2013).  $\alpha$ -Tocopherol prevents lymphoma by improving antioxidant defence system of mice. *Mol Biol Rep*. 40:839-849.

202. Shekhar R (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 134:489-492.
203. Shieh PC, Chen YO, Kuo DH, Chen FA, Tsai ML, Chang IS, Wu H, Sang S, HoCT, Pan MH (2010). Induction of Apoptosis by [8]-shogaol via Reactive OxygenSpecies Generation, Glutathione Depletion and Caspase Activation in HumanLeukemia Cells. *J Agric Food Chem.* 58:3847-3854.
204. Slover T, Lanza E (1979). Quantitative analysis of food fatty acis by cappilary gaz chromatography . *J Am Oil Soc.* 56:933-943
205. Smith T (2010). Insulin-Like Growth Factor-I Regulation of Immune Function: A Potential Therapeutic Target in Autoimmune Diseases. *Pharmacol Rev.* 62: 199–236.
206. Sokup A, Gralczyk B, Gralczyk K (2012). Triglycerides as an early pathophysiological marker of endothelial dysfunction in women with a previous history of gestational diabetes. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 91:182-188.
207. Sovari A, Dudley S (2012). Reactive oxygen species-targeted therapeutic interventions for atrial fibrillation. *Front Physiol.* 3:311-318.
208. Spencer L, Rollo M, Hauck Y, Macdonald-Wicks L (2015). The effect of weight management interventions that include a diet component on weight related outcomes in pregnant and postpartum women: a systematic review protocol. *JBI Database System Rev Implement Rep.* 13:88-98.
209. Stulnig TM (2003). Immunomodulation by polyunsaturatedfatty acids: Mechanisms and effects. *Int Arch Allergy Immunol.* 132:310–321.
210. Su K (2015). Nutrition, psychoneuroimmunology and depression: the therapeutic implications of omega-3 fatty acids in interferon- $\alpha$ -induced depression. *Biomed.* 5:21-29.
211. The Angiosperm Phylogeny Group (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society.* 105-121.
212. Thies F, Nebe-von-Caron G, Powell JR, Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC (2001). Dietary supplementation with g-linolenic acid or fish oil decreases T lymphocyte proliferation in healthy older humans. *J Nutr.* 131:1918–1927.
213. Tinahones F, Murri-pierri M, Garrido-sanchez L, Garcia-almeida JM (2008). Oxidative stress in severely obese persons is greater in those with insulin resistance. *Obesity.* 17:240-246.

214. Touati-Mecheri D, Agli A, Potier De Courcy G (2007). Apports nutritionnels d'une population de femmes enceintes de constantine (algerie). Cahiers de nutrition et de dietetique. 42:266-275.
215. Uchino Y, Kawakita T, Miyazawa M, Ishii T, Onouchi H, Yasuda K, Ogawa Y, Shimmura S, Ishii N, Tsubota K (n 2015). Oxidative Stress Induced Inflammation Initiates Functional Decline of Tear Production. PLoS One. 11:2-25.
216. Unim H , Byamukama E (2010). Regular vitamin C supplementation during pregnancy reduces hospitalization:Outcomes of a Ugandan rural cohort study. Pan Afr Med J. 30:5-15.
217. Valenzuela R, Bascuñán KA, Chamorro R , Valencia A, Barrera C, Puigredon C, Sandoval J, Valenzuela A (2014). Polyunsaturated fatty acid composition of maternal diet and erythrocyte phospholipid status in Chilean pregnant women. Nutrients. 6:4918-4934.
218. Valle S, Ernst S, Demirci C, Velazquez-Garcia S, Garcia-Ocada A (2011). Mechanisms of adaptation of maternal beta cells during pregnancy. Diabetic Manag. 1:239-248.
219. Vambergue A (2011). Diabète gestationnel. Medecine clinique endocrinologie et diabete. 1:26-32.
220. Venturini D, Simão AN, Urbano MR, Dichi I (2015). Effects of extra virgin olive oil and fish oil on lipid profile and oxidative stress in patients with metabolic syndrome. Nutrition. 31:834-840.
221. Verlengia R, Gorjao R, Kanunfre C, Bordin S, De Lima T, Curi R (2004). Effect of Arachidonic Acid on Proliferation, Cytokines Production and Pleiotropic Genes Expression in Jurkat Cells--a Comparison with Oleic Acid. Life Sci. 73:2939-2951.
222. Viardot A, Grey ST, Mackay F, Chisholm D (2007). Potential antiinflammatory role of insulin via the preferential polarization of effector T cells toward a T helper 2 phenotype. Endocrinology. 148:346-353
223. Vibet S, Goupille C, Bougnoux P, Steghens JP, Gore J, Maheo K (2008). Sensitization by docosahexaenoic acid (DHA) of breast cancer cells to anthracyclines through loss of glutathione peroxidase (GPx1) response. Free Radic Biol Med. 44:1483-1491.

224. Vijaimohan K, Jainu M, Sabitha KE, Subramaniam S, Anandhan C, Devi CSS (2006). Beneficial effects of alpha linolenic acid rich flaxseed oil on growth performance and hepatic cholesterol metabolism in high fat diet fed rats. *Life Sciences*. 79:448-454.
225. Vijayalakshmi B, Maheswari U, Vela CT, Chandrasekhar M (2010). A Comparative Study on the Association of Labour process with Oxidative stress in Normal and Preeclamptic mothers. *Current trends in Biotechnology and Pharmacy*. 4:691-701.
226. Vincent HK, Innes KE, Vincent KR (2007). Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab*. 9:813-839.
227. Vinokuroff C (2013). Diabète et grossesse. *Can J Diabetes*. 1:168-183.
228. Violi F, Cangemi R (2005). Antioxidants and cardiovascular disease. *Curr Opin. Investing Drugs*. 6:895-900.
229. Vitoratos N, Kassinou D, Salamalekis E, Sirisratidis CH, Baimacou E, Creatas G (2002). Maternal homocysteine levels and plasma lipids in gestational diabetes: Is there any relationship? *J Obstet Gynaecol*. 22: 366–369.
230. Wadley AJ, Turner JE, Aldred S (2016). Factors influencing post-exercise plasma protein carbonyl concentration. *Free Radic Res*. 50:375-384.
231. Wallace FA, Miles EA, Calder PC (2003). Comparison of the effects of linseed oil and different doses of fish oil on mononuclear cell function in healthy human subjects. *Br J Nutr*. 89:679-89.
232. Wales KM, Kavazos K, Nataatmadja M, Brooks PR, Williams C, Russell FD (2014). N-3 PUFAs protect against aortic inflammation and oxidative stress in angiotensin II-infused apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice. *PLoS One*. 14:9 :11-28
233. Wang MZ, Ding LY, Wang JF, Wang HR, Yu LH (2011). Effects of n-6:n-3 polyunsaturated fatty acid ratio on heterophil: lymphocyte ratio and T lymphocyte subsets in the peripheral blood of the Yangzhou gosling. *Poult Sci*. 90:824-829.
234. Wang Z, Wang Y, Liu H, Che Y, Xu Y (2015). Age-related variations of protein carbonyls in human saliva and plasma: Is saliva protein carbonyls an alternative biomarker of aging? *Age Dordr*. 37:81-97.

235. Weidinger A, Kozlov AV (2015). Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules*. 15:472-484.
236. Weitzberg E, Hezel M, Lundberg JO (2010). Nitrate-nitrite-nitric oxide pathway: implications for anesthesiology and intensive care. *Anesthesiology*. 113:1460-1475.
237. WHO (2012). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Geneva, World Health Organization. 2-21.
238. Wing H, Ching W, Xilin Y, Gary T, Chun Y, Cockram CS, Sahota DS, Rogers MS, Chung J, Chan N (2008). Glucose Intolerance and Cardiometabolic Risk in Children Exposed to Maternal Gestational Diabetes Mellitus in Utero. *Pediatrics*. 122:1229-1234.
239. World health organization (2012). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Geneva, World Health Organization. 7-40.
240. Xu Y, Shen S, Sun L, Yang H, Jin B (2014) Metabolic Syndrome Risk after Gestational Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 9:87863-87874.
241. Yan L (2014). Pathogenesis of Chronic Hyperglycemia: From Reductive Stress to Oxidative Stress. *J Diabetes Res*. 14:1-11.
242. Yang W, Fu J, Yu M (2012). Effects of flaxseed oil on anti-oxidative system and membrane deformation of human peripheral blood erythrocytes in high glucose level. *Lipids Health Dis*. 11:88–98.
243. Yaqoob P, Knapper JA, Webb DH, Williams CM, Newsholme EA, Calder PC (1998). Effect of olive oil on immune function in middle-aged men. *Am J Clin Nutr*. 67:129–35.
244. Yessoufou A, Soulaïmann N, Merzouk S, Moutairou K, Ahissou H, Prost J, Simonin AM, Hichami A and Khan NA (2006). N-3 fatty acids modulate antioxidant status in diabetic rats and their macrosomic offspring. *Int J Obes*. 30:739-750.
245. Zabrodski PF, Maslyakov VV, Gromov MS (2015). Changes in the function of lymphocytes and cytokine concentration in blood caused by the action of atropine under conditions of acute malathion intoxication. *Eksp Klin Farmakol*. 78:20-23.

246. Zhao JP, Levy E, Fraser WD, Julien P, Delvin E, Montoudis A, Spahis S, Garofalo C, Nuyt AM, Luo ZC (2014). Circulating docosahexaenoic acid levels are associated with fetal insulin sensitivity. *PLoS One*. 13:84-85.
247. Zhao JP, Levy E, Shatenstein B, Fraser WD, Julien P, Montoudis A, Spahis S, Xiao L, Nuyt AM (2015). Longitudinal circulating concentrations of long-chain polyunsaturated fatty acids in the third trimester of pregnancy in gestational diabetes. *Diabet Med*. 10:1-20.
248. Zhuang T, Han H, Yang Z (2014). Iron, Oxidative Stress and Gestational Diabetes. *Nutrients*. 6:3968–3980.



# Annexes

## **CONSENTEMENT**

Je soussignée,

Madame .....

Après avoir pris connaissance des objectifs et des méthodologies relatifs au projet intitulé : Altérations métaboliques et immunitaires chez les femmes enceintes diabétiques ainsi que leurs nouveau-nés sous la responsabilité de Melle DJELTI Farah, doctorante à l'université de Tlemcen, en collaboration avec Le CHU de Tlemcen, le Service de la maternité Mère - Enfant de Tlemcen et le laboratoire de Recherche «Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition sous la direction du Pr. Merzouk Hafida (Université de Tlemcen, Algérie).

J'accepte de participer à ce projet, en répondant aux différents questionnaires et en fournissant un prélèvement sanguin.

Signature

**Tableau A1 : Paramètres biochimiques chez les mères et leurs nouveau-nés**

| Paramètre biochimiques         | Groupe témoin |              | Groupe diabétique |              |
|--------------------------------|---------------|--------------|-------------------|--------------|
|                                | Mères         | Nouveau- nés | Mères             | Nouveau- nés |
| <b>Glucose (g/L)</b>           | 0,77±0,05     | 0,66±0,03    | 1,42±0,09**       | 0,65±0,03    |
| <b>Triglycérides (g/L)</b>     | 1,93±0,13     | 0,62±0,04    | 1,95±0,11         | 0,64±0,05    |
| <b>Cholestérol (g/L)</b>       | 2,43±0,18     | 0,53±0,03    | 2,47±0,17         | 0,58±0,04    |
| <b>LDL-C (g/L)</b>             | 1,41±0,05     | 0,19±0,02    | 1,43±0,04         | 0,17±0,02    |
| <b>HDL-C (g/L)</b>             | 0,57±0,04     | 0,28±0,03    | 0,52±0,04         | 0,29 ±0,02   |
| <b>Protéines totales (g/L)</b> | 72,40±3,30    | 51,60±4,88   | 67,80±5,08        | 55,50±4,36   |
| <b>Urée (g/L)</b>              | 0,25 ±0,02    | 0,22±0,04    | 0,26±0,04         | 0,23±0,05    |
| <b>Créatinine (mg/L)</b>       | 10,53±0,90    | 8,02±0,95    | 9,45±1,31         | 7,88±1,01    |
| <b>Acide urique (mg/L)</b>     | 25,20±4,88    | 18,90±2,74   | 28,70±3,95        | 17,81±2,95   |

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart type. La comparaison des moyennes entre les mères témoins et les mères diabétiques, et entre les nouveau-nés témoins et les nouveau-nés de mères diabétiques, est réalisée par le test t de student:

\* P < 0,01 ; \*\* P < 0,001.

**Tableau A2 : Marqueurs du stress oxydatif chez les mères et les nouveau-nés**

| Paramètres                                       | Groupe témoin    |                  | Groupe diabétique   |                    |
|--|------------------|------------------|---------------------|--------------------|
|  | Mères            | Nouveau- nés     | Mères               | Nouveau- nés       |
| <b>Vitamine C (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b> | 57,65 $\pm$ 3,08 | 34,15 $\pm$ 2,72 | 40,10 $\pm$ 3,97**  | 35,98 $\pm$ 2,56   |
| <b>Catalase (U/min/mL)</b>                       | 78,88 $\pm$ 3,44 | 34,27 $\pm$ 1,89 | 50,33 $\pm$ 2,15**  | 22,64 $\pm$ 1,40*  |
| <b>GSH (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>        | 5,23 $\pm$ 0,41  | 2,22 $\pm$ 0,14  | 2,60 $\pm$ 0,52**   | 1,22 $\pm$ 0,05*   |
| <b>PCAR (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>       | 3,47 $\pm$ 0,15  | 2,53 $\pm$ 0,13  | 5,26 $\pm$ 0,16 **  | 3,24 $\pm$ 0,15 *  |
| <b>ORAC (UI)</b>                                 | 3,63 $\pm$ 0,11  | 2,34 $\pm$ 0,07  | 1,49 $\pm$ 0,12**   | 1,52 $\pm$ 0,05 *  |
| <b>MDA (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>        | 2,30 $\pm$ 0,15  | 1,66 $\pm$ 0,13  | 4,72 $\pm$ 0,15 **  | 2,73 $\pm$ 0,21*   |
| <b>NO (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>         | 23,71 $\pm$ 4,50 | 15,13 $\pm$ 2,50 | 27,64 $\pm$ 4,08    | 14,22 $\pm$ 3,15   |
| <b>O2- (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>        | 8,37 $\pm$ 0,36  | 3,23 $\pm$ 0,23  | 14,65 $\pm$ 0,45 ** | 6,45 $\pm$ 0,34 ** |

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart type. GSH : glutathion réduit ; MDA : malondialdéhyde ; NO : monoxyde d'azote ; O2- : anion superoxyde ; ORAC : pouvoir antioxydant total; PCAR : protéines carbonylées. La comparaison des moyennes entre les mères témoins et les mères diabétiques, et entre les nouveau-nés témoins et les nouveau-nés de mères diabétiques, est réalisée par le test t de student:

\* P < 0,01 ; \*\* P < 0 ,001.

**Tableau A3 : Prolifération in vitro des lymphocytes en présence de différentes huiles chez les mères et leurs nouveau-nés**

| IP                       | Groupe témoin             |                           | Groupe diabétique           |                              |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------------|
|                          | Mères                     | Nouveau- nés              | Mères                       | Nouveau- nés                 |
| Con A                    | 216,26±15,94 <sup>b</sup> | 241,08±18,06 <sup>b</sup> | 187,94±15,87 <sup>**b</sup> | 194,96±13,54 <sup>** b</sup> |
| Con A + Insuline         | 258,79±19,48 <sup>a</sup> | 272,06±11,89 <sup>a</sup> | 219,17±14,96 <sup>* a</sup> | 243,89±16,90 <sup>* a</sup>  |
| Con A + Huile de lin     | 156,65±11,09 <sup>c</sup> | 131,39±14,06 <sup>d</sup> | 131,86±16,39 <sup>c</sup>   | 124,99±19,43 <sup>c</sup>    |
| Con A + Huile de nigelle | 254,40±12,61 <sup>a</sup> | 280,50±14,44 <sup>a</sup> | 221,64±12,19 <sup>* a</sup> | 246,12±13,61 <sup>* a</sup>  |
| Con A + Huile d'olive    | 204,95±16,52 <sup>b</sup> | 221,62±11,79 <sup>c</sup> | 172,84±16,12 <sup>* b</sup> | 185,28±18,11 <sup>** b</sup> |
| Con A + Vitamine E       | 242,72±12,23 <sup>a</sup> | 256,02±17,58 <sup>b</sup> | 217,84±17,02 <sup>* a</sup> | 235,83±15,37 <sup>* a</sup>  |

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart type. La comparaison des moyennes entre les mères témoins et les mères diabétiques, et entre les nouveau-nés témoins et les nouveau-nés de mères diabétiques, à chaque incubation, est réalisée par le test t de student: \*  $P < 0,01$  ; \*\*  $P < 0,001$ .

Les multiples comparaisons (entre les différentes incubations dans chaque groupe) sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de la différence significative minimale (LSD, least significant difference) afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

**Tableau A4 : Sécrétion des cytokines par les lymphocytes en présence de différentes huiles chez les mères et leurs nouveau-nés**

| Cytokines                | Groupe témoin             |                         | Groupe diabétique            |                            |
|--------------------------|---------------------------|-------------------------|------------------------------|----------------------------|
|                          | Mères                     | Nouveau- nés            | Mères                        | Nouveau- nés               |
| <b>IL-2 (Pg/mL)</b>      |                           |                         |                              |                            |
| Con A                    | 3241±113,44 <sup>b</sup>  | 1833±54,23 <sup>b</sup> | 2156±102,11 <sup>** b</sup>  | 1602±46,36 <sup>** b</sup> |
| Con A + Insuline         | 4563±131,17 <sup>a</sup>  | 1956±60,38 <sup>a</sup> | 3743±122,16 <sup>* a</sup>   | 1801±54,23 <sup>* a</sup>  |
| Con A + Huile de lin     | 2015±83,26 <sup>c</sup>   | 1185±57,39 <sup>d</sup> | 1938±76,25 <sup>c</sup>      | 1203±46,44 <sup>d</sup>    |
| Con A + Huile de nigelle | 4462±146,19 <sup>a</sup>  | 1904±53,06 <sup>a</sup> | 3892±116,34 <sup>** a</sup>  | 1817±43,22 <sup>* a</sup>  |
| Con A + Huile d'olive    | 3187±138,25 <sup>b</sup>  | 1725±56,21 <sup>c</sup> | 2232±106,32 <sup>** b</sup>  | 1511±40,53 <sup>c</sup>    |
| Con A + Vitamine E       | 4304±135,16 <sup>a</sup>  | 1933±43,24 <sup>a</sup> | 3738±132,26 <sup>** a</sup>  | 1800±41,26 <sup>* a</sup>  |
| <b>IL-4 (Pg/mL)</b>      |                           |                         |                              |                            |
| Con A                    | 52,35±5,63 <sup>b</sup>   | 42,31±4,53 <sup>b</sup> | 55,63±6,33 <sup>b</sup>      | 47,52±4,32 <sup>b</sup>    |
| Con A + Insuline         | 167,33±10,34 <sup>a</sup> | 78,55±6,55 <sup>a</sup> | 342,27±15,66 <sup>** a</sup> | 87,56±5,33 <sup>a</sup>    |
| Con A + Huile de lin     | 56,34±6,72 <sup>b</sup>   | 38,76±4,63 <sup>b</sup> | 61,53±6,33 <sup>b</sup>      | 43,22±4,25 <sup>b</sup>    |
| Con A + Huile de nigelle | 54,29±5,55 <sup>b</sup>   | 40,32±3,22 <sup>b</sup> | 63,32±6,42 <sup>b</sup>      | 44,21±3,57 <sup>b</sup>    |
| Con A + Huile d'olive    | 54,75±6,11 <sup>b</sup>   | 43,65±3,66 <sup>b</sup> | 60,23±5,53 <sup>b</sup>      | 45,30±3,58 <sup>b</sup>    |
| Con A + Vitamine E       | 53,42±4,68 <sup>b</sup>   | 44,23±3,27 <sup>b</sup> | 58,95±5,12 <sup>b</sup>      | 45,68±3,50 <sup>b</sup>    |

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart type. La comparaison des moyennes entre les mères témoins et les mères diabétiques, et entre les nouveau-nés témoins et les nouveau-nés de mères diabétiques, à chaque incubation, est réalisée par le test t de student: \* P < 0.01 ; \*\* P < 0.001.

Les multiples comparaisons (entre les différentes incubations dans chaque groupe) sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de la différence significative minimale (LSD, least significant difference) afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes (P < 0,05).

**Tableau A5 : Marqueurs Redox intracellulaires des lymphocytes chez les mères et leurs nouveau-nés**

| Paramètres du stress oxydatif         | Groupe témoin           |                         | Groupe diabétique        |                          |
|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                                       | Mères                   | Nouveau- nés            | Mères                    | Nouveau- nés             |
| <b>MDA (nM/10<sup>6</sup> cells)</b>  |                         |                         |                          |                          |
| Con A                                 | 3,50±0,15 <sup>b</sup>  | 2,15±0,16 <sup>c</sup>  | 4,16±0,10 <sup>*b</sup>  | 3,15±0,12 <sup>*b</sup>  |
| Con A + Insuline                      | 4,14±0,20 <sup>a</sup>  | 2,78±0,21 <sup>b</sup>  | 5,02±0,25 <sup>*a</sup>  | 4,06±0,21 <sup>*a</sup>  |
| Con A + Huile de lin                  | 2,63±0,17 <sup>c</sup>  | 1,92±0,15 <sup>c</sup>  | 2,88±0,18 <sup>c</sup>   | 2,18±0,14 <sup>c</sup>   |
| Con A + Huile de nigelle              | 3,19±0,18 <sup>c</sup>  | 1,74±0,13 <sup>d</sup>  | 3,28±0,33 <sup>c</sup>   | 1,82±0,14 <sup>d</sup>   |
| Con A + Huile d'olive                 | 2,58±0,10 <sup>c</sup>  | 1,51±0,07 <sup>d</sup>  | 2,49±0,29 <sup>c</sup>   | 1,64±0,09 <sup>d</sup>   |
| Con A + Vitamine E                    | 1,80±0,11 <sup>d</sup>  | 1,90±0,23 <sup>d</sup>  | 2,19±0,17 <sup>*c</sup>  | 2,26±0,19 <sup>*c</sup>  |
| <b>GSH (nM/10<sup>6</sup> cells)</b>  |                         |                         |                          |                          |
| Con A                                 | 17,45±1,28 <sup>c</sup> | 15,04±1,4 <sup>c</sup>  | 11,45±1,32 <sup>*d</sup> | 12,56±0,86 <sup>*d</sup> |
| Con A + Insuline                      | 29,96±1,46 <sup>a</sup> | 24,32±1,31 <sup>a</sup> | 18,86±1,48 <sup>*b</sup> | 20,3±1,16 <sup>*a</sup>  |
| Con A + Huile de lin                  | 15,92±2,13 <sup>c</sup> | 13,40±2,87 <sup>c</sup> | 15,87±1,59 <sup>c</sup>  | 14,34±1,86 <sup>c</sup>  |
| Con A + Huile de nigelle              | 16,21±1,31 <sup>c</sup> | 15,31±1,30 <sup>c</sup> | 16,27±1,01 <sup>c</sup>  | 16,78±1,76 <sup>c</sup>  |
| Con A + Huile d'olive                 | 17,17±1,99 <sup>b</sup> | 14,39±1,73 <sup>c</sup> | 16,40±1,13 <sup>c</sup>  | 15,35±1,12 <sup>c</sup>  |
| Con A + Vitamine E                    | 20,62±1,06 <sup>a</sup> | 17,23±1,50 <sup>b</sup> | 17,72±1,42 <sup>*b</sup> | 16,02±2,74 <sup>b</sup>  |
| <b>CARP (nM/10<sup>6</sup> cells)</b> |                         |                         |                          |                          |
| Con A                                 | 3,47±0,29 <sup>b</sup>  | 2,70±0,18 <sup>c</sup>  | 4,71±0,21 <sup>*a</sup>  | 3,42±0,22 <sup>*b</sup>  |
| Con A + Insuline                      | 4,44±0,30 <sup>a</sup>  | 3,09±0,27 <sup>b</sup>  | 5,79±0,30 <sup>*a</sup>  | 3,76±0,32 <sup>*b</sup>  |
| Con A + Huile de lin                  | 2,38±0,39 <sup>c</sup>  | 2,48±0,18 <sup>c</sup>  | 2,72±0,33 <sup>c</sup>   | 2,68±0,21 <sup>c</sup>   |
| Con A + Huile de nigelle              | 2,46±0,18 <sup>c</sup>  | 2,22±0,38 <sup>c</sup>  | 2,57±0,22 <sup>c</sup>   | 2,31±0,39 <sup>c</sup>   |
| Con A + Huile d'olive                 | 2,60±0,26 <sup>c</sup>  | 2,33±0,27 <sup>c</sup>  | 2,43±0,28 <sup>c</sup>   | 2,11±0,34 <sup>c</sup>   |
| Con A + Vitamine E                    | 2,54±0,28 <sup>c</sup>  | 2,69±0,29 <sup>c</sup>  | 3,61±0,22 <sup>*b</sup>  | 3,28±0,10 <sup>*b</sup>  |
| <b>Catalase (U/mg)</b>                |                         |                         |                          |                          |
| Con A                                 | 20,13±1,88 <sup>c</sup> | 18,53±1,02 <sup>b</sup> | 16,34±1,49 <sup>*c</sup> | 14,67±1,19 <sup>*d</sup> |
| Con A + Insuline                      | 38,06±1,53 <sup>a</sup> | 32,96±2,76 <sup>a</sup> | 26,40±1,46 <sup>*b</sup> | 25,75±1,61 <sup>*b</sup> |
| Con A + Huile de lin                  | 25,82±2,26 <sup>b</sup> | 18,15±2,92 <sup>b</sup> | 27,41±1,92 <sup>b</sup>  | 20,75±1,19 <sup>c</sup>  |
| Con A + Huile de nigelle              | 25,61±1,12 <sup>b</sup> | 19,26±1,06 <sup>b</sup> | 26,97±1,23 <sup>b</sup>  | 20,59±1,31 <sup>c</sup>  |

|                          |                          |                         |                          |                          |
|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Con A + Huile d'olive    | 24,13±2,13 <sup>b</sup>  | 19,54±2,44 <sup>b</sup> | 24,54±2,77 <sup>b</sup>  | 21,41±2,92 <sup>c</sup>  |
| Con A + Vitamine E       | 26,02±1,81 <sup>b</sup>  | 27,06±1,25 <sup>b</sup> | 29,51±1,67* <sup>a</sup> | 31,18±1,27* <sup>a</sup> |
| <b>SOD (U/mg)</b>        |                          |                         |                          |                          |
| Con A                    | 80,32±2,54 <sup>b</sup>  | 44,34±1,13 <sup>c</sup> | 56,27±2,31* <sup>b</sup> | 35,63±1,18* <sup>c</sup> |
| Con A + Insuline         | 123,35±6,11 <sup>a</sup> | 72,38±2,42 <sup>b</sup> | 81,03±5,27* <sup>b</sup> | 56,99±2,11* <sup>b</sup> |
| Con A + Huile de lin     | 128,25±8,33 <sup>a</sup> | 70,77±3,17 <sup>b</sup> | 122±7,42 <sup>a</sup>    | 68,06±4,19 <sup>b</sup>  |
| Con A + Huile de nigelle | 125,57±7,17 <sup>a</sup> | 73,63±2,88 <sup>b</sup> | 123,61±9,22 <sup>a</sup> | 71,72±3,36 <sup>b</sup>  |
| Con A + Huile d'olive    | 128,33±9,31 <sup>a</sup> | 71,39±4,15 <sup>b</sup> | 125,54±6,66 <sup>a</sup> | 70,62±1,14 <sup>b</sup>  |
| Con A + Vitamine E       | 91,37±4,55 <sup>b</sup>  | 50,82±1,36 <sup>b</sup> | 90,36±3,11 <sup>b</sup>  | 52,73±2,88 <sup>b</sup>  |

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart type. La comparaison des moyennes entre les mères témoins et les mères diabétiques, et entre les nouveau-nés témoins et les nouveau-nés de mères diabétiques, à chaque incubation, est réalisée par le test t de student: \* P < ,01 ; \*\* P < 0,001.

Les multiples comparaisons (entre les différentes incubations dans chaque groupe) sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de la différence significative minimale (LSD, least significant difference) afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes (P < 0,05).