

République Algérienne Démocratique et populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la  
Recherche Scientifique

Université ABOU BEKR BELKAID Tlemcen  
Faculté des Sciences  
Département de Biologie

THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU

DIPLOME DE DOCTORAT  
En

BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

Présentée par

Mme GUERMOUCHE BAYA CHAHINEZE

ROLE DES ACIDES GRAS POLYINSATURES  
ALIMENTAIRES DANS LA MODULATION DU SYSTEME  
IMMUNITAIRE CHEZ LA RATE GESTANTE DIABETIQUE  
ET CHEZ SES NOUVEAUX-NES

Soutenu le 02/2006, devant la commission d'examen

Professeur  
Professeur  
Professeur  
Docteur  
Docteur  
Professeur

M. A. KHELLIL  
D. SAIDI  
A. AOUES  
M. BELARBI  
R. DJAZIRI  
H. MERZOUK

Président  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de Thèse

D47/3

le N° AA.4.6...  
2007...  
Date

**République Algérienne Démocratique et populaire**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la  
Recherche Scientifique**

**Université ABOU BEKR BELKAID Tlemcen  
Faculté des Sciences  
Département de Biologie**

**THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU**

**DIPLOME DE DOCTORAT  
En**

**BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE**

**Présentée par**

**Mme GUERMOUCHE BAYA CHAHINEZE**

**ROLE DES ACIDES GRAS POLYINSATURES  
ALIMENTAIRES DANS LA MODULATION DU SYSTEME  
IMMUNITAIRE CHEZ LA RATE GESTANTE DIABETIQUE  
ET CHEZ SES NOUVEAUX-NES**

**Soutenu le 02/2006, devant la commission d'examen**

**Professeur  
Professeur  
Professeur  
Docteur  
Docteur  
Professeur**

**M. A. KHELLIL  
D. SAIDI  
A. AOUES  
M. BELARBI  
R. DJAZIRI  
H. MERZOUK**

**Président  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de Thèse**

## REMERCIEMENTS

Je remercie Madame M Merzouk, professeur à l'université de Tlemcen, qui a guidé judicieusement ces recherches. Je garde en mémoire ces conseils bien vaillants, son infatigable dévouement, ses encouragements et son soutien moral durant les moments difficiles. Qu'elle veuille bien accepter les témoignages de ma grande admiration et de ma gratitude pour ses remarquables qualités humaines et ses connaissances scientifiques.

Je remercie Mr. KHAN, professeur à l' Université de Bourgogne, pour avoir pris en charge ce travail avec beaucoup d'intérêt et de patience. Je lui exprime ma profonde reconnaissance pour son importante aide, ses précieux conseils et sa constante disponibilité. Qu'il veuille bien accepter l'expression de ma profonde et respectueuse gratitude

Je remercie Mr A. HICHAMI, Maître de conférence à l'Université de Bourgogne pour avoir mis à ma disposition tous les moyens tant matériels que scientifiques, indispensables à la réalisation de ce travail de recherche. Je tiens à lui exprimer ma sincère reconnaissance pour m'avoir appris les techniques de laboratoires. Sa sensibilité pour mes problèmes m'a particulièrement touchée. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude et toute mon estime.

Je remercie Mr M.A. KHELLIL, professeur à l'Université de Tlemcen, de l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail en acceptant de présider le jury de cette thèse. Qu'il soit assuré de ma sincère reconnaissance.

Je remercie Mr Saidi, professeur en Physiologie de la nutrition à l'Université d'Oran, pour l'attention qu'il a bien voulu porter en acceptant de le juger et de faire partie du jury de thèse. Qu'il soit assuré de ma sincère reconnaissance.

Je remercie Mr A. Aoues, professeur en biochimie à l'Université d'Oran , pour l'attention qu'il a bien voulu porter à ce travail en acceptant de le juger et de faire partie du jury de thèse. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

Je remercie Mme M. BELARBI, Maître de conférence à l'Université de Tlemcen, de l'intérêt qu' elle a bien voulu porter à ce travail en acceptant de le juger et de faire partie du jury de ma thèse. Qu'elle soit assuré de ma profonde gratitude.

Je remercie Mr R.DJAZIRI, Maître de conférence de Tlemcen, pour l'attention qu'il a bien voulu porter à ce travail en acceptant de le juger et de faire partie du jury de thèse. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

Je remercie V.Aires et A.Girard, Doctorantes à l'Université de Bourgogne, pour avoir bien voulu consacrer le temps nécessaire à la manipulation des appareils. Je leurs exprime ma profonde reconnaissance et mon estime.

Je remercie également tout le personnel de l'unité de recherche de nutrition cellulaire et métabolique et particulièrement Mme J. Prost, Mr J GRESTI, et Mme S. ROBLET pour leur disponibilité et aide technique.

Je remercie également toute l'équipe du laboratoire de nutrition de l'Université de Tlemcen pour leur aide technique et leur soutien moral.

Enfin, je remercie tout ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail

## **PUBLICATION**

**Publication internationale dans obesity research (novembre 2004) : N-3 fatty acids modulate T-cell calcium signaling in obese macrosomic rats.**

## **COMMUNICATIONS**

**Deuxième Forum sur la recherche en santé, le 18/06/ 2002, Faculté de Médecine, Tlemcen, Algérie.**

**GUERMOUCHE BC., SOULIMANE N., MERZOUK H., KHAN N.**

**Importance des acides gras polyinsaturés dans la modulation du système immunitaire au cours du diabète : Implication de la signalisation lymphocytaire.**

**SOULIMANE N., GUERMOUCHE BC., MERZOUK H., KHAN N**

**Rôle des acides gras polyinsaturés alimentaires dans le métabolisme des lipoprotéines chez la rate gestante diabétique et ses nouveaux nés.**

**Journée d'étude sur la démoustication dans les zones urbaines et balnéaires, le 02/06/2002, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Tlemcen, Algérie.**

**GUERMOUCHE BC., SOULIMANE N., MERZOUK H., KHAN N**

**Rôle des acides gras polyinsaturés alimentaires dans le métabolisme des lipoprotéines et la modulation du système immunitaire au cours de la macrosomie.**

**Premières Journées d'étude sur les lipides et lipoprotéines, le 12/06/2002, Faculté de Médecine, Constantine, Algérie.**

**GUERMOUCHE BC., SOULIMANE N., MERZOUK H., KHAN N**

**Rôle des acides gras polyinsaturés alimentaire dans le métabolisme des lipides et dans la modulation du système immunitaire chez la rate gestante diabétique et ses nouveaux nés.**

**SOULIMANE N., GUERMOUCHE BC., MERZOUK H., KHAN N**

Importance des AGPI alimentaire au cours des perturbations du métabolisme des lipides et lipoprotéines chez la rate gestante diabétique et ses nouveaux nés.

**Premières journées sur la protection de l'environnement, 28 et 29 /05/2003.**

**Faculté des Sciences, Département de Biologie, Tlemcen, Algérie.**

**GUERMOUCHE BC., SOULIMANE N., SAKER M., MERZOUK H., HICHAMI A., KHAN N.**

Effet d'un régime enrichi en acides gras poly insaturés sur la signalisation du calcium intracellulaire lymphocytaire au cours du diabète gestationnel.

**SOULIMANE N., GUERMOUCHE BC., SAKER M., MERZOUK H., HICHAMI A., KHAN N.**

Effet d'un régime enrichi en acides gras poly insaturés sur les perturbations du métabolisme des lipoprotéines chez les rats macrosomiques.

**71ième Congrès de la Société de Physiologie. 15-17 septembre 2004, Paris. France.**

**HICHAMI A., GUERMOUCHE B., SOULIMANE N., YESSOUFOU A., MERZOUK H., MOUTAIROU K., KHAN NA. (2004).**

**N-3 fatty acids modulate T-cell calcium signalling in obese macrosomic rats.**

# SOMMAIRE

<b>AVANT PROPOS.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>7</b>
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>38</b>
<b>RESULTATS ET INTERPRETATIONS.....</b>	<b>47</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>92</b>
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>117</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>122</b>

## ABBREVIATIONS.

AA : acide arachidonique

AGE : acides gras essentiels.

AGPI : acides gras polyinsaturés.

AGS : acides gras saturés

ALA : acide  $\alpha$ -linoléinique

B: bilan

BA : bilan azoté

BSA: bovine serum albumin

$Ca^{2+}$ ] : calcium intracellulaire

CCM: chromatographie sur couche mince

CL : Cholestérol libre

CMH : complexe d'histocompatibilité

Con A : concavoline A

CPG: chromatographie en phase gazeuse

CRAC ;  $Ca^{2+}$ -release activated  $Ca^{2+}$ -channels

CT : Cholesterol total

$CUD_L$ : Coefficient d'utilisation apparente des lipides

$CUD_N$ : Coefficient d'utilisation digestive apparente de l'azote.

DAG : diacylglycérol

DHA : acide docosahexaénoïque

DID : diabète insulino dépendant

DNID : diabète non insulino dépendant

EDTA : acide éthylènediamine-tétraacétique

EGF : facteur de croissance épidermique

EPA : acide eicosapentaénoïque

HDL : High density lipoprotein

HEPES : acide N-[2-hydroxyéthyl]piperazin N'-[2-éthane-sulfonique]



Ig: immunoglobuline

IL-1,2,10 : interleukine 1,2,10.

IL-2R : récepteur de l'interleukine 2

INF : interferon

iono. : ionomycine

IP3 : inositol -1,4,5-triphosphate

LCAT : lécithine cholesterol acyl transférase

LDL : Low density lipoprotein

LPL : Lipoprotéine lipase

MAI : maladie auto immune

MAPK : protéine kinase mitogène activée

NK : natural killer

NOD : Diabétique non obèse

OPD: orthophénylène-diamine

PBS: Physiological buffer serum

PHA : phytohaemagglutinin

PIP<sub>2</sub> : Phosphatidyl inositol-4-5 biphosphate

PKC : protéine kinase C

PL : phospholipides

PLD : phospholipase D

RE : reticulum endoplasmique

PR : polyarthrite rhumatoïde

REN : Rapport d'efficacité nutritionnelle

STZ: streptozotocine

TCR : récepteur des cellules T

Tg : Thapsigargine

TG : Triglycérides

TGF : facteur de croissance tumoral

TNF : facteur de nécrose tumorale

VLDL : lipoprotéine de très petite densité

## AVANT PROPOS

L'huile de foie de morue était très utilisée par nos grands parents au cours des hivers. Sa richesse en vitamine D était la première raison de son utilisation. Mais depuis les années 1970 de nombreuses études concernant les effets bénéfiques des huiles de poisson ont été réalisées. L'étude danoise, aujourd'hui bien connue, menée chez les esquimaux du Groenland, dont le régime alimentaire est en majorité à base de poisson, a démontré que cette population était peu touchée par les maladies cardiovasculaires ou par des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin par exemple (Bang *et al.*, 1980). Quelques années plus tard, Kromhout *et al.* (1985) montrent que la consommation quotidienne de 30g de poisson par jour diminue la mortalité par accident coronarien. Les premiers effets observés concernaient plutôt les problèmes cardiovasculaires.

Depuis de nombreuses études concernant l'effet de certains acides gras, en particulier les acides gras polyinsaturés, sur le développement de maladies inflammatoires ou auto-immunes ont été réalisées. Les premières études cliniques ont donné dans l'ensemble des résultats discordants dus certainement à l'hétérogénéité des groupes, au faible nombre des malades et également à une mauvaise tolérance des préparations utilisées. Mais aujourd'hui, les effets bénéfiques des acides gras de la famille n-3, principaux acides gras des huiles de poissons, sont totalement élucidés.

Depuis une vingtaine d'années, les recherches concernant "l'alimentation une voie thérapeutique" se sont développées. D'une manière générale, des études nutritionnelles ont montré que l'addition d'acides gras polyinsaturés dans

l'alimentation réduit la mortalité cardiovasculaire, le développement de certains cancers et diminue les symptômes de certaines pathologies inflammatoires.

Dans cette étude, le pouvoir immunorégulateur des acides gras polyinsaturés (AGPI) nous intéresse particulièrement.

De nombreuses études concernant les AGPI de la famille n-6 ont été réalisées laissant les AGPI de la famille n-3 de côté (Harbige et al., 1998). Cependant les effets bénéfiques des AGPI de la famille n-3 commencent à être connus et bien documentés (Harbige et al., 1998). En effet, le caractère "enrichi en omega 3" devient une force de vente puisqu'on le voit apparaître de plus en plus sur certains produits tels que les huiles ou les margarines. On trouve également dans le commerce des "œufs omega 3". Ces œufs sont pondus par des poules dont la moulée est enrichie en graines de lin.

D'autre part, différentes études épidémiologiques ont mis en évidence qu'il existe une corrélation entre les habitudes alimentaires et le pourcentage de personnes atteintes de maladies cardiovasculaires et cancers dans certaines régions de France ou dans certains pays. Ainsi le régime crétois ou méditerranéen diminue le développement du cancer de 10 à 15% par rapport au régime dit de l'ouest (Trichopoulou et al., 2000). La richesse de ce régime en AGPI semble être responsable de ses effets. Ces acides gras sont apportés par le poisson et l'huile d'olive contenus dans ce régime. Certains auteurs ont également mis en évidence que le régime japonais, également riche en poisson, va dans le même sens (Okita et al., 1995).

Cependant, les mécanismes d'actions de ces acides gras sont encore peu connus. Ils interviennent directement sur la composition en acides gras des membranes et donc sur leurs propriétés biologiques et physiologiques (Singh et al., 1988). Ils interviennent également indirectement par l'intermédiaire de leurs métabolites.

Le diabète représente un facteur très important de maladies cardio-vasculaires, de plus il représente un facteur de risque très important du dysfonctionnement du système immunitaire qui aggrave les complications vasculaires du diabétique (Delovith et al., 1997 ; Mc carty., 1999) . En outre l'importance des lymphocytes dans la survenue du diabète auto-immun est actuellement bien établie. De nombreuses études ont montré qu'il existe un dysfonctionnement de l'homéostasie des lymphocytes T sur les sujets atteints de pathologies chroniques (diabète, hypertension) (Beatlle et a., 1990). L'étude du diabète se justifie particulièrement en Algérie où son incidence est élevée de 2 à 4% de la population générale. En Algérie, l'alimentation de type méditerranéen présente des caractéristiques propres qui lui donnent une originalité avec consommation plus élevée en acide AGPI comparée à celles des pays européens (Renaud et al., 1995). Ce mode alimentaire est associé à une diminution du risque cardiovasculaire (Stampfer et al., 2000). Ainsi la fonction immunitaire chez le diabétique consommant un tel régime suscite un intérêt particulier, et il existe très peu d'étude sur les interrelations entre ce régime et la modulation du système immunitaire au cours du diabète.

Les réactions auto-immunes associées au diabète insulino-dépendant de type I sont très sélective et commencent souvent avant l'âge adulte et principalement chez la progéniture des mères diabétiques (Herrera et al., 1985). Il a été établi que les complications observées lors de grossesses diabétiques ne sont pas seulement liées aux altérations métaboliques mais aussi à des modifications immunologiques (Lapolla et al., 1999). Sachant que le système immunitaire est significativement altéré lors du diabète de type I chez la mère, d'autres auteurs ont démontré que les enfants de mères diabétiques présentent des désordres immunologiques importants faisant intervenir les lymphocytes entraînant d'une part une altération de la sécrétion des cytokines (Chang et Shaio, 1995 ; Rabinovitch, 1999) et d'autre part une augmentation de l'incidence des infections (Itoh, 1989). Cependant très peu de travaux rapportent l'évolution post natale du statut immunitaire chez les enfants de mères diabétiques (Roll et al., 1984).

Au cours de ces dernières années, de nombreux travaux ont été réalisés sur la modulation du système immunitaire par les AGPI en n-3 qui sont actuellement considérés comme immunosuppresseurs (Calder, 1996). En effet une alimentation supplémentée en AGPI n-3 engendre une suppression de la prolifération in vitro (Endres et al., 1993). Par ailleurs il a été démontré que les AGPI n-3 exercent des effets curatifs dans certaines maladies auto immunes comme les polyarthrites rhumatoïdes (Carruthers et al., 1988 ). Ainsi une alimentation riche en AGPI n-3 diminue le risque cardio vasculaire (Knopp, 1989) en agissant sur les cellules du système immunitaire. Cependant, bien que de

nombreuses études aient été réalisées, le mode d'action à l'échelle cellulaire et moléculaire de ces acides gras n'est pas encore clairement établi. On suppose qu'ils pourraient entrer en compétition avec les AGPI en n-6, en particulier l'acide arachidonique (AA) au niveau de la position n-2 des phospholipides membranaires (Gallai et al., 1995). Il est d'autre part possible que les AGPI, notamment de la famille n-3, acide eicosapentaénoïque (EPA, C20 : 5n-3) et acide docosahexaénoïque (DHA, C22 : 6n-3) incorporés dans la bicouche lipidique soient libérés par l'action de la phospholipase A2 cytosolique (Sumida et al., 1993) puis métabolisés en dérivés eicosanoides n-3 qui ont des actions différentes de ceux des AGPI n-6 normalement synthétisés à partir de l'acide arachidonique (Blond, 1992). Il apparaît clairement que les AGPI n-3, vu leur rôle immunomodulateur, peuvent exercer des effets bénéfiques sur les anomalies immunologiques observées au cours du diabète, chez la mère et même chez sa progéniture.

Dans ce travail, nous avons utilisé un modèle expérimental, la rate rendue diabétique par la streptozotocine et son nouveau-né diabétique, afin de mieux comprendre les altérations du système immunitaire au cours de la grossesse diabétique, et d'éclaircir les mécanismes d'action des AGPI n-3. En effet, un régime enrichi en AGPI n-3 (EPAX 7010) est donné aux rates diabétiques et à leur descendance dès le sevrage. La rate gestante est un bon modèle expérimental de la grossesse et de ses modifications métaboliques et immunologiques. L'administration de la streptozotocine au 5<sup>ème</sup> jour de la gestation permet de provoquer une hyperglycémie chez la rate gestante qui

entraîne par la suite une hyperglycémie fœtale. Ainsi la situation est comparable à celle d'une grossesse chez la femme diabétique insulino dépendante dont le diabète est mal contrôlé, ce qui majore la prévalence de l'obésité fœtale suite à l'hyperinsulinisme fœtal. A la naissance, l'excès de poids, l'hyperglycémie et l'hyperinsulinisme sont les critères de sélection de la progéniture diabétique (rats diabétiques de mères diabétiques). Ces rats sont suivis jusqu'à l'âge adulte (3mois). Ainsi dans cette étude, nous nous sommes fixés plusieurs objectifs :

1- Le premier objectif est d'approfondir nos connaissances sur les altérations du système immunitaire associées au diabète et de démontrer que les AGPI peuvent constituer un bon moyen pour améliorer les stratégies de prévention du traitement du diabète.

2- Le deuxième objectif est de déterminer si les actions immunosuppressives induites par les AGPI en n-3 chez les mères gestantes diabétiques et leurs progénitures sont responsables de leurs effets antidiabétiques et s'ils exercent leurs actions en modulant la signalisation calcique lymphocytaire-T.

3- le troisième objectif est de déterminer la composition en acides gras des phospholipides des membranes lymphocytaires et d'évaluer la prolifération des lymphocytes au cours du diabète et leurs modifications après un régime enrichi en AGPI n-3.

Le suivi des rats nés de mères diabétiques implique l'évolution.

- Du poids corporel.
- Des teneurs sériques en glucose et en insuline
- Les teneurs sériques en cholestérol total, triglycérides et phospholipide

- De la prolifération lymphocytaire-T
- De la sécrétion de l'interleukine -2
- De l'homéostasie calcique des splénocytes-T (calcium intracellulaire)
- De la composition en acide gras des phospholipides des membranes lymphocytaires



## **I. INTRODUCTION**

Le diabète sucré est un syndrome regroupant un ensemble de maladies métaboliques, qui convergent toutes vers une hyperglycémie. Celle-ci est due dans certains cas à une anomalie de sécrétion de l'insuline et on parle de diabète insulino-dépendant (DID) ou diabète de type I (Buysschaert, 1998 ; Proietto, 1999).

Le DID ou le diabète jeune est causé par une destruction progressive des cellules B des îlots de Langerhans qui produisent l'insuline et malgré les études poussées dans ce domaine, les mécanismes impliqués dans cette destruction demeurent obscurs (Yoon et al., 1997).

Comprendre les mécanismes de cette destruction est essentiel d'un point de vue tant physiopathologique que thérapeutique. Heureusement aujourd'hui, le champ de l'immunologie s'étend au delà de la nature des maladies et leur prévention : la recherche s'oriente vers des nouvelles approches du traitement des cancers (Nossal, 1993) et des pathologies dues au dysfonctionnement de la réaction immunitaire (Nossal, 1993).

Dans le système immunitaire de chaque individu, il y'a un phénomène de tolérance qui se définit comme l'absence d'agression pathogène vis-à-vis des constituants du soi, et c'est une propriété acquise au cours du développement lors de la différenciation des lymphocytes T et B . Mais tout individu est exposé à des maladies auto-immunes (MAI) dues à des lymphocytes T et/ou B spécifiques d'auto antigènes, c'est à dire d'épitopes ou de peptides faisant partie des constituants naturels de l'organisme. La présence de lymphocytes T et B auto réactifs est une caractéristique tout à fait normale de tout organisme (Arnold et al., 1993)

Malheureusement il y'a des lésions dues à la mise en jeu d'une réaction immunitaire vis-à-vis des constituants du soi. Certaines maladies chroniques, dont le diabète de

type I surtout sont dues à l'effet pathogène des lymphocytes auto réactifs (Bach, 1994).

Les influences génétiques et les facteurs déclenchant liés à l'environnement peuvent entraîner l'effondrement de la régulation immunologique normale. Dans ce cas, les lymphocytes T ou B ou les deux à la fois, réagissent avec des auto-antigènes en attaquant les propres cellules de l'organisme, ce qui entraîne des maladies auto-immunes dévastatrices. Certains désordres de ce type proviennent d'une erreur de ciblage des anticorps, pour d'autres maladies auto immunes, ce sont les lymphocytes qui sont responsable de la maladie (Rose et Mackey, 1992).

Le diabète s'accompagne de modifications importantes du système immunitaire (Delovitsch et Singh, 1997) ce qui aggrave les complications vasculaires du diabétique.

En outre, l'importance des lymphocytes T dans la survenue du diabète auto immun est actuellement bien établie (Marrack et Kappler, 1993 ; Nossal, 1993). De plus, plusieurs études montrent que la fonction des lymphocytes T, notamment la sécrétion des cytokines est altérée au cours du diabète de type I (Chang et Shaio, 1995 ; Rabinovitch, 1999).

L'incidence des infections est élevée chez les diabétiques de type I (Itoh, 1986). Ceci est dû à des anomalies du système immunitaire.

Au cours de ces dernières années, de nombreux travaux ont été réalisés sur l'immuno-modulation par les acides gras poly insaturés, notamment de la famille n-3 (EPA et DHA) qui sont considérés comme des immunosuppresseurs. Les mécanismes d'actions pourraient être liés à une modification de la sécrétion des cytokines ou de la composition en acides gras des lipides des membranes des

lymphocytes T (Harbige, 1998). Ainsi, les effets des immunosuppresseurs des AGPI n-3 peuvent être exploités dans la prévention et le traitement du diabète sucré.

## **II Diabète et grossesse**

L'association diabète et grossesse peut entraîner une exagération des troubles du métabolisme des glucides et des lipides. Au cours de la grossesse, les femmes diabétiques insulino-dépendantes présentent une hyperglycémie qui varie suivant le niveau de contrôle du diabète ( Montelongo et al., 1992 ; Merzouk et al., 2001 ; Merzouk et al., 2002). De plus, il peut exister une forte élévation des teneurs sériques en acides gras libres et en triglycérides et une diminution des teneurs de cholestérol total, en HDL<sub>3</sub>-cholestérol, en apo A-I et apo A-II (Knopp et al., 1993 ; Merzouk et al., 2001 ; Merzouk et al., 2002).

La grossesse chez la femme diabétique entraîne des altérations plus marquées du métabolisme du glucose et des lipides et un déficit en insuline, et par conséquent à une forte augmentation de la glycémie. La déficience en insuline a pour effet de faciliter la lipolyse, dont l'une des conséquences est la formation accrue de corps cétoniques. De plus, le diabète insulino-dépendant chez la femme enceinte s'accompagne de taux plasmatiques élevés en triglycérides, en acides gras libres et en cholestérol (Merzouk et al., 2001). Une élévation plus marquée des VLDL et des LDL et une réduction des HDL sériques, associées à des modifications de la composition de ces lipoprotéines sont présentes (Merzouk et al., 2001 ; Merzouk et al., 2002).

Étant donné que le glucose constitue le substrat énergétique essentiel du fœtus et qu'il est transporté dans le placenta par un mécanisme de diffusion facilitée, l'hyperglycémie maternelle conduit à l'hyperglycémie fœtale. Cette dernière stimule le pancréas fœtal, ce qui entraîne une hyperplasie des cellules  $\beta$  et un

hyperinsulinisme fœtal, à l'origine de la macrosomie foetale. En effet, on admet qu'il y'a macrosomie (obésité foetale) si le poids de naissance à terme dépasse 4000g. La macrosomie foetale est le reflet d'une augmentation de l'adiposité, mais aussi des masses musculaires et d'une organomégalie. En effet, plusieurs études montrent qu'en plus de l'excès de tissus adipeux, les macrosomiques présentent à la naissance une hypertrophie et une hyperplasie de la plupart des organes (muscles, foie, cœur, poumon, thymus.....)à l'exception du cerveau et des reins (Hill, 1978 ; Cowett&Schwartz, 1982 ; Merzouk et al., 2000). La croissance foetale accélérée est le résultat de l'effet combiné d'un hyperinsulinisme fœtal et d'un apport important de nutriments. (Calandra et al., 1981 ; Breschi et al., 1993 ; Merzouk et al., 2000).

Il a été bien établi que l'hyperglycémie maternelle, même modérée, est responsable de l'hyperinsulinisme fœtal ( Breschi et al., 1993 ; Hoegsberg et al.,1993 ; Simmons, 1994). De plus, la fréquence de la macrosomie reste plus élevée chez les mères gestantes diabétiques dont la glycémie a été pourtant bien contrôlée tout au long de la grossesse (Small et al., 1987).

une hypertrophie et une hyperplasie des cellules  $\beta$  pancréatiques sont présentes chez les macrosomiques ( Pedersen et al.,1961 ; Cowett et Shwartz., 1982 ; De villiers et al., 1984). Ces changements morphologiques sont associés à une élévation du contenu pancréatique en insuline et à une maturation précoce des mécanismes de sécrétion de l'insuline (De Villiers et al., 1984) et un accroissement du nombre et de l'affinité des récepteurs à l'insuline (Pedersan et al., 1981 ; Kaplan, 1984 ; Lautala et al., 1988), ce qui accentue les effets de l'hyperinsulinisme fœtal. Les études expérimentales mettent en évidence l'effet anabolisant de l'insuline pendant la période de développement foetal. En effet l'administration d'insuline in utero à des foetus de rats entraîne une augmentation de la taille, du poids et de l'importance du

tissu adipeux à la naissance (Picon, 1967; Hill, 1978). Les mêmes résultats ont été obtenus par Susa et al. (1984) après infusion d'insuline à des fœtus de singe Rhésus. Ainsi, l'hyperinsulinisme fœtal est à l'origine d'un accroissement de la synthèse du glycogène, d'un anabolisme protéique et d'un stockage lipidique, d'où un développement excessif de tissu adipeux, responsable de la macrosomie ( Hill, 1978). Les travaux de Enzi et al. (1981) montrent que l'augmentation du poids de naissance est surtout liée au développement du tissu adipeux fœtal, avec enrichissement de son contenu en triglycérides.

Les concentrations plasmatiques en acides aminés sont élevées chez les femmes gestantes diabétiques, et sont aussi corrélées positivement au poids de naissance (Kalkhoff et al., 1988). Ces auteurs suggèrent qu'un transfert excessif d'acides aminés à travers le placenta peut constituer un facteur contribuant au développement de la macrosomie fœtale. En plus de leur rôle dans la synthèse protéique, certains acides aminés sont des puissants sécrétagogues de l'insuline. C'est le cas de la leucine et de l'arginine qui stimulent la sécrétion de l'insuline par les cellules B chez le fœtus (Milner et al., 1972). D'autres études rapportent que les concentrations en peptide C du liquide amniotique (Reflète de la sécrétion d'insuline fœtale) sont augmentées chez les diabétiques gestantes et sont corrélées positivement non seulement aux teneurs sériques maternelles en glucose, mais aussi à celles en acides aminés (Ogata et al., 1980 ; Persson et al., 1986).

A côté de l'abondance de l'apport en nutriments et de l'hyperinsulinisme fœtal à l'origine de la macrosomie, d'autres facteurs hormonaux peuvent affecter le développement fœtal. Un taux élevé de somatomédines (IGFs, servant d'intermédiaires à l'action de l'hormone de croissance) favorise la multiplication cellulaire et contribue à la macrosomie fœtale (Ericksson et al., 1980 ; Susa et al.,

1984 ; Hall et al., 1986 ; Delmis et al., 1992). De plus lors d'une grossesse normale. Hill et al. (1989) mettent en évidence une corrélation positive et significative entre les concentrations en IGF dans le sang de cordon et le poids de naissance à terme. Comme l'insuline stimule la production de somatomédines par le foie (Daughaday et al., 1976), ceci peut expliquer que l'hyperinsulinisme fœtal s'accompagne d'une augmentation des concentrations sériques fœtales en IGFs, parallèle à l'élévation du poids de naissance (Delmis et al., 1992).

D'autres études montrent que l'activité des hormones de contre-régulation de l'insuline, notamment le glucagon et la noradrénaline est défectueuse chez les enfants de mères diabétiques (Light et al., 1967 ; Bloom et Johnston, 1972 ; Hertel et al., 1980 ; Kuhl et al., 1982).

La fréquence de survenue du diabète et de l'obésité est accrue chez ces nouveaux-nés macrosomiques de mères diabétiques. En effet, les nouveaux nés obèses sont plus prédisposés à l'obésité durant l'adolescence (Vohr et al., 1980 ; Pettitt et al., 1983 et 1991). Cette obésité favorise le développement du diabète à l'âge adulte (Lebovitz, 1984). Plagemann et al. (1997) rapportent, qu'à l'âge adulte la fréquence de l'intolérance au glucose est élevée chez les enfants de mères diabétiques. Le rapport insuline/ glucose, chez ces enfants est corrélé positivement à la valeur trouvée à la naissance. Les adolescents nés de mères diabétiques présentent souvent une hyperglycémie, un hyperinsulinisme et une augmentation du rapport insuline/glucose, reflet d'une insulino-résistance (Silverman et al., 1995 ; Purdy et al., 1996). D'autres travaux soulignent que l'hyperinsulinisme fœtal est un facteur prédisposant à l'obésité et au diabète non insulino-dépendant à l'âge adulte (Dorner et Plagemann, 1994 ; Mc Cance et al., 1994).

### **III Diabète et système immunitaire**

Le diabète s'accompagne de modifications importantes du système immunitaire (Delovitsch et Singh, 1997). Les réactions auto-immunes associées au diabète - insulino dépendant de type I sont très sélectives et commencent souvent avant l'âge adulte. Le système immunitaire, dans ce cas, attaque uniquement les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans. Dans le pancréas des sujets diabétiques, les îlots sont envahis de macrophages, de lymphocytes et contiennent des auto anticorps anti-cellules  $\beta$  et anti insuline (Assan, 1985).

#### **1- Mécanismes d'induction du diabète**

Le diabète insulino dépendant est une maladie chronique de l'enfance causé par la perte progressive des cellules pancréatiques  $\beta$  productrices d'insuline, provoquant un état d'hypo- insulinémie et d'hyperglycémie (Bach, 1995 ; Tisch et al., 1996).

Connaître les mécanismes impliqués dans l'initiation de l'auto- immunité spécifique aux cellules  $\beta$  et la progression de leur destruction, résultant de la collaboration entre les macrophages et les cellules T, en association avec les auto-antigènes des cellules  $\beta$ , des antigènes du CMH de classe I et II sont essentiels pour vaincre la maladie.

#### **1-1 Rôle des macrophages dans cette auto-immunité :**

Plusieurs études démontrent que la majeure partie de la population cellulaire qui infiltre les îlots durant les premiers stades du diabète sont les macrophages et les cellules dendritiques (Kolb et al., 1986 ; Ziegler, 1992). Ces cellules précèdent l'invasion des îlots par les lymphocytes T, les cellules NK et les lymphocytes B (Lee et al., 1988).

Les macrophages jouent des rôles importants dans l'initiation du diabète (Lee et al., 1988).

Parmi ces rôles clés, la présentation restreinte des antigènes aux cellules T helper grâce aux molécules du CMH de classe II reste le plus important (Unuaue et al., 1984).

La réponse immune aux antigènes spécifiques présents sur les cellules  $\beta$  du pancréas implique l'activation des cellules T helper, un événement qui ne prend place que si les cellules T helper interagissent avec les antigènes présentés sur la surface des macrophages ou tout autre cellule présentatrice de l'antigène comme la cellule dendritique (Unuaue et al., 1987).

Ceci suggère que la présentation des auto- antigènes spécifiques aux cellules  $\beta$  par les macrophages et/ou les cellules dendritiques aux cellules T helper peut être l'étape initiale au développement d'une destruction des cellules  $\beta$  spécifiques au diabète insulino-dépendant auto- immun (Nagata et al., 1992 ; Yoon et al., 1999).

### **1-2 Les cellules T**

Les lymphocytes T ont un rôle dans l'immunité à médiation cellulaire et représentent environ 70% des lymphocytes présents au niveau sanguin. La présence à la surface des cellules T d'un récepteur bien particulier pour l'antigène définit cette population cellulaire. La structure fonctionnelle du récepteur T (TCR) se compose d'un hétérodimère ( $\alpha\beta$ ) ou ( $\gamma\delta$ ), dont la fonction est de reconnaître l'antigène présenté à la surface d'une autre cellule en association avec une molécule d'histocompatibilité (CMH), et d'un complexe multiprotéique CD3 dont la fonction est de transmettre un signal d'activation au lymphocyte T lorsque le TCR est stimulé.

Les deux types d'hétérodimère sont composés de deux chaînes polypeptidiques, chacune étant elle-même composée de deux domaines :



- le domaine N terminal est le plus externe. C'est un domaine variable d'un lymphocyte T à l'autre, responsable de la reconnaissance de l'antigène.
- le domaine C terminal, est proche de la membrane cellulaire, identique d'un lymphocyte à l'autre pour une chaîne donnée ( $\alpha$ , B,  $\gamma$ ,  $\delta$ )
- Un lymphocyte T exprime soit un récepteur T $\alpha$ B soit T $\gamma\delta$ , mais jamais les deux ensembles. La sous-population T $\alpha$ B représente environ 85% des lymphocytes T sanguins.

### 1-3 Activation des lymphocytes T

Les lymphocytes T sont activés via le TCR. Le domaine variable de chacune des deux chaînes constituant le récepteur reconnaît le peptide présenté par une molécule d'histocompatibilité. Comme les lymphocytes T diffèrent les uns des autres par le domaine variable de chacune des deux chaînes constituant le TCR, seuls les lymphocytes T ayant le "bon" récepteur reconnaissant l'ensemble CMH/peptide antigénique seront stimulés. Cette reconnaissance par le récepteur T pour l'antigène transmet un signal d'activation par l'intermédiaire du complexe CD3 qui lui est associé.

Au fur et à mesure de la prolifération et de la différenciation, les lymphocytes subissent de nombreux changements. L'expression de récepteur de l'interleukine 2 (IL-2R), des protéines du complexe TCR/CD3 et des co-récepteurs CD4 et CD8 est essentielle pour obtenir une réponse spécifique à l'antigène. Les lymphocytes T cytotoxiques (CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup>) présentent un complexe récepteur TCR/CD3 qui reconnaît le peptide présenté au sein des molécules du CMH (de classe I dans le cas des cellules CD 8<sup>+</sup> et de classe II dans le cas des cellules CD4<sup>+</sup> à la surface des cellules cibles (Roitt et al., 1991) (Figure 1).

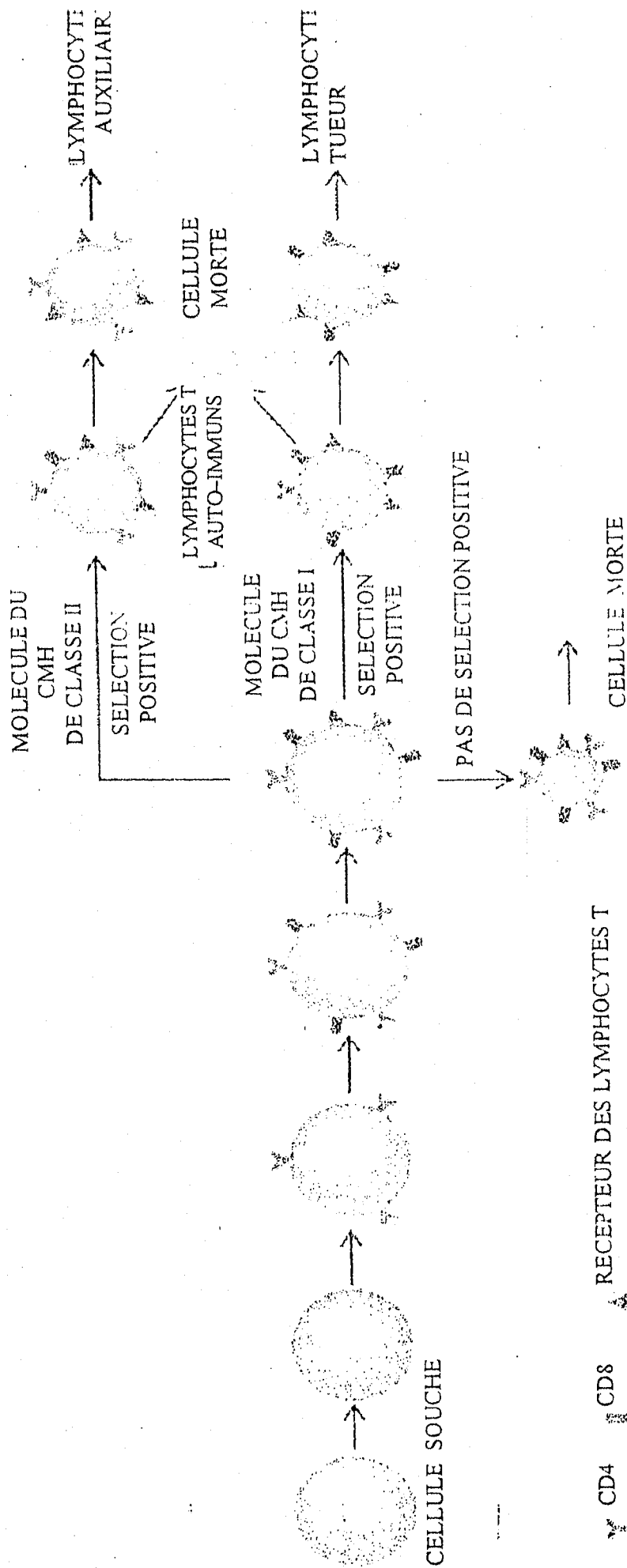


Figure N° 1: Maturation et différenciation des lymphocytes T (Nossal, 1993).

In vivo, les cellules T sont normalement au repos en phase G0 tant qu'elles n'ont pas rencontré d'antigène. Lors de la présentation antigénique, en même temps que le TCR reconnaît l'ensemble CMH-peptide antigénique, l'une des molécules, CD4 ou CD8, interagit avec un autre domaine du CMH. Il en résulte un rapprochement au niveau de la membrane plasmique des cellules T entre le complexe TCR/CD3 et une tyrosine kinase, p56lck, associée à CD4 ou CD8. Ce rapprochement est indispensable à l'activation du lymphocyte T in vivo (Roitt et al., 1991).

L'activation cellulaire peut être divisée en deux parties avec en premier le déclenchement des événements précoces par l'interaction de l'antigène avec le TCR qui permet aux cellules d'entrer en phase S du cycle cellulaire. Ensuite, le relais est pris par les événements tardifs assurés par une voie de co-stimulation via le récepteur CD28. La molécule CD28 est présente de manière constitutive à la surface des lymphocytes T CD4+ et à la surface de 50% des cellules T CD8+ et se lie aux ligands présents sur les cellules présentatrices de l'antigène. La combinaison de l'antigène et de CD28 induit l'expression de l'IL-2 et du récepteur de l'IL-2 (Roitt et al., 1991).

La première rencontre de l'antigène spécifique en présence du signal co-stimulateur par CD4 ou CD8 déclenche l'entrée de la cellule T en phase G1 du cycle cellulaire. Les cellules T CD8 qui sortent du thymus sont orientées vers leur différenciation en cellules T cytotoxiques. Les cellules CD4 donneront, quant à elles, des cellules T inflammatoires (Th1) ou des cellules T auxiliaires (Th2) (Roitt et al., 1991).

Par conséquent, la réponse immunitaire est un phénomène complexe faisant intervenir différentes étapes : la présentation de l'antigène, une étape d'amplification et de régulation et la phase effectrice. Lorsque la cellule est activée par la présentation de l'antigène, plusieurs phénomènes sont activés : l'expression au

niveau de la membrane plasmique des cellules T de molécules lui permettant de communiquer avec son environnement, la production de cytokines (IL2, IL10, TGF $\alpha$ ) influençant les réponses des cellules avoisinantes, une phase de prolifération qui accroît le nombre de cellules spécifiques.

#### **1-4 Rôle des cellules T dans la destruction des cellules $\beta$ :**

Au début du DID, les cellules T sont abondantes parmi les cellules infiltrant les îlots (Gepts, 1981 ; Hannien et al., 1992).

Des études utilisant des souris diabétiques non obèses (NOD) démontrent que la plupart des cellules infiltrant les îlots sont des cellules T (Edouard et al., 1993 ; Koevary et al., 1983). Par ailleurs, des substances anti-cellules T préviennent la survenue du diabète chez les souris (Christianson et al., 1993 ; Semp et al., 1991).

Les cellules T sont essentielles mais non suffisantes pour induire le diabète. La collaboration des macrophages et des cellules dendritiques reste importante (Hutchings et al., 1990 ; Ihm et al., 1990 ; Jansen et al., 1994 ; Lo et al., 1993).

Le DID requiert à la fois les TCD 4+ et les TCD 8+. (Bendelac, 1988 ; Bendelac et al., 1987 ; Christianson et al., 1993 ; Thivolet et al., 1991 ; Yagi et al., 1992). Cependant, les rôles spécifiques des CD8+ et CD4+ demeurent obscurs.

Alternativement, les cellules T CD4+ diabétogènes sont activées et se différencient en cellules effectrices. Ces dernières libèrent des auto-antigènes responsables de la destruction des cellules  $\beta$  du pancréas. Ce phénomène a pour résultat leur destruction à médiation cellulaire par les cellules T CD8+. Cette hypothèse est appuyée par des recherches effectuées sur des souris diabétiques (Christianson et al., 1993 ; Kartz et al., 1993 ; Wicker et al., 1994).

Les cellules TCD8+ détruisent sélectivement les cellules  $\beta$  in vitro, alors que les TCD4+ se lient étroitement à elles (Nagata et al., 1992).

## **1-5 Rôle des cytokines dans la destruction des cellules $\beta$ :**

Les médiateurs biochimiques de la cytotoxicité comme les cytokines, les perforines et protéases peuvent aussi sélectivement détruire les cellules  $\beta$  (Mandrup-Pulsen et al., 1985 ; Pankewycz et al., 1995).

Récemment, une étude sur le rôle des cytokines dans le DID a démontré que l'interleukine 1(IL-1) est sélectivement cytotoxique aux cellules  $\beta$  du pancréas in vitro (Bendtzen et al., 1986 ; Sandler et al., 1991).

Il a été suggéré que les récepteurs de l'IL-1 sont présents sur les cellules  $\beta$  (Erizik et al., 1991), et que la liaison de l'IL-1 au récepteur IL-1 induit une transcription de l'ARN m et une synthèse protéique (Hughes et al., 1990).

La destruction produite par l'IL-1 est potentialisée par le facteur de la Nécrose tumorale (TNF) (Mandrup-Poulsen, 1987). Le TNF $\alpha$  inhibe la libération de l'insuline In vitro, les études démontrent que l'effet cytotoxique des cytokines interleukine 6 (IL-6), TNF, lymphotoxine, et interféron (INF $\gamma$ ) sur les îlots est cumulatif (Rabinovitch et al., 1989 ; Sandler et al, 1990).

Au cours de la dernière décennie, le rôle des cytokines Th1 et Th2 dans la pathologie du diabète a été étudiée d'une manière très étendue (Rothe et al., 1994 ; Fox et al., 1997).

En général, les cytokines Th1 comme les IL-2 et l'INF $\gamma$  semblent activer l'immunité induisant ainsi le développement d'un DID, alors que les cytokines Th2 telles que les IL-4 et les IL-10 ont un rôle supprimeur de l'activité immune, prévenant ainsi la survenue d'un DID.

L'accélération du diabète est corrélée avec l'augmentation de l'expression des INF $\gamma$  (Rothe et al., 1994). Ces derniers ont été décelés dans l'infiltrat lymphatique d'un diabète récent chez des patients (Somoza et al., 1994). Une baisse de

l'expression des IL-4 dans les cellules sanguines mononucléaires de la périphérie a été remarquée chez ces patients (Berman et al., 1996).

D'autres études ont suggéré un rôle important des IL-2 dans la pathologie du DID.

Cependant, le rôle des cytokines Th1 et Th2 dans la pathologie de ce dernier d'un point de vue auto-immun reste controversé (Wogensen et al., 1994). Par exemple, l'administration de l'IL-2 aux rats (BB) accélère l'expression de la maladie (Kolb et al., 1986). Mais dans d'autres études, elle réduit l'incidence de la maladie chez ces rats (BB) et chez des souris diabétiques non obèses (NOD) (Burstein et al., 1987 ; Serreze et al., 1989).

Il n'en reste pas moins que le rôle individuel d'une cytokine dans le développement d'un DID est très complexe.

#### **1-6 Rôle des radicaux libres dans la destruction des cellules $\beta$ :**

Les cellules  $\beta$  sont très sensibles à la production des radicaux libres car ces dernières n'ont que peu de moyens de défense contre les radicaux libres (Corbett et al., 1992 ; Faust et al., 1996).

Le mécanisme repose sur l'interaction de la molécule (Fas-Ligand), (Fas-L : qui est une des voies d'activation moléculaire transmettant le signal d'apoptose, c'est une protéine de surface qui une fois en contact avec son Ligand induit l'apoptose de la cellule à la surface de laquelle elle est exprimée), exprimée par les lymphocytes T cytotoxiques activés et de Fas-CD95 exprimée par la cellule cible. Les cellules  $\beta$  humaines n'expriment pas Fas de façon constitutionnelle. En revanche, l'IL-1 peut induire l'expression de Fas par ces dernières purifiées secondairement à la production du monoxyde d'azote (NO : Toxique en excès), elle-même liée à l'activation de la NO- synthase.

L'insuline est un des auto- antigènes responsable de l'activation des fonctions des Lymphocytes T, de la production des cytokines et du développement du DID (Tchorzewski et al., 2001).

### **1-7 Collaboration des macrophages avec les lymphocytes T dans l'initiation et la progression de la destruction des cellules $\beta$ en conjonction avec les molécules du CMH de la classe I et de la classe II :**

Une des fonctions clé du macrophage est la présentation de l'antigène aux cellules T helper via les molécules du CMH de la classe II (Unuaue et al., 1984 ; Unuaue et al., 1987).

Les macrophages ont un rôle dans la présentation des auto- antigènes aux cellules T helper grâce aux molécules de la classe II du CMH (Unuaue et al., 1984 ; Unuaue et al., 1987).

Ainsi, antérieurement au développement d'une insulinite, il peut y avoir des changements sur les cellules  $\beta$  (tel que l'expression retardée de leur auto- antigène), qui font que la cellule est reconnue comme un non soi (Ko et al., 1991 ; Ko et al., 1994).

De plus, il est suggéré que les auto- antigènes des cellules  $\beta$  sont libérés par un revirement spontané des cellules  $\beta$  ou par la lésion de ces dernières par des facteurs environnementaux (infections virales...) aboutissant à leur présentation par les macrophage (Yoon, 1995 ; Yoon, 1996).

Ainsi, la présentation des auto- antigènes spécifiques aux cellules  $\beta$  par les macrophages aux T CD4+ peut être l'étape initiale au développement du diabète auto-immun (Figure 2)

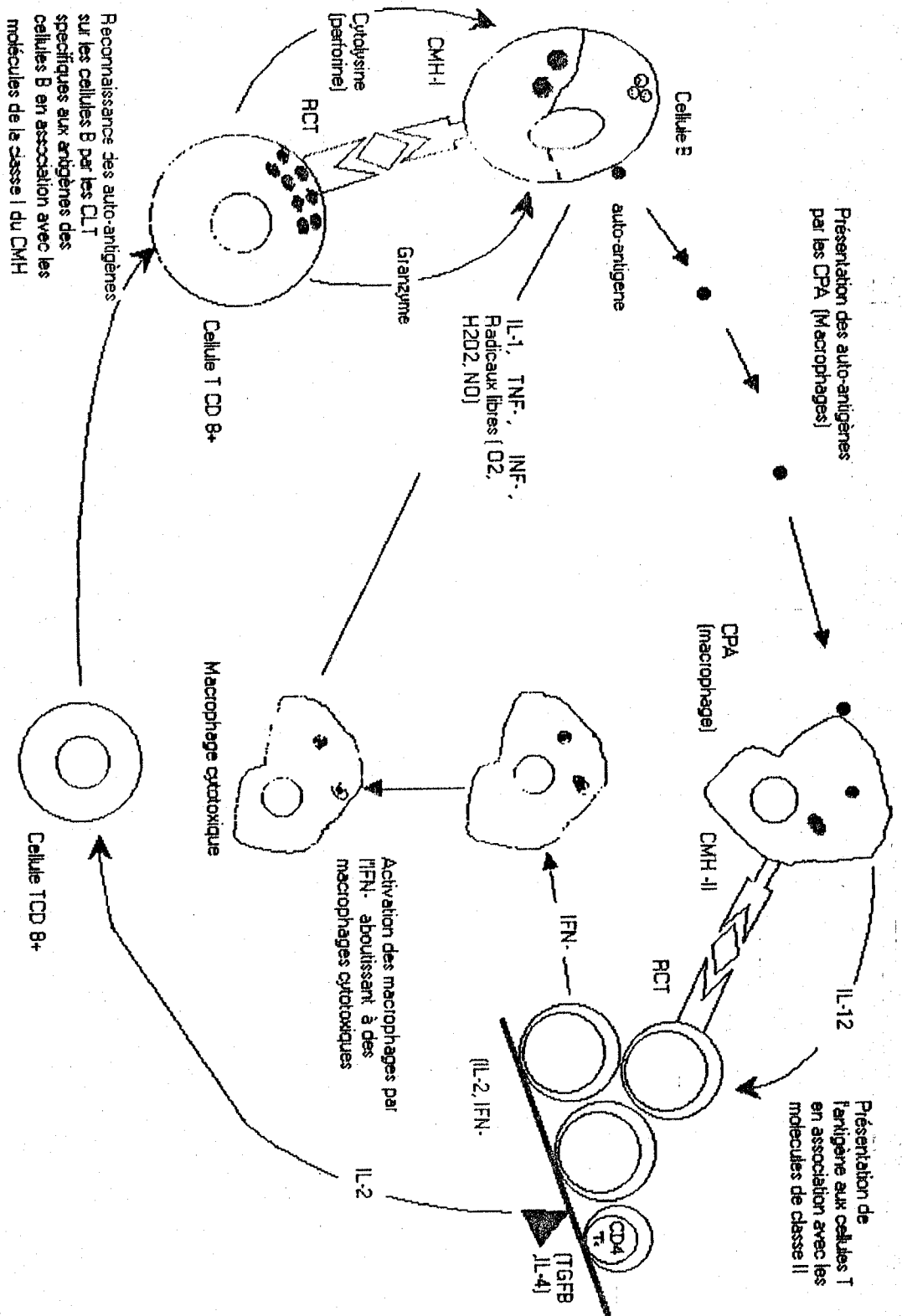


Figure 2 : Les mécanismes de l'installation du diabète insulino-dépendant auto-immun (Yoon et al., 1997)



Durant ce procédé, les macrophages activés sécrètent l'IL-12, l'IL-1 $\beta$  et d'autres cytokines. L'IL-12 active les cellules Th1 de type CD4+, qui à leur tour sécrètent l'INF $\gamma$  et l'IL-2.

La sécrétion de l'INF $\gamma$  génère des macrophages cytotoxiques parmi les macrophages au repos. Ces macrophages cytotoxiques sécrètent de l'IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$  et des radicaux libres qui sont des substances toxiques aux cellules  $\beta$ .

Simultanément, l'IL-2 et d'autres cytokines libérées des cellules Th1 de type CD4+ activent les cellules T CD8+ pré-cytotoxiques. Ces substances peuvent aussi induire la migration des cellules T CD8+ pré-cytotoxiques périphériques vers les îlots inflammés sans doute par induction de l'expression des récepteurs spécifiques sur les cellules endothéliales. Les cellules T CD8+ pré-cytotoxiques portant les récepteurs spécifiques à l'antigène des cellules  $\beta$  se différencient en cellules T CD8+ cytotoxiques qui répondent à la reconnaissance des peptides spécifiques des cellules  $\beta$  liés aux molécules du CMH de la classe I en présence des cellules T CD4+ helper (Cella et al., 1997 ; Kurts et al., 1998).

Les cellules T CD8+ cytotoxiques provoquent des lésions dans les cellules  $\beta$  par la libération des perforines (protéines) et de granzym (sérine estérases) après avoir reconnu les peptides-CMH classe I à la surface des cellules aboutissant à une mort cellulaire certaine, et/ou par l'apoptose à médiation cellulaire par le biais de la protéine Fas (Albert et al., 1998 ; Kwon et al., 1999 ; O'Brien et al., 1997).

Les T CD8+ ne peuvent migrer vers les îlots du pancréas ou y provoquer des lésions sans la présence des cellules Th1 de type CD4+ et des macrophages (Ingulli et al., 1997 ; Matsue et al., 1999).

De cette façon, les macrophages activés, les CD4+ et les CD8+ agissent synergiquement pour détruire les cellules  $\beta$ , en association avec les auto-antigènes

spécifiques des cellules  $\beta$  et les molécules de la classe I et II du CMH (Bach et al., 1995 ; Rossini et al., 1993).

Le tout aboutit au développement d'un diabète insulino- dépendant auto-immun (Green et al., 1999 ; Ridge et a., 1998).

#### **IV-Les Acides Gras- Synthèse et rôles**

Les AGPI sont classés en 4 grandes familles, deux familles non essentielles parce que les précurseurs, les acides palmitoleique ( $16:1n-7$ ) et oléique ( $18:1n-9$ ) peuvent être bio synthétisés par l'organisme ou aussi apportés par l'alimentation et deux familles essentielles en n-3 et en n-6 qui comprennent les deux acides gras indispensables et tous leurs dérivés (Figure 3). Ces acides gras indispensables sont l'acide linoléique ( $18:2n-6$ ) et l'acide  $\alpha$ -linoléique ( $18:3n-3$ ) (Blond, 1992). Les acides gras de la famille n-6 proviennent essentiellement des végétaux tels que le soja, l'olive et le tournesol. Les acides gras n-3 sont extraits des huiles de poisson. Les principaux représentants de cette famille sont l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA).

La régulation de la biosynthèse des acides gras se fait par un double système enzymatique qui fabrique continuellement les AGPI n-3, n-6, n-7 et n-9. Ces deux enzymes sont les élongases (Figure 4) ou les désaturases. Les élongases augmentent la longueur de la chaîne, les désaturases augmentent le nombre d'insaturation. Les désaturases agissent dans des régions spécifiques des acides gras mais ne sont pas spécifiques d'un acide gras ce qui entraîne une compétition de substrat. Les désaturases sont au nombre de 5,  $\Delta 9$ , 6, 5 communes aux animaux et végétaux et les  $\Delta 12$ , 15 spécifiques aux végétaux. Les  $\Delta 12$ , 15 permettent la synthèse de l'acide linoléique, précurseur des AGPI de la famille n-6 et de l'acide linoléique, précurseur des AGPI de la famille n-3 (Poisson et al., 1991).

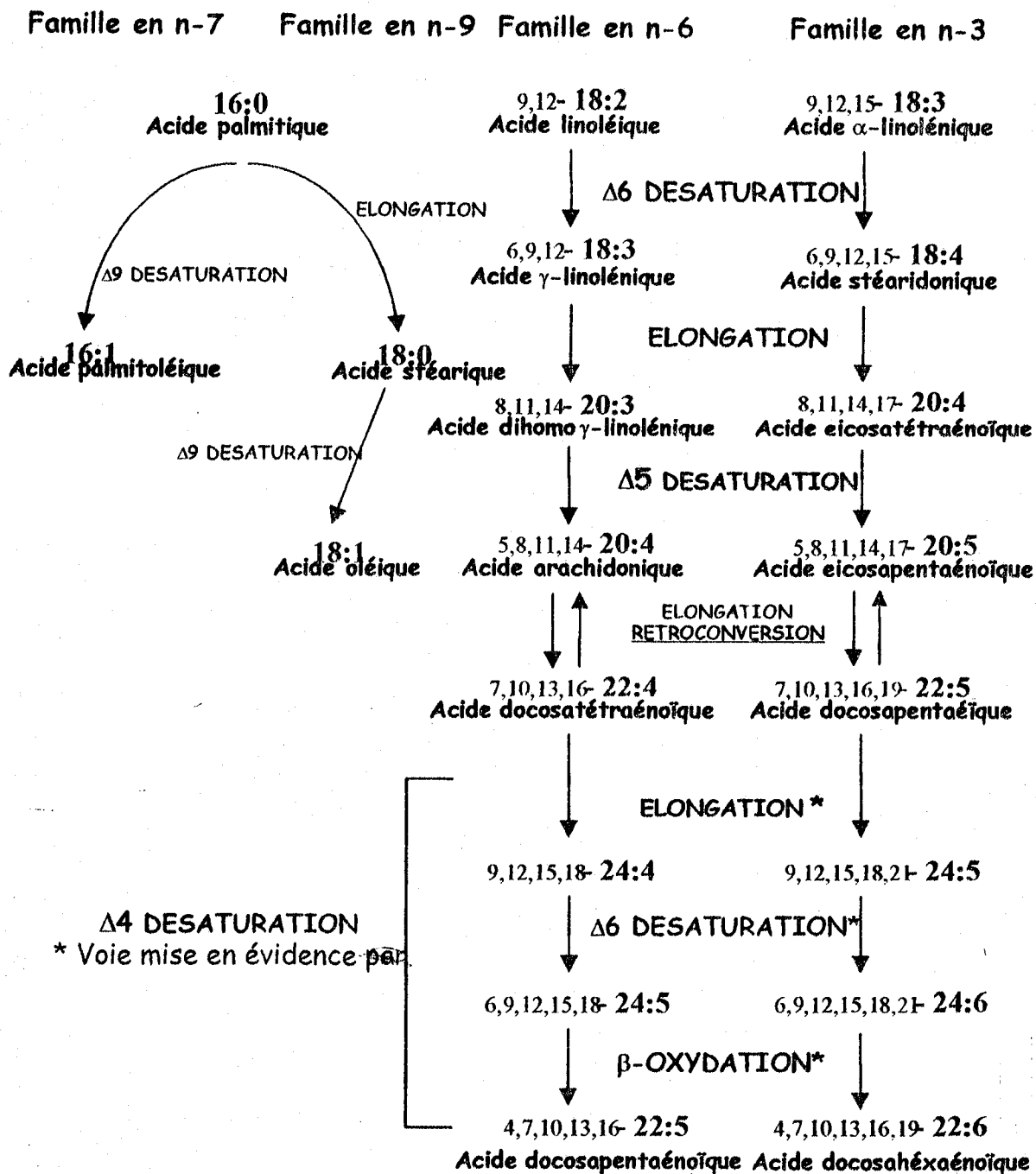


Figure 3: Biosynthèse des acides gras insaturés (Voss et al., 1991)

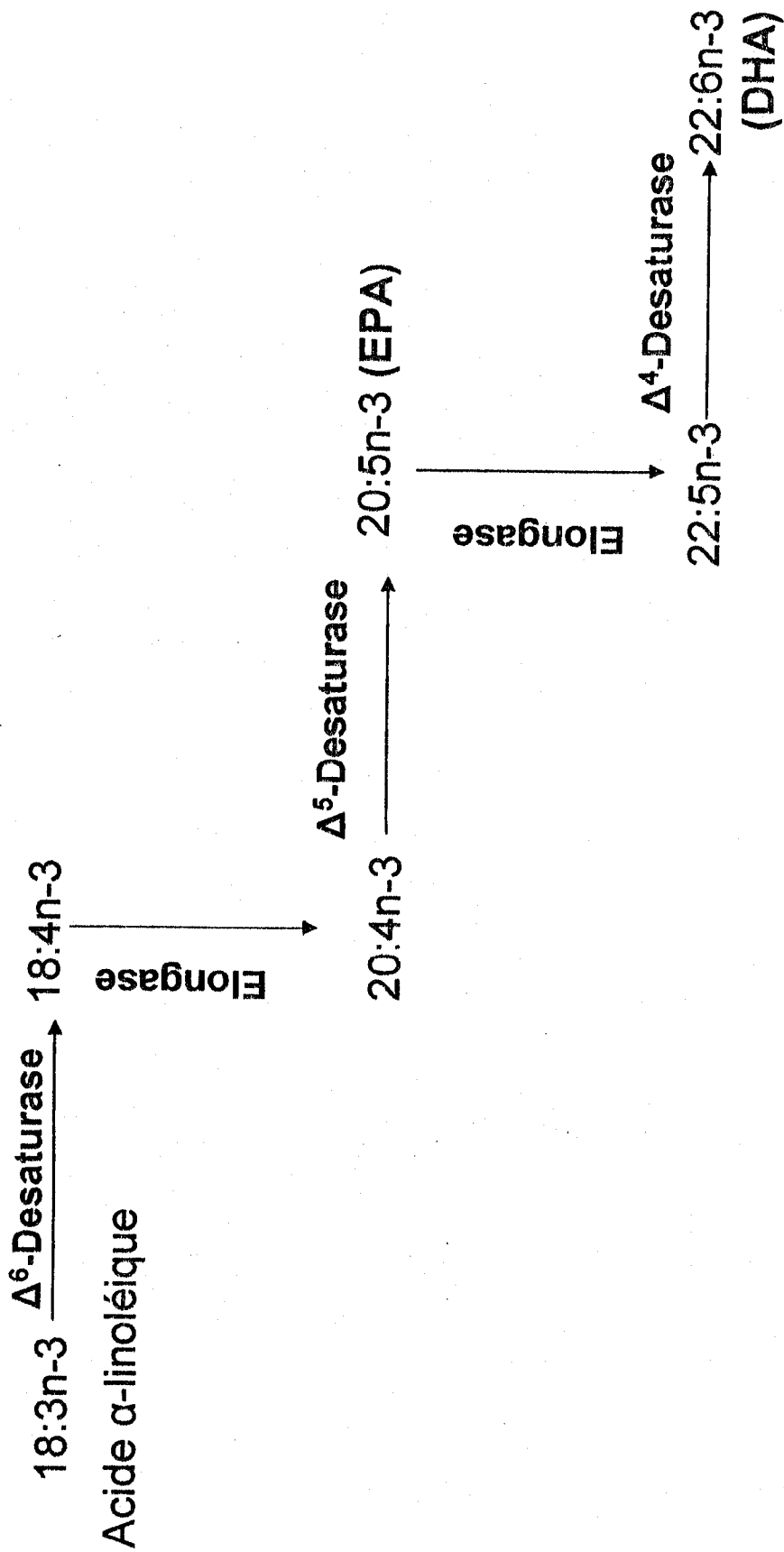


Figure 4: Principales enzymes responsables de la synthèse de l'EPA et le DHA (Poisson, 1991).

Dans certaines conditions physiologiques (âge, jeûne) ou pathologiques (diabète insulino-prive, cancers...), un déficit en  $\Delta 6$  désaturase conduit à un déficit de synthèse des dérivés supérieurs acide gamma linoléique (C18 :3n-6), acide arachidonique (AA) et EPA ou DHA. C'est pourquoi on les appelle parfois des acides gras conditionnellement indispensables (Lecerf, 1998 ; Lecerf, 2000).

Chez le fœtus et le nouveau-né prématuré et donc chez la femme enceinte et allaitante, l'AA et le DHA seraient également des acides gras indispensables. Le lait maternel a d'ailleurs des teneurs élevées en précurseurs (acides linoléique et  $\alpha$  linoléique) et en dérivés supérieurs (AA, DHA), mais cette teneur varie selon l'alimentation des femmes (Lecerf, 1998 ; Lecerf, 2000).

#### **IV-2 Effets bénéfiques des Acides gras de la famille n-3**

Les acides gras de la famille n-3 jouent un rôle important dans la prévention des maladies cardiovasculaires (Kromhout, 1989), le soulagement des symptômes de la polyarthrite rhumatoïde (Cleland and James, 2000; Volker *et al.*, 2000) et la réduction des triglycérides sanguins (Durrington *et al.*, 2001). Ils participent également à l'élaboration des prostaglandines qui sont médiateurs des réponses inflammatoires aiguës et jouent aussi un rôle central dans l'élasticité des vaisseaux, dans l'agrégation plaquettaire et dans métabolisme du cholestérol (Lecerf, 2000).

Ces 15 dernières années, de nombreuses études utilisant des quantités variables d'AGPI de la famille n-3 ont été réalisées afin d'investir leur rôle sur le système immunitaire humain et sur les réponses inflammatoires. Des études, réalisées chez l'homme ont montré qu'une augmentation significative de la consommation de graines de lin riches en acide  $\alpha$ -linoléique (ALA) diminue la prolifération *in vitro* des lymphocytes stimulée par des mitogènes. De plus la concentration en ALA, EPA et DHA dans les cellules sanguines de ces personnes augmentent (Kelley *et al.*, 1991).

L'augmentation de la proportion en ALA dans l'alimentation inhibe la désaturation de l'acide linoléique et aussi de l'acide oléique (C18 :1n-9 en C20 :3n-9) (Lecerf, 1998 ; Lecerf, 2000). Cependant, l'effet direct de l'ALA ou de ses métabolites (l'EPA ou le DHA) issus de l'élongation de l'ALA reste à déterminer (Kelley *et al.*, 1991). Certains auteurs ont utilisé directement l'huile de poisson. D'après ces études, la consommation quotidienne de 1,23g d'EPA et de DHA sans supplémentation en vitamine E entraîne une diminution de la prolifération des cellules mononuclées et de la production de certaines cytokines *in vitro* (Kelley *et al.*, 1992). Par conséquent les effets de l'EPA et du DHA sur les réponses inflammatoires et immunes varient en fonction du type cellulaire, de la concentration en acides gras, de la présence ou l'absence de vitamine E ou d'autres anti-oxydants.

Les effets bénéfiques des acides gras de la famille n-3 sont nombreux :

*Oméga 3 et maladies cardiovasculaires* : De nombreuses études ont mis en évidence que les acides gras de la famille n-3 contenus dans l'huile de poisson sont favorables à la prévention et au traitement des patients atteints de maladies cardiovasculaires (Kromann and Green, 1980; Kromhout, 1989; Prichard *et al.*, 1995). Leurs sites d'actions sont multiples : prévention des arythmies, action anti-coagulante et anti-plaquettaire, modulation de la croissance cellulaire dans la paroi artérielle, amélioration de l'hémodynamique vasculaire, régulation de la pression artérielle et action hypolipidémiant. En effet, concernant cette dernière propriété, il a été observé que ces acides gras diminuent les teneurs plasmatiques en triglycérides. Il se produit une baisse de synthèse du LDL cholestérol concomitante à l'augmentation du HDL cholestérol, ceci est dû d'une part à une augmentation de production des HDL, et d'autre part une augmentation de l'activité de l'enzyme lecithine cholestérol acyl transférase (LCAT) ainsi qu'à la diminution du catabolisme

des HDL (Fumeron et al., 1991; Sanchez-Muniz et al., 1999). Ces résultats bénéfiques concernant les maladies cardiovasculaires sont également corrélés aux effets dilatateurs exercés par ces acides gras sur les endothéliums vasculaires (De Caterina et al., 2000).

*Effets anti-cancéreux des acides gras de la famille n-3* : Des études réalisées in vitro et chez la souris ont mis en évidence que le DHA et l'EPA inhibent le développement de certains cancers. Dans les modèles d'étude de cancérogenèse mammaire, les huiles de poissons semblent inhiber la croissance tumorale ainsi que celle des métastases (Carrol, 1992). Il a été démontré que l'ALA a un plus fort effet inhibiteur de la croissance des tumeurs mammaires et des métastases que l'EPA et le DHA. Cela suggère un effet protecteur de l'ALA dans la cancérogenèse mammaire. L'association de cet acide gras avec de l'EPA et du DHA a un effet inhibiteur sur les métastases d'adénocarcinomes mammaires (Rose et al., 1994; Kim, et al., 2005). Les acides gras n-3 n'ont pas d'effet inhibiteur sur ce type de cancer lorsque les n-6 sont en apports trop élevés ou insuffisants. Mais lorsque les apports en n-3 et n-6 sont équivalents, les effets anti-tumoraux des acides gras n-3 s'expriment. Il semble que les n-3 exercent des effets antagonistes sur la stimulation tumorale induite par les n-6 (Rose et al., 1994). Une étude épidémiologique réalisée en Alaska et sur les esquimaux du Groënland a démontré les effets bénéfiques des acides gras n-3 sur le développement du cancer du colon (Blot et al., 1975; Nielsen and Hansen, 1980; Willett et al., 1990). A l'opposé les acides gras saturés induisent la carcinogenèse chez la souris. Ainsi les études réalisées in vitro et sur les modèles animaux ont montré que les acides gras n-3 inhibent la prolifération des cellules cancéreuses alors que les acides n-6 induisent le développement tumoral (Hardman et al., 2004). Les effets anti-cancéreux sont liées à un effet sur la prolifération des lymphocytes T



et à l'effet apoptotique des AGPI sur les cellules cancéreuses (Begin et al., 1986; Reddy et al., 1991).

Les effets bénéfiques des AGPI n-3 ont été également mis en évidence concernant les maladies inflammatoires et auto-immunes. En effet, depuis plusieurs années, de nombreuses études ont été menées concernant la régulation de certaines fonctions du système immunitaire par les acides gras polyinsaturés.

### **IV.3 AGPI et système immunitaire**

Le fonctionnement du système immunitaire peut être altéré par une malnutrition ou un déséquilibre alimentaire (Calder et al., 1999). Concernant le rôle des AGPI sur la modulation du système immunitaire, de nombreuses études ont été réalisées au cours de ces dernières années. Le mode d'action est encore mal connu mais cependant certaines hypothèses sont en cours d'étude : l'effet sur le métabolisme des cellules dû au changement de composition des phospholipides membranaires en acides gras, l'effet de la peroxydation lipidique, l'altération de l'expression de certains gènes ou de la production de certains eicosanoïdes. Enfin certaines études ont mis en évidence que l'EPA, le DHA peuvent supprimer in vitro et ex-vivo l'apoptose ou la mort cellulaire programmée (Calder et al., 1999).

#### **IV-3-1 Effets des acides gras sur la prolifération des lymphocytes T**

Les études réalisées ont mis en évidence que l'acide oléique (18 : 1, n-9), l'EPA et le DHA inhibent la prolifération des lymphocytes induite par la concanavaline A (ConA) et la phytohemmagglutinine (PHA) dans la rate, le thymus et les ganglions chez le rongeur (Yaqoob and Calder, 1993). Selon certains auteurs, les acides gras saturés ont moins d'effets que les AGPI et supposent que le degré d'insaturation pourrait être la cause de certains effets. Des études ont mis en évidence que l'acide laurique (C<sub>12</sub>) et myristique (C<sub>14</sub>) n'exercent pas d'effet inhibiteur sur la prolifération des cellules T.

Cependant l'acide stéarique (C<sub>18</sub>) exerce des effets similaires à ceux de l'acide oléique (Calder and Newsholme, 1992; Rotondo et al., 1994; Soyland et al., 1993).

La prolifération des cellules T dépend de certaines cytokines, particulièrement l'interleukine 2 (IL-2). L'IL-2, cytokine essentielle à la croissance et la différenciation cellulaire T est parfois utilisée dans certaines études pour induire la prolifération des cellules T. Rotondo et al (1994) ont montré que plusieurs acides gras inhibent la prolifération des cellules T du thymus induite par l'IL-2. Cet effet n'est pas médié par les eicosanoïdes ni la peroxydation des lipides comme l'ont démontré plusieurs auteurs (Calder, 1997; Rotondo *et al.*, 1994; Soyland *et al.*, 1993). Par contre, l'incorporation dans les phospholipides membranaires des acides gras ajoutés pourrait modifier la fluidité des membranes affectant la transmission du signal c'est à dire la réponse des cellules aux différents mitogènes employés.

Calder et al. (Calder, 1997) ont mis en évidence que 40 à 50% de la production de l'IL-2 est inhibée en présence d'acide oléique, d'acide linoléique, d'acide  $\alpha$ -linoléique, de l'acide arachidonique AA, de l'EPA et du DHA. Par contre les acides gras saturés (AGS) n'exercent aucun effet.

Soyland et al. (1993) ont également mis en évidence qu'une alimentation enrichie en AGPI diminue l'expression du récepteur à l'IL-2 (IL-2R).

La production de l'interleukine 1 IL-1 par les lymphocytes T et du facteur de nécrose tumorale (TNF) d'origine macrophagique impliqués dans les phénomènes pro-inflammatoires est également diminuée lors d'un régime enrichi en acides gras n-3. L'arrêt du régime entraîne un retour aux taux initiaux d'IL1 et de TNF (Endres *et al.*, 1989).

Le régime méditerranéen a des effets bénéfiques sur certaines maladies auto-immunes. Il a été démontré qu'un régime enrichi en huile d'olive exerce des effets en

diminuant la production d'IL-1 et d'IL-2 par les cellules T variables selon la durée du régime (Granato et al., 2000). D'autre part, ces auteurs ont observé qu'un régime à base d'huile de poisson peut supprimer la production d'IL-1 au bout de quatre semaines chez le rat alors qu'un régime à base d'huile d'olive agit au bout de 8 semaines (Pablo et al., 1998).

De plus, les études menées par Kelley et al. (1991) ont mis en évidence que les AGPI n-3 et n-6 diminuent la production du TNF, mais augmentent l'IL-10.

#### **IV-3-2 Modulation des cellules tueuses**

Les cellules tueuses protègent l'organisme contre les virus, les bactéries ou le développement des cellules tumorales. La composition en acides gras de l'alimentation influe sur la résistance à ce type d'infection (Barone et al., 1989; Jeffery et al., 1996). En effet, la diminution du taux d'acides gras totaux dans l'alimentation induit une augmentation de l'activité des cellules tueuses. D'autre part une alimentation enrichie avec de l'huile de poisson ou de l'huile d'olive entraîne une forte diminution de l'activité de ces cellules (Assmann et al., 1997). Dans le même temps Kelley et al. (1992) ont montré que les effets observés en présence des deux types d'huile pourraient être corrélé à leur richesse en DHA. Une alimentation enrichie en cet acide gras entraîne le même effet. Par contre, la consommation d'acides gras n-6 ou d'acides gras saturés provoque une moindre diminution de cette activité. Selon certains auteurs, ces effets sont dus à la production des eicosanoïdes tels que les prostaglandines (Bray, 1986; Roder and Klein, 1979). Notons que la supplémentation en AA (1.5g/j pendant 50 jours) n'a pas d'effet sur l'activité des cellules tueuses et sur la prolifération des lymphocytes T et B stimulées par des mitogènes (Mollard et

al., 2005). De même la sécrétion de l'Il-2 et du TNF $\alpha$  n'est pas modifiée (Mollard et al., 2005).

#### **IV-3-3 Effets des acides gras sur le phénomène de phagocytose et la réponse inflammatoire**

Le phénomène de phagocytose permet d'éliminer les micro-organismes et les différentes particules produites par les vésicules d'endocytose. La fluidité membranaire joue un rôle important dans ce mécanisme ce qui est en corrélation avec les effets modulateurs des acides gras. Cependant, les acides gras n-3 n'inhibent pas ou n'ont pas d'effet sur la phagocytose (Anel et al., 1993).

En ce qui concerne les phénomènes inflammatoires, Kremer et al. (1990) ont démontré qu'une alimentation enrichie en acides gras n-3 chez des personnes atteintes de polyarthrite rhumatoïde (PR) diminue les symptômes de la maladie. D'autre part, il est intéressant de noter que chez les personnes atteintes de psoriasis on observe une augmentation du taux d'AA et des produits dérivés de la 5-lipoxygénase. Par conséquent, une alimentation enrichie en n-3 diminue le taux d'AA (Harbige, 2003).

Ainsi chez l'homme, la PR, le psoriasis ainsi que le lupus érythémateux sont des maladies sensibles au DHA et à l'EPA (Bittiner et al., 1988; Mayser et al., 2002). Il semblerait même que l'EPA serait plus efficace que le DHA (Bittiner, 1988). Par contre, des études ont mis en évidence qu'un enrichissement en AA tend à faire augmenter les désordres inflammatoires et les phénomènes allergiques (Harbige, 2003).

## **v. AGPI et leurs rôles au cours du diabète :**

Il a été récemment bien établi que les AGPI n-3 et n-6 régulent les fonctions des cellules immunocompétentes : les n-6 sont des immunostimulateurs et les n-3 sont des immunosuppresseurs (Harbige, 1998). Plusieurs études montrent que la prolifération des lymphocytes, ainsi que leurs activités cytotoxiques, diminuent suite à un régime enrichi en AGPI n-3 (Locniskar et al., 1983 ; Erickson et al., 1983 ; Calder et al., 1995 ; Jeffery et al., 1996). Ces auteurs rapportent que chez des rats nourris avec un régime enrichi en n-3 (EPA et DHA), l'effet immunosuppresseur est marqué par une diminution de la production des lymphocytes actifs et de l'activité lytique NK (natural killer). Ces modifications sont associées à un changement de la composition en acides gras des membranes des lymphocytes (Jeffery et al., 1996; Yaqoob et al., 1995). Le nombre des récepteurs à l'IL-2 est un facteur déterminant de la prolifération lymphocytaire après l'activation antigénique. Ce nombre des récepteurs à l'IL-2 à la surface des lymphocytes est réduit par les AGPI n-3 (Yaqoob et al., 1994).

La surproduction de l'IL-6 observée chez les diabétiques peut être corrigée par une supplémentation en AGPI n-3 (Mc Carty, 1999). Ceci peut entraîner une réduction des taux de fibrinogène et une baisse du risque athérogène chez les diabétiques, (Mc Carty, 1999). L'effet bénéfique des AGPI n-3, particulièrement le DHA et l'EPA, sur l'évolution du diabète pourrait être lié à une modulation de l'expression du gène des molécules d'adhésion (Horrocks et Yeo, 1999). La formation de l'athérome chez le diabétique est multifactorielle et s'accompagne d'adhésion des lymphocytes au niveau des lésions vasculaires. Il apparaît donc clair qu'une réduction du nombre de molécules d'adhésion est associée à une diminution du risque athérogène (Horrocks et Yeo, 1999).

L'EPA et le DHA entraînent une réduction de la sécrétion des interférons et des IL-1, respectivement, par les macrophages et les lymphocytes. Ces deux substances jouent un rôle dans le déclenchement et l'expression du diabète auto-immun du type 1 par leur action cytotoxique sur les cellules-B du pancréas. L'effet immunosuppresseur des AGPI n-3 peut être exploité dans la prévention de ce diabète auto-immun (Horrocks et Yeo, 1999).

Lety et al. (1992) ont constaté la production très élevée des eicosaenoides de la série n-6 par des macrophages au cours de la progression du diabète chez la souris NOD, indiquant que les n-6 peuvent être responsables, en partie, de cette pathologie.

Molvig et al. (1991) ont également signalé que les AGPI n-3 diminuent la prolifération monocytaire et la sécrétion de l'IL-1, via la production des eicosanoïdes de la série n-3, chez les sujets diabétiques. Alternativement, il est également possible que l'EPA et le DHA exercent leurs différentes actions via leur intervention sur la cascade de second messagers, déclenchée par le TCR (T-cell receptor).

L'activation de cellules-T peut être divisée en deux événements : précoce et tardif. Dans les événements tardifs de l'activation des cellules-T, la phospholipase A2, en libérant l'acide arachidonique, et la phospholipase D, en produisant le diacyl glycérol à partir de la phosphatidylcholine, stimulent l'activité de la protéine kinase C (PKC) (Khan et Hichami, 1999). Dans les cellules-T, l'activation de la PLD est PKC-dépendante (Khan et Hichami, 1999).

Dans toutes les cellules, le calcium ionisé est stocké dans le réticulum endoplasmique (RE), les mitochondries et également, dans un compartiment, dit « pool cytosolique ». Puisque, à l'état de repos la concentration intracellulaire du  $Ca^{2+}$ ,  $[Ca^{2+}]_i$ , est très faible, des petites augmentations des flux de  $Ca^{2+}$ , notamment au niveau de la membrane plasmique ou de la membrane du RE, entraînent des

variations à la fois très importantes et très rapides du taux de calcium intracellulaire (Khan et al.,1995 ; Khan et al., 1996). Ceci explique pourquoi le  $Ca^{2+}$  est utilisé comme signal intracellulaire, notamment dans les fonctions biologiques telle que le transport intracellulaire et l'activation de cellules-T (Khan et al.,1993 ; Khan et al 1995 ; Khan et al.,1996). Les AGPI n-3 modulent  $[Ca^{2+}]_i$  dans les cellules-T humaines (Bonin et Khan.,2000), ainsi le DHA augmente  $[Ca^{2+}]_i$  à partir des pools intracellulaires et extracellulaires, en ouvrant des canaux CRAC (  $Ca^{2+}$ - release activated  $Ca^{2+}$ -channels).

Il est possible que les AGPI n-3 influencent d'autres mécanismes de signalisation cellulaire tels que l'activation de MAPK (mitogen activated protein kinase) responsable de la prolifération des cellules T. Cette hypothèse peut être soutenue également par les observations de Green et Flavell (1999) qui ont suggéré que la rupture de la tolérance immunologique chez les diabétiques est due à une modification de la signalisation cellulaire-T.

## MATERIEL ET METHODES

### 1-Animaux et Régimes

Les rats Wistars adultes utilisés dans notre étude proviennent de IFA-CREDO (Lyon, France). EPAX 7010 (70% EPA/12%DHA) a été fourni par le laboratoire Pronova, Norvège.

Après une semaine d'acclimatation, les animaux âgés de cinq semaines sont nourris pendant 2 semaines avec un régime témoin ou un régime AGPI/EPAX dont la composition est la suivante (en g par kg) : amidon, 587 ; caséine délipidée, 200 ; cellulose, 50 ; saccharose, 50 ; mélange minéral, 40 ; vitamines, 20 ; DL méthionine, 3 ; huile végétale Isio-4 (Lésieur, Neuilly-sur Seine), 50 ( régime témoin) . Dans le régime AGPI/ EPAX ; la moitié de l'huile végétale Isio-4 est remplacée par l'EPAX 7010, (Isio ,25 ; EPAX, 25). L'huile Isio-4 est constitué respectivement (mg/g) : 18 : 2(n-6), 47.2 ; total (n-3), 1.7 ; acide gras monoinsaturé, 40.2 ; EPAX 7010 est composé de 85% n-3 PUFA, i.e., EPA, 70% ; DHA, 12% ; alpha tocophérol, 2.1-3.2%. Afin d'éviter l'oxydation des acides gras, la préparation de la nourriture est réalisée chaque jour et L'EPAX est fermé sous azote et conservé à 4°C. L'eau et la nourriture sont fournies par *ad libitum*.

### 2-protocole expérimental

Après accouplement de rats wistar adultes, le premier jour de la gestation est déterminé par la présence de spermatozoïdes sur le frottis vaginal des femelles. Par la suite, les femelles sont mises dans des cages individuelles. Elles mangent environ 30g par rat de régime témoin ou AGPI/EPAX et elles boivent à volonté de l'eau du robinet. Les rates gestantes sont alors divisées en 2 groupes :



- Un lot expérimental constitué 40 femelles (20 rates recevant le régime témoin et 20 rates recevant le régime AGPI/EPAX) qui reçoivent au 5<sup>ème</sup> jour de la gestation une injection intra péritonéale de streptozotocine diluée dans du tampon citrate (0.1mol/L, pH 4.5) à une dose de 40mg/kg de poids corporel. L'injection de la streptozotocine à cette dose provoque chez 60% de rates traitées une hyperglycémie moyenne comprise entre 1.5 et 3 g/l et permet d'avoir un nombre suffisant de nouveaux-nés obèses pour la suite de l'expérimentation

- Un lot témoin est constitué de 30 femelles (15 rates recevant le régime témoin et 15 rates recevant le régime AGPI/EPAX) qui reçoivent une injection intrapéritonéale de tampon citrate seul (0.1mol/L, pH 4.5) au 5<sup>ème</sup> jour de la gestation.

A fin de voir si la streptozotocine a été efficace, un prélèvement sanguin à l'extrémité de la queue est effectué au 13<sup>ème</sup>, 15<sup>ème</sup> et 18<sup>ème</sup> jour de gestation, chez les rates sous streptozotocine et chez les rates témoins, pour mesurer la glycémie. Le sang est déposé sur une bandelette réactive BM-TEST GLYCEMIE 20-800 (méthode à la glucose oxydase, Boehringer Mannheim, Meylan, France). La lecture se fait à l'aide d'un glucomètre (Beckman glucose Analyser, palo Alto, CA, USA). Seules les rates diabétiques présentant une hyperglycémie comprise entre 1.5 et 3g/L sont sélectionnées.

Une sélection des portées est effectuée dans les lots expérimentaux et témoins. Seules les portées entre six et huit naissances sont incluses dans ce travail. Comme le nombre de petits par portée influence la croissance postnatale (CHA et al., 1987), la sélection des portées est importante pour que les mères puissent fournir, jusqu'au sevrage (quatre semaines), une quantité de lait identique pour les différents lots étudiés.

Chaque semaine, le poids des rats est noté, la glycémie et l'insulinémie sont déterminées. A quatre semaines, les petits sont séparés de leurs mères, et sont mis dans des cages par groupes de deux ou trois de même sexe. Ils boivent et mangent des quantités déterminées des deux régimes cités auparavant (témoin, AGPI/EPAX). (Régime correspondant à celui de leurs mères).

Au 12<sup>ème</sup> et au 21<sup>ème</sup> jour de la gestation, ainsi que chez les nouveaux nés au 30<sup>ème</sup>, 60<sup>ème</sup>, 90<sup>ème</sup> jour, les rats sont anesthésiés au moyen d'une injection de pentobarbital sodique (0.2ml/100g de poids corporel).

Après anesthésie, ces rats sont placés sur une table chauffante thermostatée, permettant de maintenir une température corporelle à 37°C. Une ouverture de l'abdomen selon une incision longitudino- médiane permet d'effectuer nos prélèvements de sang et de rate.

### **3- Bilan nutritionnels.**

Après le sevrage, les lots de rats étudiés consomment les deux régimes (Isio et EPAX) pendant une période de 2mois : le but est d'étudier les effets à long terme des AGPI n-3 chez la progéniture des rates diabétiques. La méthode des bilans permet de connaître l'utilisation métabolique de ce régime par les quatre groupes de rats. Huit rats de chaque lot sont placés dans des cages individuelles à métabolisme.

La nourriture ingérée est pesée quotidiennement. Les urines et les féces sont collectées durant des périodes de 7 jours, du 30<sup>ème</sup> au 37<sup>ème</sup> jour (BI), du 53<sup>ème</sup> au 60<sup>ème</sup> jour (BII), du 60<sup>ème</sup> au 67<sup>ème</sup> jour (BII), et du 83<sup>ème</sup> au 90<sup>ème</sup> jour (BIV). Les urines sont recueillies sur un antiseptique (thymol/isopropanol à 10%) puis

conservées à 4°C. Les fèces débarrassées de toute nourriture sont pesées, finement broyées et conservées à -20°C.

### **III-1 Détermination du contenu en azote.**

Le contenu en azote des régimes, des urines et des fèces est déterminé après minéralisation par la méthode de NESSLER.

Les bilans azotés (BA), les coefficients d'utilisation digestive apparente de l'azote ( $CUD_N$ ) et le rapport d'efficacité nutritionnelle (REN) sont calculés aux quatre périodes de bilans (BI, BII, BIII et BVI) selon les formules suivantes.

$$CUD_N (\%) = [(N \text{ ingéré} - N \text{ fèces}) / N \text{ ingéré}] \times 100$$

$$BA (\%) = [(N \text{ ingéré} - (N \text{ urines} + N \text{ fèces}) / N \text{ ingéré}] \times 100$$

$$REN = \text{Gain de poids (g)} / \text{Nourriture consommée pour obtenir ce gain de poids (g)}$$

### **III-2 Détermination des teneurs en urée.**

L'urée est dosée sur les urines par une méthode enzymatique utilisant une uréase qui transforme l'urée en carbonate d'ammonium (Kit Sera Pak, Miles, Milan, Italie).

### **III-3 Détermination des contenus en lipides.**

Les lipides des régimes et des fèces sont extraits selon la technique de DELSAL, (1944). Les coefficients d'utilisation digestive apparente des lipides ( $CUD_L$ ) sont déterminés.

$$CUD_L (\%) = [(Lipides \text{ ingérés} - Lipides \text{ fécaux}) / Lipides \text{ ingéré}] \times 100$$

## **4- Analyses et méthodes utilisées.**

**4-1 Dosage par ELISA de l'insuline (Enzyme Linked Immuno Sorbent, soit l'immunoenzymodosage en phase solide), mise au point dans notre laboratoire.**

On place dans les puits de microtitration (Immuno 96F- Type I-NUNC, Kamstrup, Danemark), une quantité constante d'insuline (100µl d'insuline à 1mg/ml dans un tampon carbonate, pH 9,6). Les sérums contenant l'insuline à doser et les anticorps anti-insuline sont mélangés et incubés une nuit à 4°C. Ces mélanges antigène\_anticorps sont déposés dans les puits. L'anticorps anti-insuline non lié à l'insuline de l'échantillon, va se fixer sur le support. Après incubation à 37°C pendant 1h et lavage, un second anticorps spécifique marqué (anti IgG marqué à la peroxydase) se fixe à son tour sur l'anticorps anti-insuline. Après une 2<sup>ème</sup> incubation à 37°C pendant 1 heure puis lavage, seul le marqueur fixé au complexe persiste dans le milieu réactionnel. La coloration du milieu est obtenue par addition d'un colorant orthophénylène- diamine (OPD) en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La coloration est inversement proportionnelle à la concentration d'insuline de l'échantillon. Cette concentration est déterminée à l'aide d'une gamme étalon d'insuline (préparée à partir d'une solution mère de 1500ng/ml).

#### **4-2 Détermination des teneurs sériques en cholestérol, triglycérides et phospholipides.**

Le Cholestérol total, les triglycérides et les phospholipides sont dosés sur le sérum par une méthode enzymatique (Kits Boehringer, Mannheim, Allemagne).

#### **4-3-Préparation des splénocytes-T**

La rate est écrasée doucement au dessus d'une grille dans un milieu RPMI1640, la suspension cellulaire obtenue est filtrée afin d'éliminer les amas cellulaires restants. Après centrifugation (2000g x 10min), le culot est repris par 15ml de PBS (NaCl,137g ; Kcl, 2.7g ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17.5 ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5g ; pH=7.4) puis déposé dans une boîte de pétri afin d'éliminer les macrophages qui vont adhérer à la surface plastique. Après incubation d'une heure à 37° C, les splénocytes sont prélevés puis

lavés avec du PBS- BSA 0.2%. La suspension cellulaire est ensuite déposée sur les boîtes préalablement coatées avec des anticorps anti IgG (37.5mg/15mlPBS/boîte) et incubée pendant 45min à 4°C. Les anticorps fixent les lymphocytes-B, le surnageant récupéré contient les splénocytes-T.

#### **4-4 Test de transformation lymphoblastique.**

Les splénocytes -T sont mis en culture ( $2 \times 10^5$  cellules / puits) en présence ou non de concavalline-A (Con-A) qui est un agent mitogène spécifique aux lymphocyte T (1µg/puits). Les cellules sont distribuées en sextuplète comme suit : 180µl suspension cellulaire ; 20µl Con-A

Les plaques sont ensuite mises à incuber 72 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Après 60 heures , 20µl de <sup>3</sup>H-thymidine ( 20Ci/mmol, 0.8µCi/puit) est ajoutée. A la fin de l'incubation, les cellules sont lavées/lysées avec un « récolteur de cellules » (Dynatech, Autriche). Cette technique permet la détermination de la prolifération en mesurant la radioactivité incorporée dans l'ADN qui est restée fixée aux papiers filtres. Les filtres sont placés dans des fioles puis 4ml de liquide de scintillation sont ajoutés ; la radioactivité est déterminée comme suit : cpm cellules stimulées par Con-A/ cpm cellules non stimulées.

#### **4-5 Composition en acide gras des phospholipides membranaires**

L'extraction des phospholipides (PL) membranaires des splénocytes-T est déterminée par la méthode de Bligh et Dyer (1959) grâce à un mélange méthanol/chloroforme/ NaCl 2M (1/1/0.9 ; V/V/V).

L'isolement de ces PL se fait par :

Chromatographie sur couche mince : (CCM)

L'extrait lipidique est déposé sur les plaques de gel de silice (G 60, Merck, Allemagne). La migration se fait grâce à un mélange d'hexane, d'éther diéthylique, et d'acide acétique (90/30/1.V/V/V). Après migration, la révélation se fait grâce aux vapeurs d'iode. Les phospholipides, qui demeurent au niveau du dépôt, sont grattés et récupérés dans un tube en verre soviétique.

La composition en acides gras des phospholipides est déterminée par :

#### La Chromatographie en phase gazeuse : (CPG)

Après addition d'une quantité connue de standard interne (acide héptadécanoïque 17 : 0, C<sub>17</sub> H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> dilué dans du benzène à 2mg/ml), les acides gras sont saponifiés grâce à l'addition de NaOH méthanolique, puis sont méthylés par le Bromotrifluorométhanol (BF<sub>3</sub>). La séparation des différents acides gras est réalisée par la suite par chromatographie en phase gazeuse (colonne capillaire en pyrex de 39 m de longueur et 0.3 mm de diamètre interne, remplie avec du carbowax 20 M, Applied Sciences Labs, State College, PA). 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, France). L'identification des acides gras est réalisée par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux des standards d'acides gras (Elysiam, USA). La surface des pics d'acides gras est proportionnelle à leur quantité ; elle est calculée à l'aide d'un intégrateur.

#### **4-6 Mesure de la concentration en calcium libre intra-cellulaire, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>**

La [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> libre est déterminée en utilisant une sonde fluorescente Fura-2/AM dérivée de chélateur de calcium EGTA ( Tsien et al., 1986).

La liaison du Calcium avec la sonde entraîne à la fois une variation de l'intensité de fluorescence et un déplacement du spectre d'excitation la sonde (Fura 2).

La sonde Fura-2 est une sonde double excitation/mono émission. En effet, l'émission de fluorescence du Fura-2 est obtenue à 510 nm en réponse à une excitation à 340 nm ( $F_{340}$ ) et 380 nm ( $F_{380}$ ) en présence et en absence de  $Ca^{2+}$  et se traduit par une augmentation à ( $F_{340}$ ) et une diminution à ( $F_{380}$ ). La mesure du rapport de fluorescences  $F_{340} / F_{380}$  permet de calculer la concentration en  $Ca^{2+}$  (Grynkiewicz et al., 1985). La sonde sous cette forme diffuse à travers la membrane plasmique vers le cytoplasme ou elle est hydrolysée par des estérases endogènes. Sous la forme libre, Fura-2 est capable de fixer le calcium libre et ne peut plus traverser la membrane. Les lymphocytes-T ( $2 \times 10^6$  cellules/ml) sont mis à incuber avec  $1 \mu M$  de sonde dans un tampon contenant (mM) : NaCl, 110 ; KCl, 5.5 ;  $NaHCO_3$ , 25 ;  $MgCl_2$ , 0.8 ;  $KH_2PO_4$ , 0.4 ;  $Na_2HPO_4$ , 0.33 ; HEPES, 20 ;  $CaCl_2$ , 1.2 ; pH = 7.4 pendant 1 heure à  $37^\circ C$ . les cellules sont ensuite lavées trois fois ( $2000g \times 10min$ ) avec un tampon contenant ou non du calcium et resuspendues dans ces mêmes tampons. Chaque essai comprend 4 millions de cellules réparties dans 2ml de tampon. La fluorescence est mesurée à 510 nm avec deux longueurs d'excitation, 340 et 380 nm, en mode ratio (340/380) avec le spectrofluoromètre (PTI, USA). La fluorescence est mesurée à l'état basal, puis après ajout de divers stimulateurs comme la thapsigargine inhibiteur de la pompe  $Ca^{2+}$ -ATPase et l'ionomycine (à 100nM) permettant l'ouverture des canaux calciques. La concentration en calcium libre intracellulaire est déterminée selon l'équation suivante (Grynkiewicz et al., 1985) :

$$[Ca^{2+}] = K_d \times \left[ \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)} \right] \times \frac{Sf}{Sb}$$

$R = F_1/F_2$ , est le rapport des intensités de fluorescence obtenues avec l'excitation à 340 et 380nm pour toute concentration inconnue en calcium.  $R_{max}$  et  $R_{min}$  ont été obtenues respectivement par l'ajout d'ionomycine à  $5 \mu M$  entraînant la pénétration

maximale du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire par l'ouverture de toutes les pompes calciques et du  $\text{MnCl}_2$  à 2mM qui entre en compétition avec le  $\text{Ca}^{2+}$  pour une fixation minimum.

$\text{Sf2/Sb2}$  = fluorescence à 380 sonde libre/fluorescence à 380, sonde liée totalement.

$K_d$  correspond à la constante de dissociation du complexe Fura-2/ $\text{Ca}^{2+}$ ,

$K_d = 224\text{nM}$ .

## **5- Analyse statistique.**

Les résultats obtenus à partir de 15 rats par groupe sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard. Après analyse de la variance, la comparaison des moyennes est réalisée par le test t de Student entre les différents groupes de rats étudiés :

1- Effet Diabète : Diabétiques-ISIO et Témoins-ISIO

Diabétiques-EPAX et Témoins-EPAX.

2- Effet régime : Témoins-EPAX et Témoins-ISIO

Diabétiques-EPAX et Diabétiques- ISIO .

Les moyennes sont considérées significativement différentes quand  $P < 0.05$ .



# RESULTATS ET INTERPRETATIONS

## I Evolution du poids corporel et bilans nutritionnels

### I 1. Evolution du poids corporel (Fig 1).

A la naissance (J0), le poids corporel des rats obèses de mères diabétiques nourries par le régime ISIO et EPAX est significativement plus élevé que celui de leurs témoins respectifs. Par contre, il est significativement diminué chez les nouveaux nés obèses de mères diabétiques sous régime EPAX comparés aux nouveaux nés obèses de mères nourries par le régime ISIO.

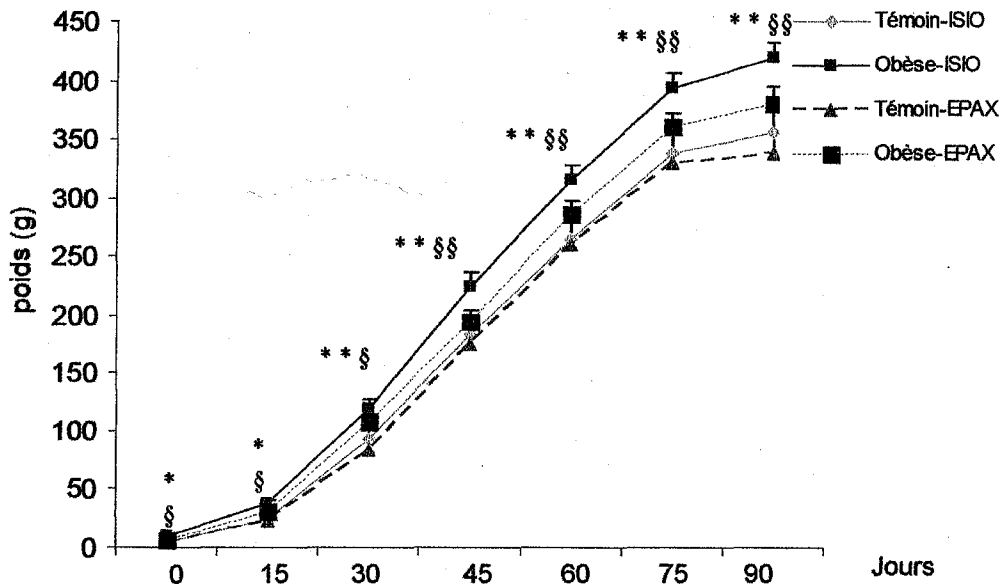
A J30, J60 et J90, le poids corporel des rats obèses du groupe ISIO et EPAX est toujours significativement plus élevé que celui de leurs témoins respectifs. Cependant, le régime EPAX diminue significativement la charge pondérale chez les rats obèses comparés aux rats obèses sous régime ISIO.

### I 2. Bilans nutritionnels

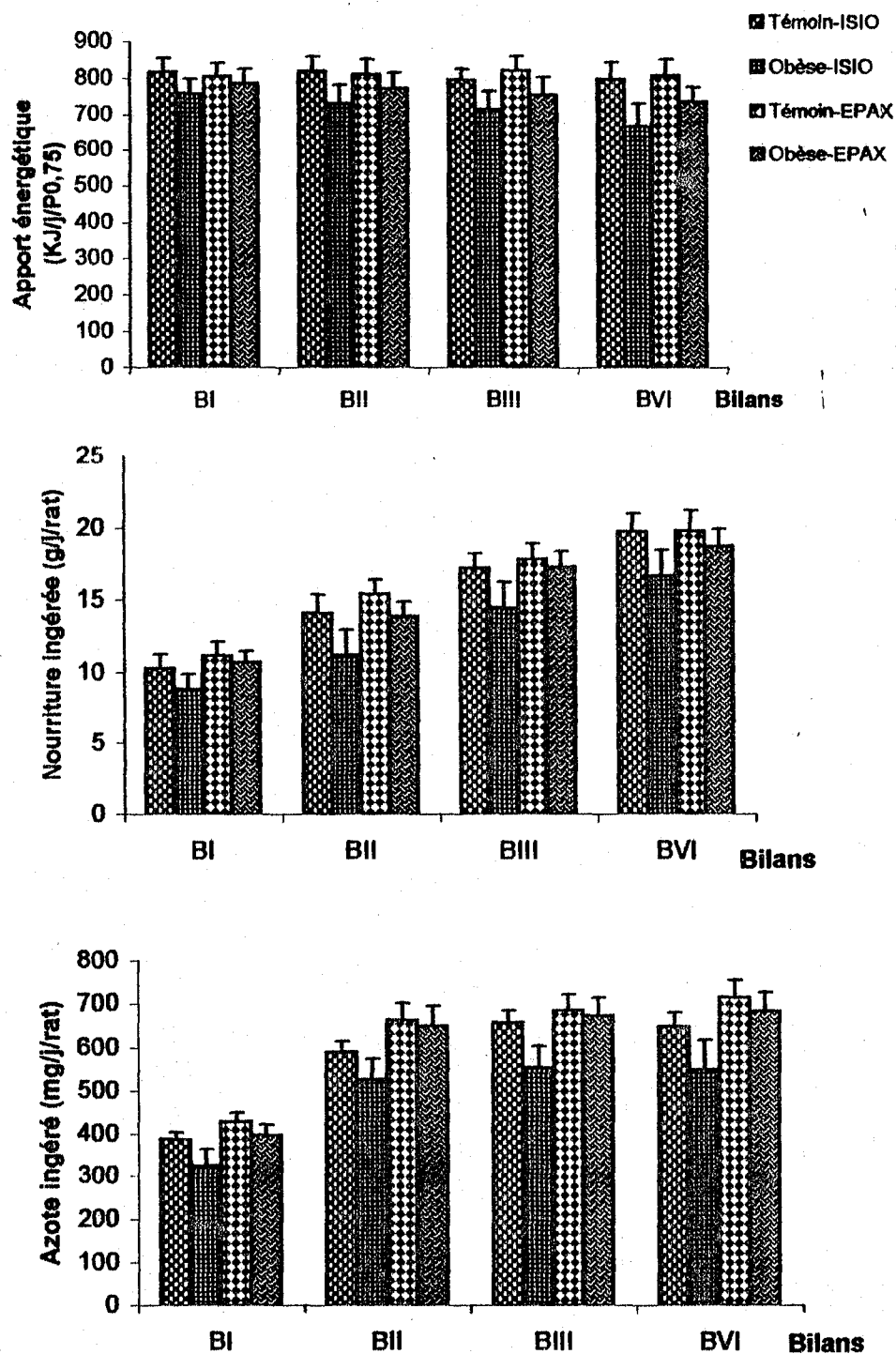
#### I 2 1. Consommation alimentaire (Fig 2)

La consommation alimentaire quotidienne (exprimée en g/j/rat) augmente avec l'âge des animaux. En effet de BI à BIV, les rats témoins et obèses ont une consommation alimentaire qui double pour les deux types de régimes ISIO et EPAX.

De BI à BIV, la nourriture ingérée est similaire chez les rats obèses de mères diabétiques sous régime ISIO comparés à leurs témoins. Aucune différence n'est notée entre les rats obèses de mères diabétiques sous régime EPAX comparés à leurs témoins.



**Fig 1:** Evolution du poids corporel (g) chez les rats témoins et obèses de la naissance jusqu'à l'âge de 3 mois, Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n = 8 rats, la comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par l'ANOVA II  
 \* P<0.05 ; \*\* P<0.01 Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime  
 § P<0.05; §§ P<0.01 Différence significative entre régime ISIO et régime EPAX.



**Fig 2 : Effet du régime EPAX sur l'apport énergétique, nourriture et azote ingérés au cours des bilans nutritionnels,**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=8 BI: 30ème-37ème j; BII: 53ème-60ème, BIII: 60ème-67ème j, BIV: 83ème- 90ème j de l'expérimentation,

La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student

\* (P<0.05) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime

§ (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

Cependant, le régime EPAX n'entraîne aucune modification significative de la consommation alimentaire quotidienne chez les rats obèses comparés aux rats obèses du groupe ISIO au cours des quatre bilans.

Au cours du BI, BII, BIII et BIV, l'apport énergétique (exprimé en  $\text{KJ}/\text{j}/\text{P}^{0.75}$ ) est semblable chez rats obèses à celui des témoins aux différents quelque soit le régime EPAX ou ISIO.

### **1.2.2. Azote ingéré et excrété (Fig 2 et Fig 3).**

Une augmentation progressive et significative de l'ingéré azoté (exprimé en  $\text{mg}/\text{j}/\text{rat}$ ) est notée du BI au BIV, dans les quatre lots de rats (Fig 2).

L'azote ingéré par les rats obèses de mère ISIO et EPAX diabétique ne présente aucune différence significative comparée à leurs témoins respectifs aux différents bilans

De BII à BIV, l'azote urinaire et excrété total (exprimé en  $\text{mg}/\text{j}/\text{rat}$ ) diminue significativement chez les rats obèses de mères diabétiques ISIO comparés aux témoins du même groupe (Fig 3). Par contre, aucune différence significative n'est observée entre les rats obèses sous régime EPAX et leurs témoins.

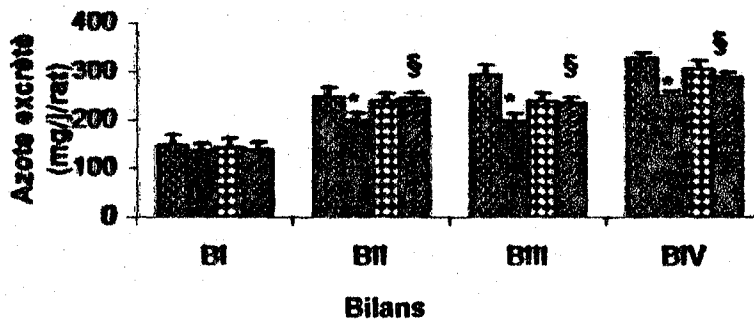
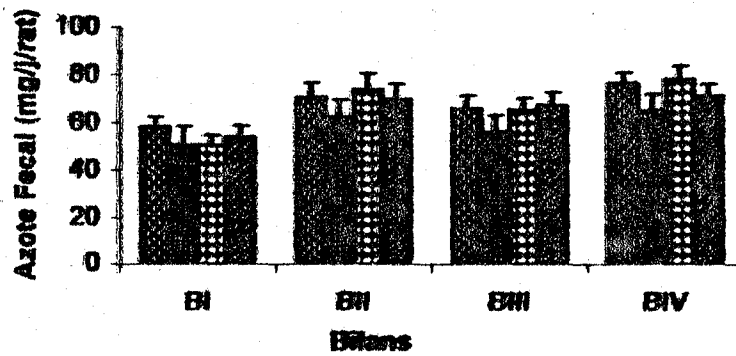
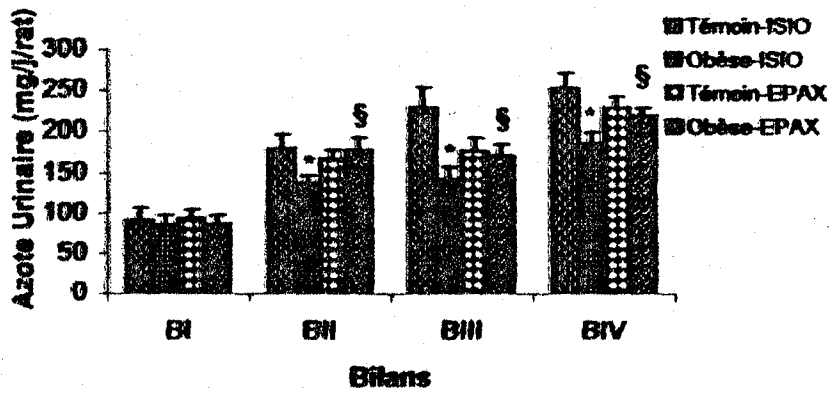
Le régime EPAX augmente significativement l'azote urinaire et excrété chez les rats obèses comparés aux rats obèses nourris par le régime ISIO.

Les différences ne sont pas significatives au BI (Fig 3).

De BI à BIV, l'azote fécal est semblable chez les rats témoins et obèses nourris par les deux régimes ISIO et EPAX (Fig 3).

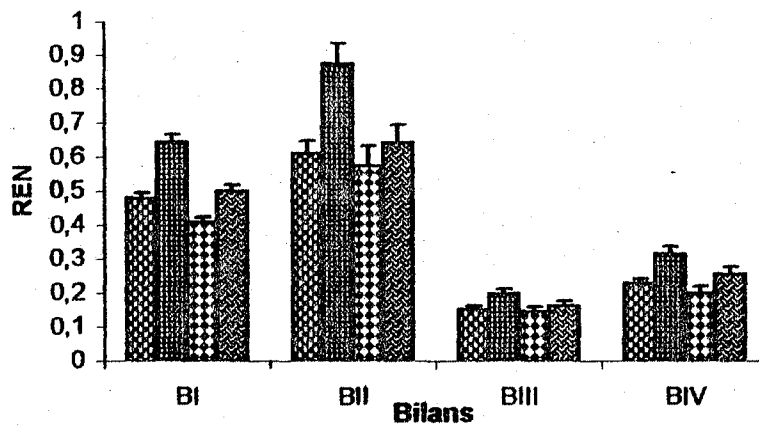
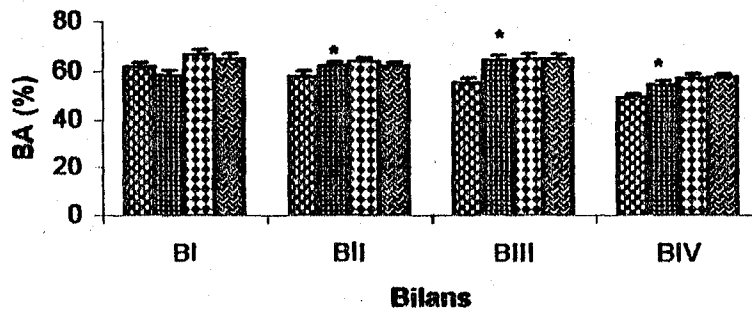
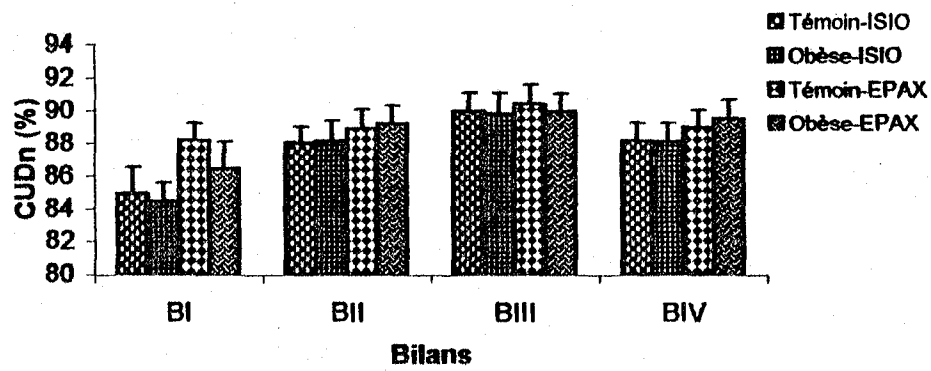
### **1.2.3 Coefficient d'utilisation digestive apparente de l'azote ( $\text{CUD}_N$ ), bilan azoté (BA) et rapport d'efficacité nutritionnelle (REN) (Fig 4).**

Aux bilans BI, BII, BIII et BIV, les  $\text{CUD}_N$  des 4 lots de rats sont similaires (Fig 4).



**Fig 3 :** Effet du régime EPAX sur l'azote urinaire, fécal, et excrété, Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=8 BI: 30ème-37ème j; BII: 53ème-60ème j, BIII: 60ème-67ème j, BIV: 83ème- 90ème j de l'expérimentation, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student

\* (P<0.05) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX



**Fig 4 :** Effet du régime EPAX sur le coefficient d'utilisation digestive apparente de l'azote (CUDN), Bilan azoté (BA) et rapport d'efficacité nutritionnelle (REN) Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=8 BI: 30ème-37ème j; BII: 53ème-60ème j, BIII: 60ème-67ème j, BIV: 83ème- 90ème j de l'expérimentation, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student

\* (P<0.05) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

Aux bilans I et II, les BA sont semblables pour les 4 lots de rats, alors qu'aux bilans BIII et BIV on note une augmentation significative des BA chez les rats obèses nourris par le régime EPAX comparés aux rats témoins du même groupe. Cependant aucune différence significative n'est retrouvée chez les rats obèses consommant le régime EPAX comparés à leurs témoins et aux rats obèses nourris par le régime ISIO (Fig 4).

Les REN décroissent avec l'âge des animaux, dans les 4 lots de rats.

Les REN sont significativement plus élevés chez les rats obèses-ISIO et obèses-EPAX comparés à leurs témoins respectifs ; les différences étant importantes aux bilans I et II. Cependant on note une diminution significative des REN chez les rats obèses du groupe EPAX comparés aux rats obèses du groupe ISIO (Fig 4).

#### **1.2.4 Coefficient d'utilisation digestive apparente de lipides (CUD<sub>L</sub>) (Fig 5).**

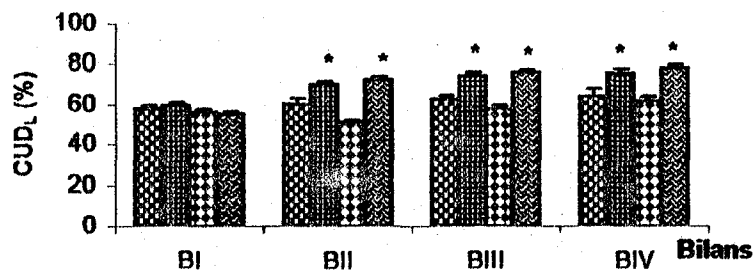
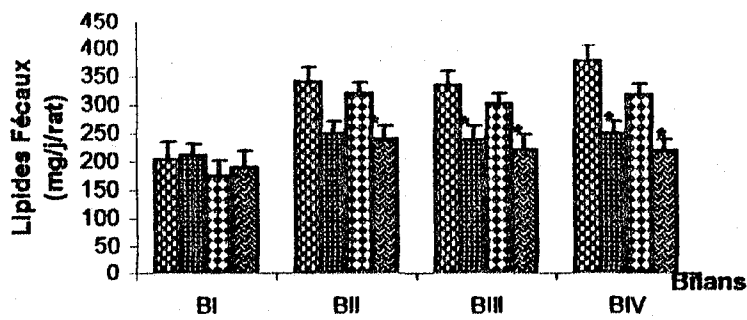
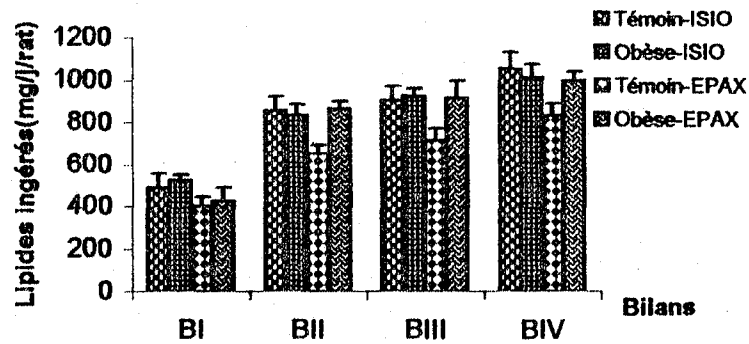
Les quantités de lipides ingérés par rats obèses sous régime ISIO ou EPAX (mg/j/rat) sont semblables à ceux des rats témoins sous les mêmes régimes aux différents bilans

Au bilan BI, l'excrétion fécale des lipides (mg/j/rat) est similaire chez les rats ISIO et EPAX obèses et leurs témoins respectif. Par contre, aux bilans B II, B III et BIV, la quantité de lipides fécaux est significativement diminuée chez les rats obèses consommant le régime ISIO et EPAX comparés à leurs témoins respectifs.

Ainsi les CUD<sub>L</sub> chez les rats obèse ISIO et EPAX sont plus élevés que ceux de leurs témoins aux bilans II, III et IV.

## **II Evolution des teneurs sériques en insuline et en glucose**

L'injection de la STZ au 21<sup>ème</sup> jour de la gestation entraîne une augmentation significative de la glycémie ( $15.20 \pm 2.10\text{mM}$ ) par rapport aux mères témoins



**Fig 5 :** Effet du régime EPAX sur les lipides ingérés, lipides fécaux et le coefficient d'utilisation digestif apparenté des lipides (CUD<sub>L</sub>), Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=8 BI: 30ème-37ème j; BII: 53ème-60ème j, BIII: 60ème-67ème j, BIV: 83ème- 90ème j de l'expérimentation, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student

\* (P<0.05) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime

§ (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX



( $4.89 \pm 0.21\text{mM}$ ), alors que le régime EPAX diminue significativement la glycémie chez les mères gestantes diabétiques ( $8.80 \pm 0.21\text{mM}$ ).

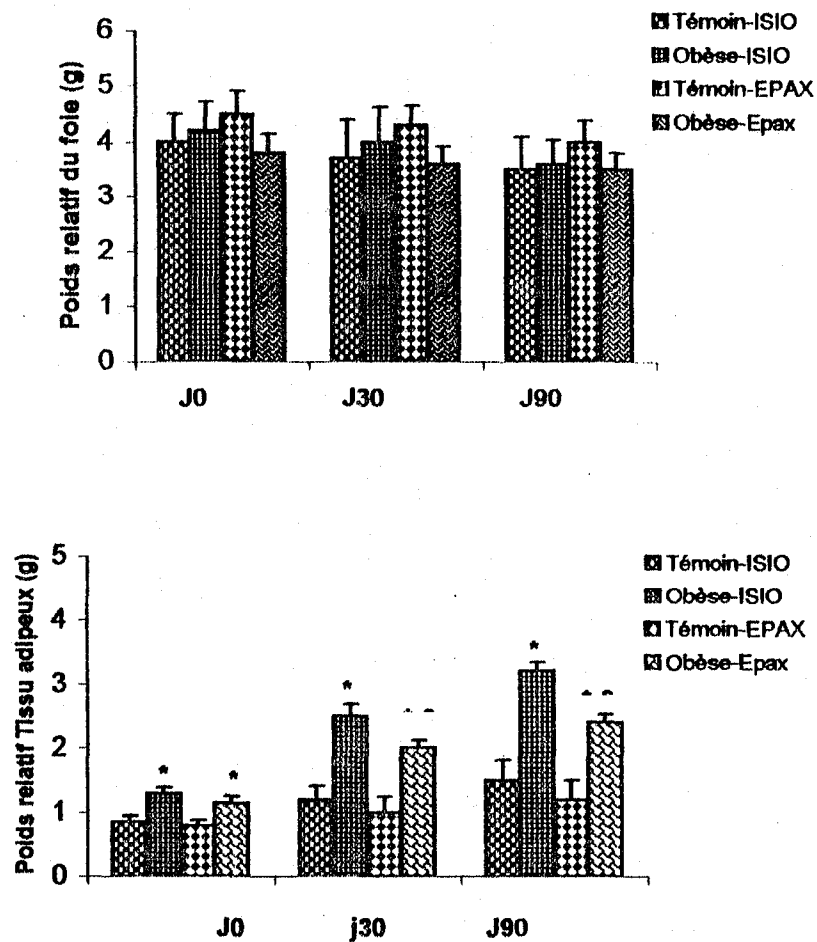
A la naissance, et après la sélection des nouveaux nés obèses, ces derniers sont hyperglycémiques ( $9.13 \pm 1.89\text{ mM}$ ) et hyperinsulinémiques ( $93.52 \pm 8.33\text{ pmol/l}$ ) Comparés aux rats témoins ( $4.60 \pm 0.75\text{mM}$  pour le glucose et  $48 \pm 6.89\text{ pmol/l}$  pour l'insuline).

L'évolution au cours du temps montre une augmentation significative de la glycémie et de l'insulinémie chez les rats témoins et obèses. Cependant, le régime EPAX n'influence pas les teneurs sériques en insuline et en glucose durant les deux premiers mois de la vie postnatale. Par contre au troisième mois (J 90), les rats obèses sous régime ISIO présentent une augmentation significative de la glycémie ( $16.30 \pm 1.10\text{mM}$ ) et de l'insulinémie ( $310 \pm 25.47\text{pmol/l}$ ) comparés aux rats obèses sous régime EPAX ( $13.25 \pm 1.22\text{mM}$  pour le glucose et  $228 \pm 26\text{ pmol/l}$  pour l'insuline) et aussi par rapport aux rats témoins ( $5.23 \pm 0.64\text{mM}$  pour la glycémie et  $150 \pm 13\text{ pmol/l}$  pour l'insulinémie).

### **III Evolution du poids et des teneurs en lipides totaux des organes.**

#### **III 1. Poids relatifs des organes (Fig 6).**

Le poids relatif des organes (poids de l'organe/poids du rat x 100) renseigne sur la croissance pondérale de l'organe par rapport à celle de l'organisme entier. Alors que le poids du foie reste stable au cours du temps chez les rats témoins et obèses pour les deux régimes (ISIO et EPAX ), le poids relatif du tissu adipeux augmente significativement avec l'âge chez les rats obèses sous régime ISIO et EPAX comparés à leurs témoins respectifs. Quelque soit l'âge des rats et quelque soit le régime consommé, le tissu adipeux est plus important chez les rats obèses



**Fig 6** : Effet du régime EPAX sur le poids relatif du foie et du tissu adipeux chez les rats témoins et obèses à J0, J30 et J90  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n = 15, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

comparés aux témoins. Cependant, aucune différence n'est notée entre les rats témoins sous régime EPAX comparés aux rats témoins sous régime ISIO.

A J30 et J90, le régime EPAX diminue significativement le poids relatif du tissu adipeux chez les rats obèses comparés aux rats obèses consommant le régime ISIO.

## **III 2 . Teneurs en lipides totaux des différents tissus (Fig 7)**

### **III 2 1. Teneurs en lipides totaux du foie**

A la naissance, les teneurs en lipides du foie ne montrent aucune variation chez les rats obèses de mères diabétiques ISIO et EPAX comparés à leurs témoins respectifs. Par contre, à J30 et J90, ces valeurs augmentent significativement chez les rats obèses sous régime ISIO comparés aux témoins du même groupe.

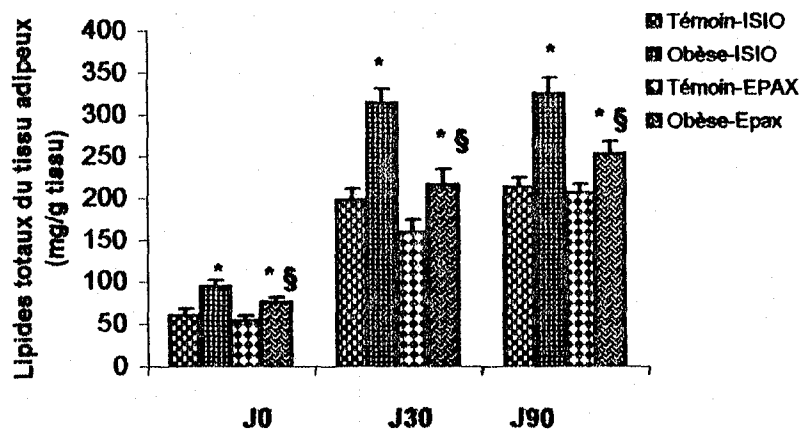
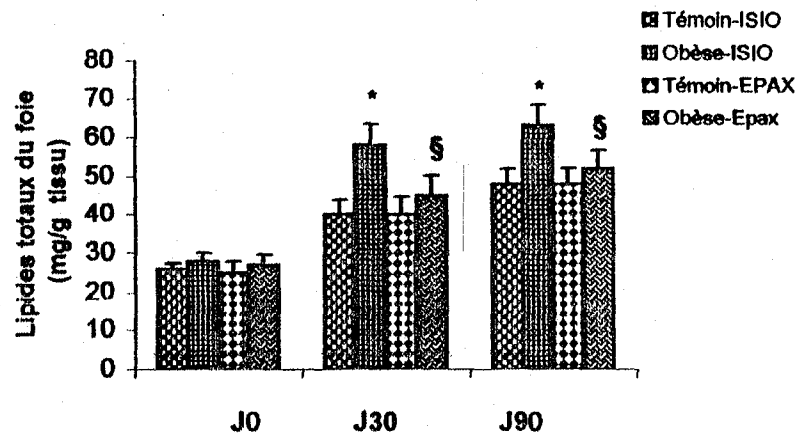
Le régime EPAX diminue significativement le contenu en lipides totaux du foie chez les rats obèses comparés aux rats obèses du groupe ISIO.

### **III 2 2. Teneurs en lipides totaux du tissu adipeux.**

A la naissance, les teneurs en lipides totaux du tissu adipeux sont significativement plus élevées chez les rats obèses de mères diabétiques sous régime ISIO ou EPAX comparés à leurs témoins respectifs. Aucune différence n'est notée entre les rats témoins sous régime ISIO comparés aux témoins sous régime EPAX.

Cependant, le régime EPAX diminue significativement le contenu en lipides totaux du tissu adipeux chez les nouveaux-nés obèses de mères diabétiques EPAX comparés aux nouveaux nés obèses de mères diabétiques ISIO.

Les mêmes variations sont retrouvées chez les différents groupes de rats à J30 et J90. La réduction des teneurs en lipides totaux du tissu adipeux par le régime EPAX est importante à J30 et J90.



**Fig 7** : Effet du régime EPAX sur les teneurs en lipides totaux du foie et du tissu adipeux chez les rats témoins et obèses à J0, J30 et J90  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n =15, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

## **IV Effet du régime EPAX sur les teneurs sériques en lipides.**

### **1-Teneurs sériques en cholestérol total. (Fig 8 et Fig 9)**

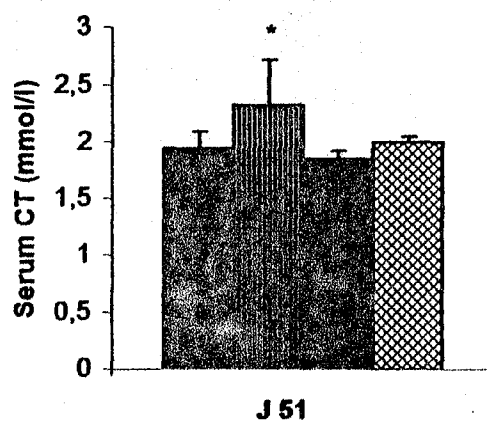
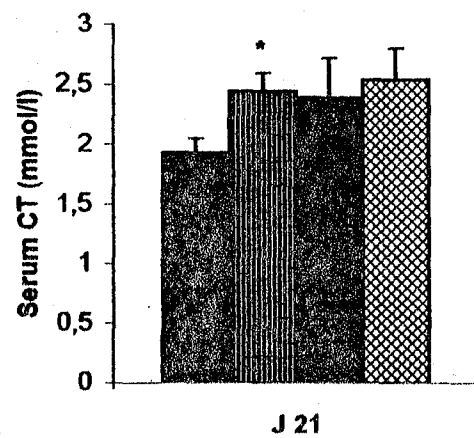
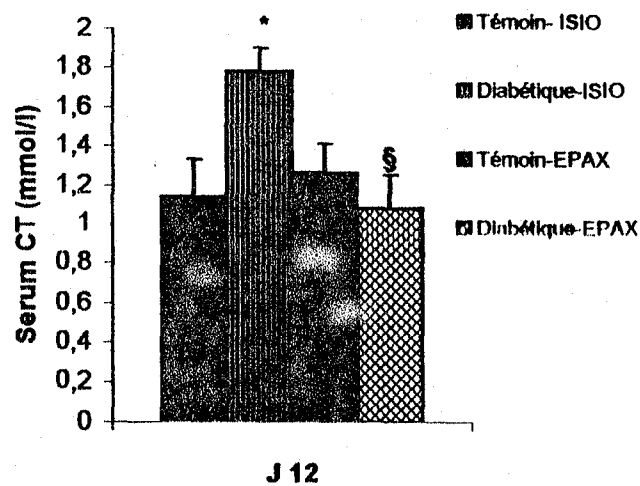
Chez les mères diabétiques consommant le régime ISIO à J12 et J21 de la gestation, les teneurs sériques en cholestérol total (CT) sont significativement augmentées ( $p < 0.05$ ) par rapport au mères témoins consommant le même régime. Cependant, aucune différence n'est notée entre les mères diabétiques et témoins consommant le régime EPAX. A J12 de la gestation, on note une diminution significative du taux de CT chez les mères diabétiques consommant le régime EPAX par rapport aux mères diabétiques consommant le régime ISIO (Fig 8).

L'évolution au cours du temps montre que le CT est toujours significativement plus élevé chez les mères diabétiques sous régime ISIO après un mois de gestation (J51) comparées au rates témoins sous le même régime, alors qu'aucune différence significative n'est notée chez les rates diabétiques EPAX comparées aux témoins du même groupe et aux rates diabétiques du groupe ISIO (Fig 8).

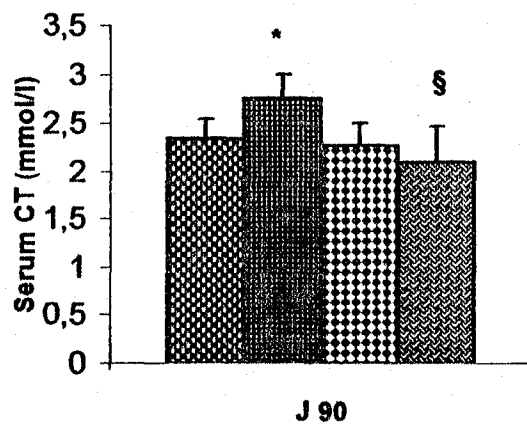
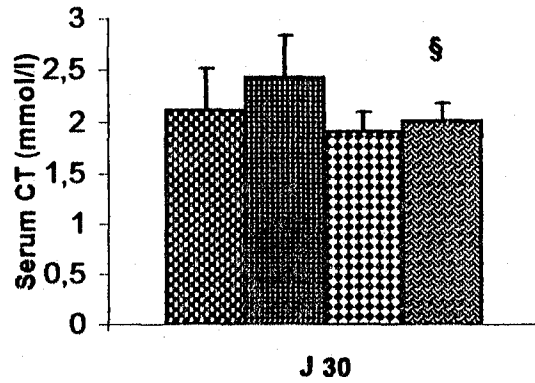
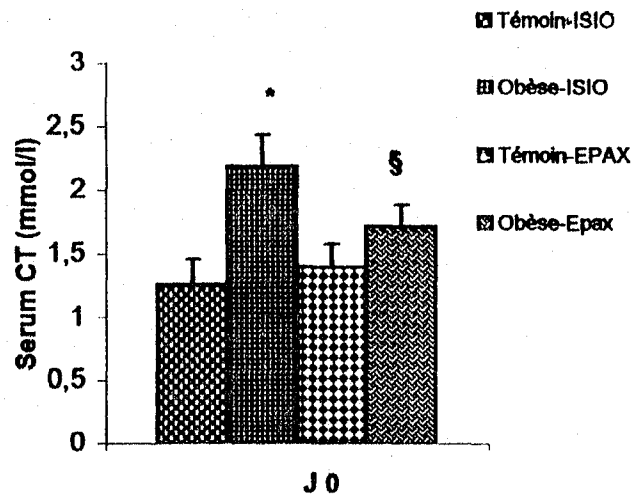
A la naissance, les nouveaux nés obèses de mères diabétiques ISIO montrent une augmentation significative des teneurs sériques en CT comparés aux valeurs des nouveaux-nés de mères témoins sous le même régime, alors qu'aucune variation n'est notée chez les rats obèses de mères diabétiques consommant le régime EPAX comparés aux nouveaux-nés de mères sous le même régime (Fig 9).

Cependant, une diminution significative du taux de CT est notée chez les rats obèses de mères diabétiques EPAX comparés aux rats obèses de mères diabétiques ISIO (Fig 9).

Les mêmes variations sont retrouvées pour les différents groupes de rats étudiés à J30 et J90 (Fig 9).



**Fig 8 : Teneurs sériques en cholestérol total (CT) chez les mères diabétiques à j12 et j21 de la gestation et à J51 (1 mois après la gestation)**  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n =15, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX



**Fig 9 : Teneurs sériques en cholestérol total (CT) chez les rats témoins et obèses à J 0, J 30 et J 90**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n =15, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de student

\* (P<0.05) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime

§ (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

## **2-Teneurs sériques en triglycérides. (Fig 10 et Fig 11).**

A J12 et J 21 de la gestation, les rates diabétiques consommant le régime ISIO présentent des teneurs sériques élevées en triglycérides (TG) comparées à leurs témoins. Par contre, les teneurs sériques en TG chez les diabétiques consommant l'EPAX sont similaires aux témoins sous le même régime (Fig 10).

On note une diminution significative de ce taux chez les rates diabétiques sous régime EPAX versus diabétiques consommant le régime ISIO (Fig 10).

Les mêmes résultats sont retrouvés chez les mères un mois après la gestation (J51) (Fig 10).

A la naissance, les rats obèses de mères diabétiques sous régime ISIO ont des teneurs en TG sériques significativement élevées par rapport aux témoins, alors que les rats obèses de mères diabétiques consommant le régime EPAX ne présentent aucune différence significative avec leurs témoins (Fig 11)

Le régime EPAX diminue significativement les teneurs sériques en TG chez les rats obèses de mères diabétiques comparés aux rats obèses de mères diabétiques sous régime ISIO (Fig 11).

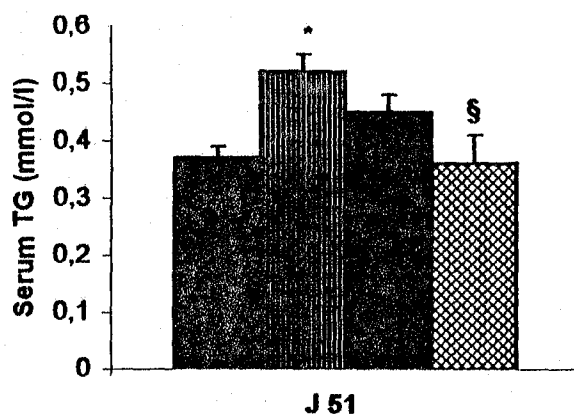
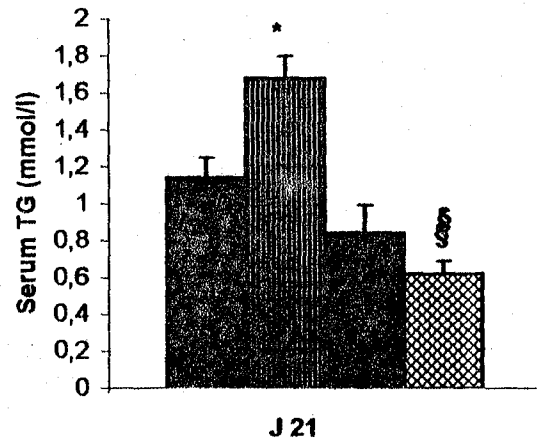
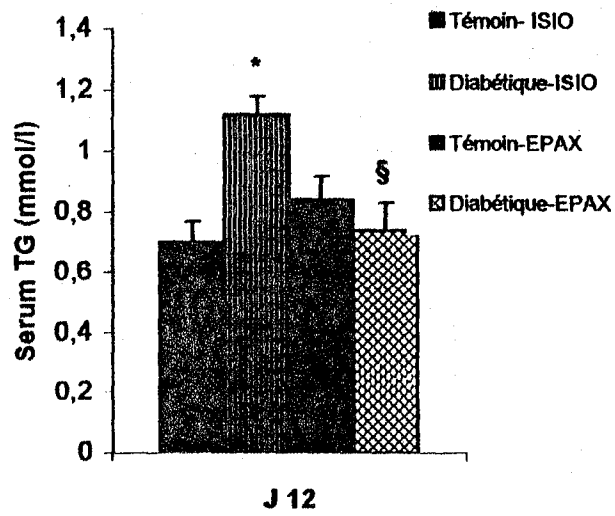
Les mêmes variations sont trouvées pour les différents groupes de rats étudiés à J30 et J90 (Fig 11).

## **3-Teneurs sériques en phospholipides. (Fig 12 et Fig 13)**

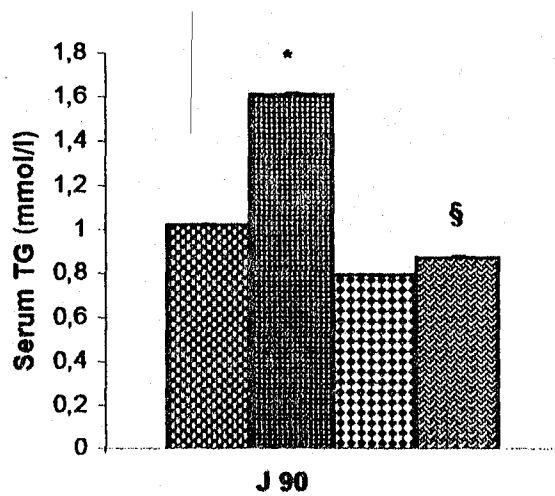
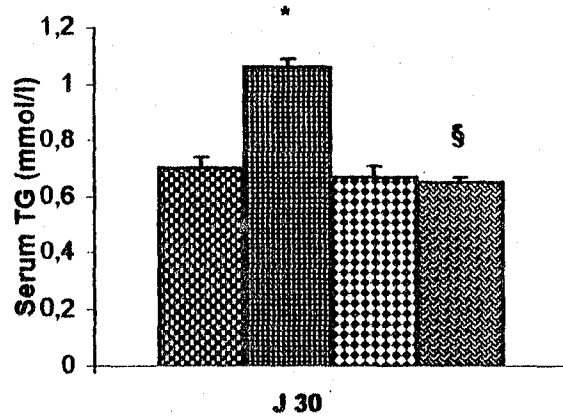
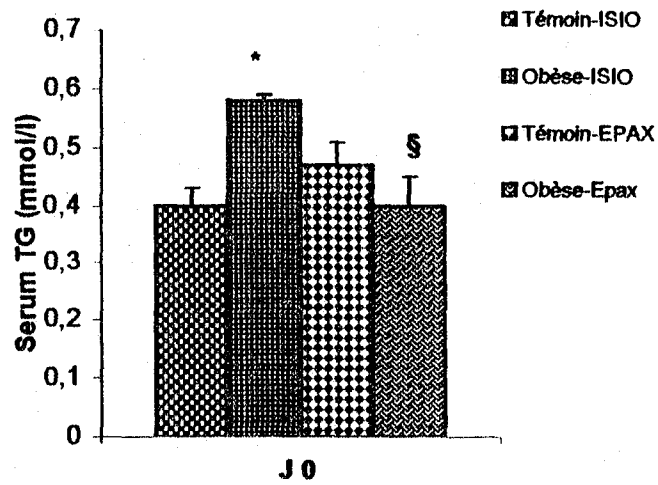
Chez les mères diabétiques sous régime ISIO à J12 et J21 de la gestation, les teneurs sériques en phospholipides (PL) sont significativement augmentées ( $p < 0.05$ ) par rapport aux témoins du même régime.

La même augmentation est retrouvée chez les mères diabétiques EPAX comparées à leurs témoins (Fig 12). Cependant, les taux des PL sériques chez les rates diabétiques EPAX sont similaires à ceux des diabétiques ISIO (Fig 12).





**Fig 10 : Teneurs sériques en triglycéride (TG) chez les mères diabétiques à j12 et j21 de la gestation et à J51 (1 mois après la gestation)**  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n =15, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX



**Fig 11: Teneurs sériques en triglycérides (TG) chez les rats témoins et obèses à J 0, J 30 et J 90**  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n =15, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

A J51, aucune différence significative n'est notée chez les différents groupes de rat étudiés (Fig 12).

A la naissance, les teneurs sériques en PL sont significativement élevées chez les rats obèses du groupe ISIO comparés à celles des rats témoins du même groupe. Dans le groupe EPAX, les concentrations en PL chez les obèses sont similaires à leurs témoins (Fig 13).

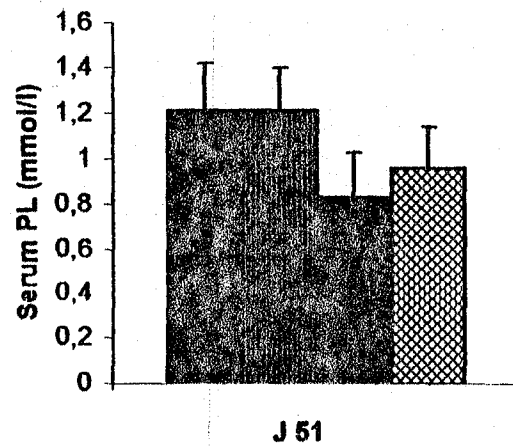
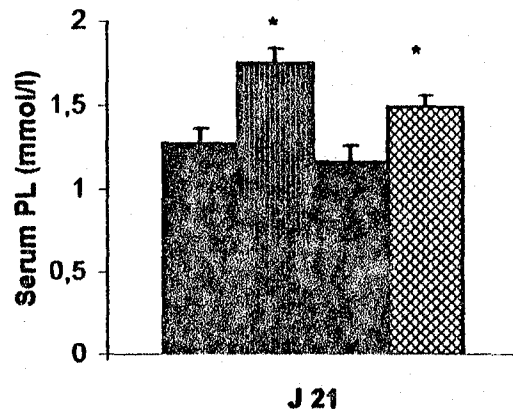
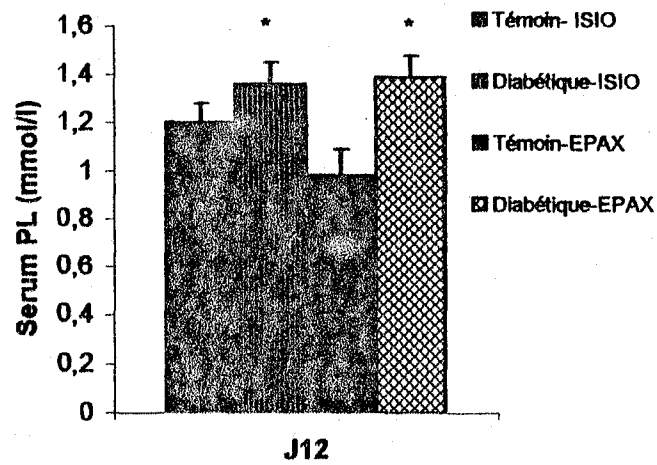
Aucune différence significative n'est notée pour le taux de PL sériques entre les rats obèses de mères diabétiques sous régime EPAX et les rats obèses de mères diabétiques sous régime ISIO (Fig 13).

A j30, aucune variation n'est notée chez les différents groupes de rats étudiés (Fig 13).

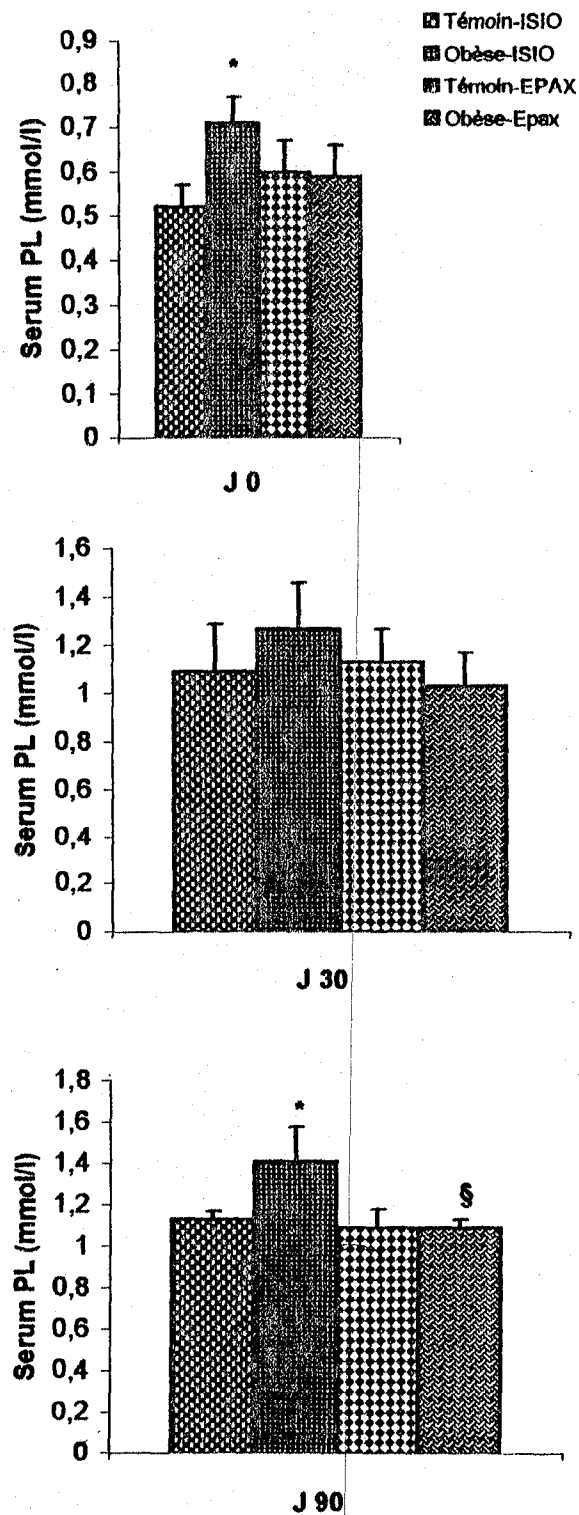
Cependant à J90, une augmentation significative des taux de PL est notée chez les rats obèses sous régime ISIO comparés aux témoins du même groupe. Par contre, le régime EPAX n'influence pas les concentrations en PL chez les rats témoins alors qu'il entraîne une diminution significative ( $p < 0.05$ ) des PL sériques chez les rats obèses (Fig 13).

## **V Effets du régime EPAX sur la prolifération lymphocytaire-T (Fig14 et Fig 15).**

La prolifération cellulaire est estimée par le test de transformation lymphocytaire (TTL). Afin d'évaluer le rôle du régime EPAX sur la prolifération cellulaire, nous avons stimulé par la concavaline A (Con-A, agent mitogène spécifique des cellules T) les splénocytes-T des rats témoins et diabétiques. Après incubation et incorporation de la radioactivité de la  $^3\text{H}$ - thymidine, nous avons ensuite calculé l'index de stimulation qui est égal au rapport des cpm des cellules stimulées par la Con-A sur cpm des cellules non stimulées.



**Fig 12 : Teneurs sériques en phospholipides (PL) chez les mères diabétiques à j12 et j21 de la gestation et à J51 (1 mois après la gestation)**  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n =15, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX



**Fig 13 : Teneurs sériques en phospholipides (PL) chez les rats témoins et obèses à J 0, J 30 et J 90**  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n =15, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

A J12 et J21 de la gestation, les mères diabétiques montrent une diminution significative de la prolifération cellulaire induite par la Con A comparées aux témoins du même groupe, alors qu'elle ne varie pas significativement chez les rates diabétiques sous régime EPAX comparées aux témoins nourris par le même régime (Fig 14). Le régime Epax stimule la prolifération cellulaire entraînant une élévation significative de l'index de stimulation chez les rates diabétiques à J12 et J21 de la gestation comparées aux rates diabétiques nourris par le régime ISIO (Fig 14).

Des résultats similaires sont retrouvés chez les mères un mois après la gestation (J51) (Fig 14).

La prolifération cellulaire n'est pas déterminée à la naissance (J0) car les nouveaux nés n'ont pas suffisamment de splénocytes pour réaliser cette expérience. Dans ce cas il faudra que les rats atteignent au moins l'âge de un mois.

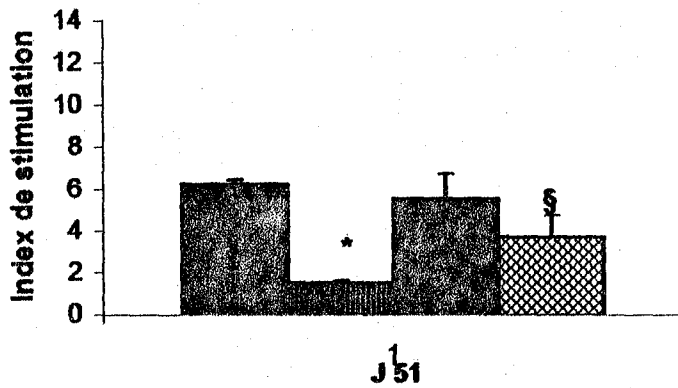
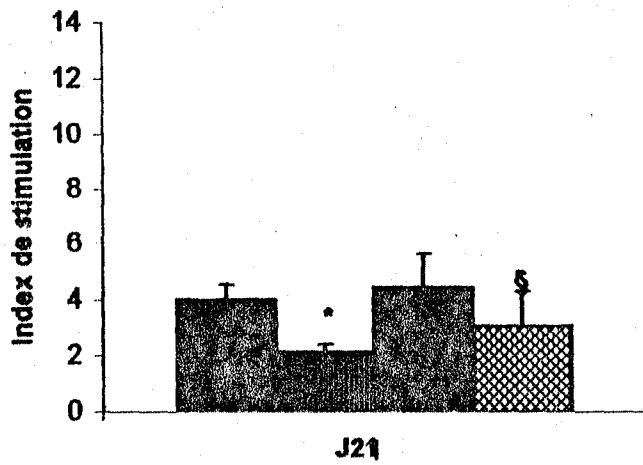
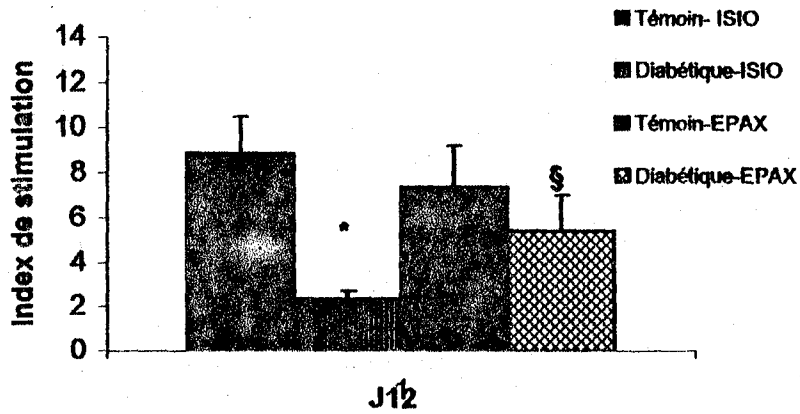
A J30, la prolifération cellulaire induite par la Con-A diminue significativement chez les rats obèses de mère diabétiques sous régime ISIO comparés à leurs témoins, contrairement au rats obèses sous régime EPAX qui ne présentent aucune différence significative avec les témoins sous le même régime (Fig15).

Le régime EPAX augmente significativement la prolifération cellulaire induite par la Con-A chez les rats obèses comparés aux rats obèses consommant le régime ISIO (Fig 15).

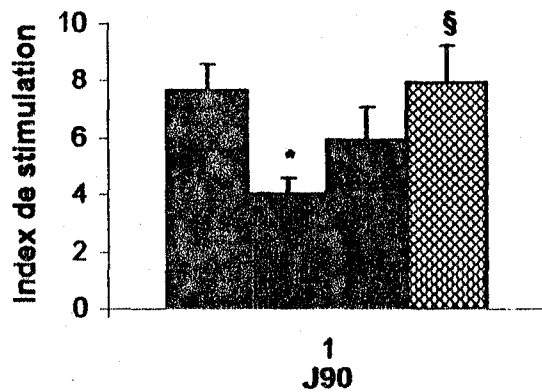
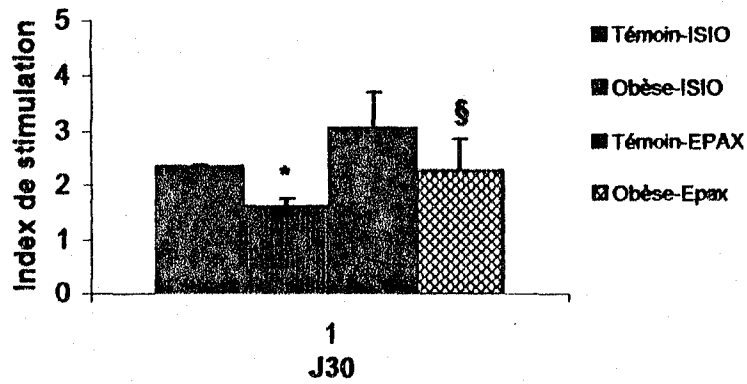
A J90, les mêmes variations sont notées dans les différents lots de rats (Fig 15).

## **VI Effet du régime EPAX sur la sécrétion de l'interleukine-2.**

L'interleukine-2 est un facteur autocrine et paracrine des lymphocytes-T. Afin de déterminer si des altérations de la production d'IL-2 peuvent être responsable des effets immunosuppresseurs du régime EPAX sur les splénocytes-T, nous avons dosé



**Fig14** : Effet du régime EPAX sur la prolifération cellulaire- T Induite par la Concavaline A chez les mères diabétiques à j12 et j21 de la gestation et à J51 (1mois après la gestation)  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n =15, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX



**Fig15** : Effet du régime EPAX sur la prolifération cellulaire- T induite par la Concaline A chez les rats témoins et obèses à J 30 et J 90  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n =15, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX



l'IL-2 dans le surnageant des splénocytes-T stimulés par la Con-A des rattes diabétiques gestantes et leurs progénitures.

A J12 et J21 de la gestation, la quantité d'IL-2 sécrétée est significativement plus élevée chez les rates diabétiques sous régime ISIO comparées aux témoins du même groupe

Le régime EPAX diminue significativement la quantité de cytokine sécrétée chez les mères diabétiques à J12 et J21 de la gestation comparées à leurs témoins et aux mères diabétiques ISIO (Tableau I).

Des résultats similaires sont retrouvés chez les mères un mois après la gestation (J51) (Tableau I).

Après le sevrage (J30), les rats obèses de mères diabétiques du groupe ISIO présentent une élévation significative de la production d'IL-2 comparés aux témoins, alors qu'on note une diminution significative de cette concentration chez les rats obèses de mères diabétiques consommant le régime EPAX comparés à leurs témoins et aux rats obèses de mères ISIO diabétiques (Tableau II).

Des résultats similaires sont retrouvés chez les rats à l'âge adulte à J90 (Tableau II).

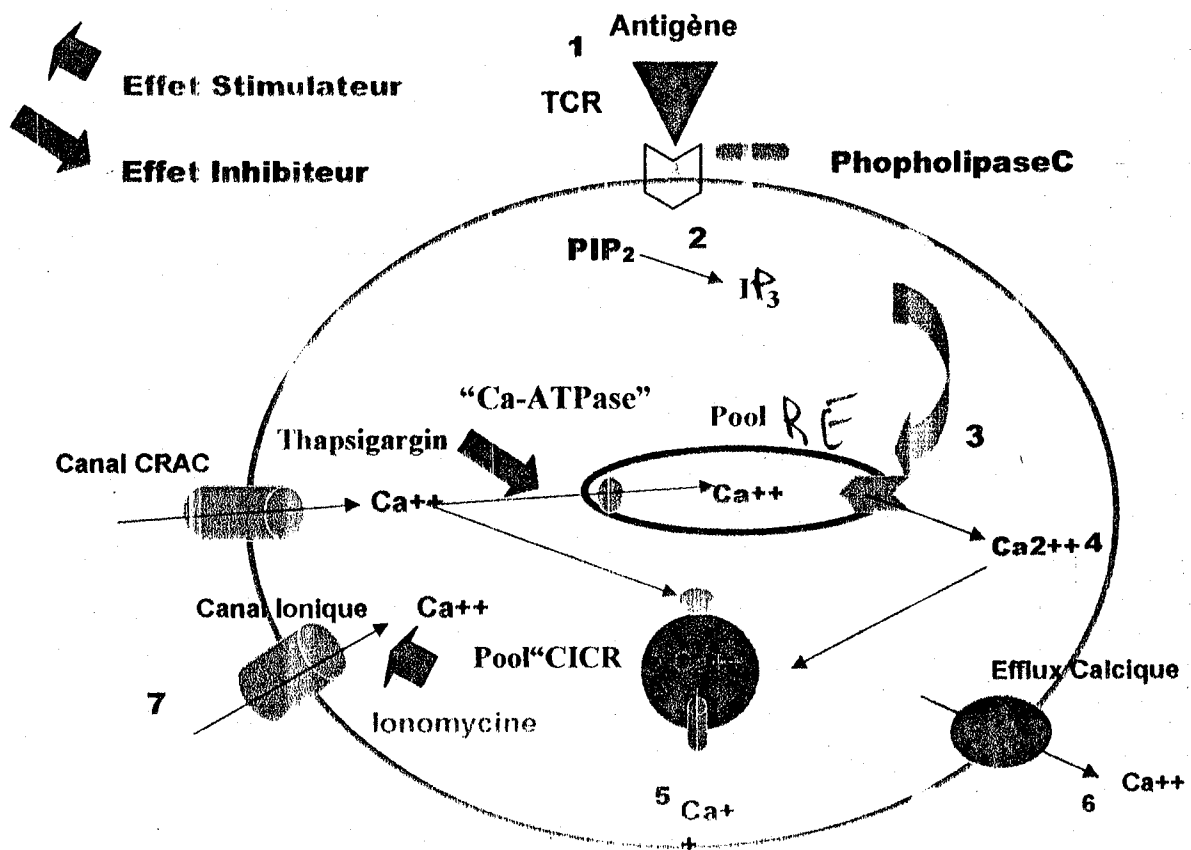
## **VII Effet du régime EPAX sur l'homéostasie calcique des splénocytes T.**

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la variation de la concentration du calcium intracellulaire (Fig 16). Certains agents sont capables de modifier cette concentration intracellulaire du  $[Ca^{2+}]_i$ , et peuvent être donc utilisés in vitro pour suivre les effets du régime EPAX sur l'homéostasie calcique.

### Les agents utilisés dans notre étude sont

La Thapsigargine qui inhibe la pompe  $Ca^{2+}$ -ATPASE.

L'ionomycine (100nM) qui ouvre les canaux calciques.



**Figure 16 : Modèle capacitatif de Putney (1997)**

Les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  dans l'ordre chronologique sont les suivants :

- 1- Interaction entre un antigène et TCR (T cell receptor)
- 2- La phospholipase C produit l' $IP_3$  à partir de  $PIP_2$ .
- 3-  $IP_3$  se fixe à son récepteur du réticulum endoplasmique (RE).
- 4- Le calcium est alors libéré à partir du pool du RE.
- 5- Cette petite quantité de  $Ca^{2+}$  va induire la libération massive de  $Ca^{2+}$  à partir du pool de CICR.
- 6- Efflux calcique vers le milieu extra-cellulaire.
- 7- L'influx de calcium via les canaux (CRAC) va permettre la reconstitution des pools intra-cellulaires.

**Tableau I :** Effet du régime EPAX sur la sécrétion d'IL-2 par les splénocytes-T stimulés par la ConA des mères témoins et diabétiques à J12 et J21 de la gestation et à J51 (1mois après la gestation)

Production d'IL-2	Témoin -ISIO	Diabétique -ISIO	Témoin -EPAX	Diabétique-EPAX
J12	401.8 ± 122	732.2 ± 105 *	478.9 ± 108	593.3 ± 105 §
J21	390.2 ± 114	768.8 ± 117 *	451.2 ± 114	543.7 ± 95 §
J51	410.3 ± 128	725.6 ± 107 *	492.3 ± 123	528.9 ± 98 §

Chaque valeur représente la moyenne ± ES, n=15, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student

- \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime
- § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

**Tableau II :** Effet du régime EPAX sur la sécrétion d'IL-2 par les splénocytes-T stimulés par la ConA des rats témoins et obèses à J30 et J90

Production d'IL-2	Témoin -ISIO	Obèse -ISIO	Témoin -EPAX	Obèse-EPAX
J30	408.3 ± 94	714.1 ± 110 *	472 ± 108	491 ± 105 §
J90	417.8 ± 102	733.5 ± 145 *	493 ± 94	514 ± 125 §

Chaque valeur représente la moyenne ± ES, n=15, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student

- \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime
- § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

## **1-Effet du régime EPAX sur la concentration basale intracellulaire. (Fig 17 et**

### **Fig 18).**

Lorsque les animaux sont nourris avec le régime ISIO, nos résultats montrent que la  $[Ca^{2+}]_i$  basale est significativement inférieure dans les splénocytes T des mères diabétiques au 12<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jour de la gestation comparées à celles des rates témoins.

A J12 et J21 de la gestation, le régime EPAX conduit à une augmentation significative ( $p < 0.05$ ), de la concentration basale en calcium chez les mères diabétiques comparés aux rates diabétiques ISIO (Fig 17).

De plus, la  $[Ca^{2+}]_i$  basale chez les rates gestantes diabétiques nourries avec le régime EPAX est significativement supérieure à celles des rates gestantes diabétiques sous régime ISIO à J12 et J21 (Fig 17).

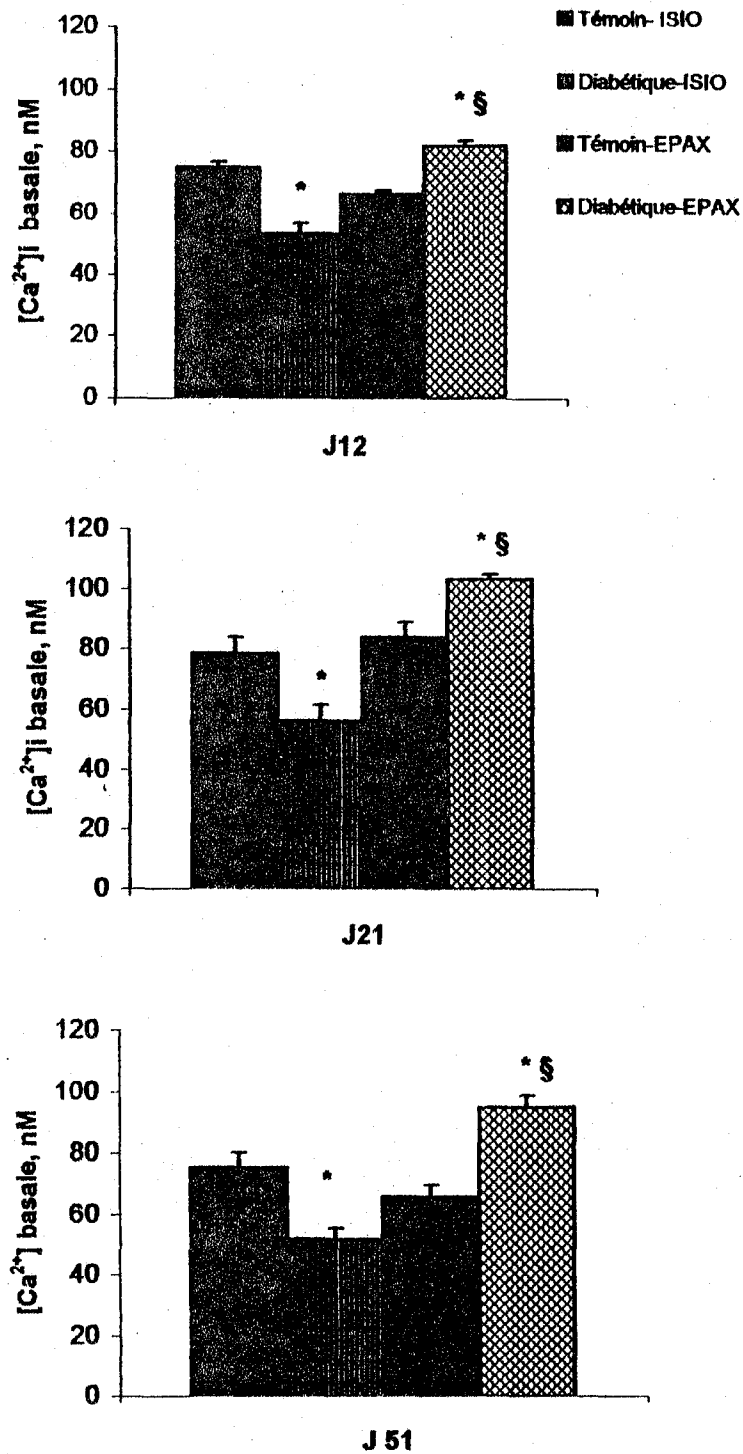
Les mêmes résultats sont retrouvés chez les mères un mois après la gestation (J51) (Fig 17).

Après le sevrage (J30), les rats obèses présentent le même profil calcique que leurs mères diabétiques pour les deux régimes.

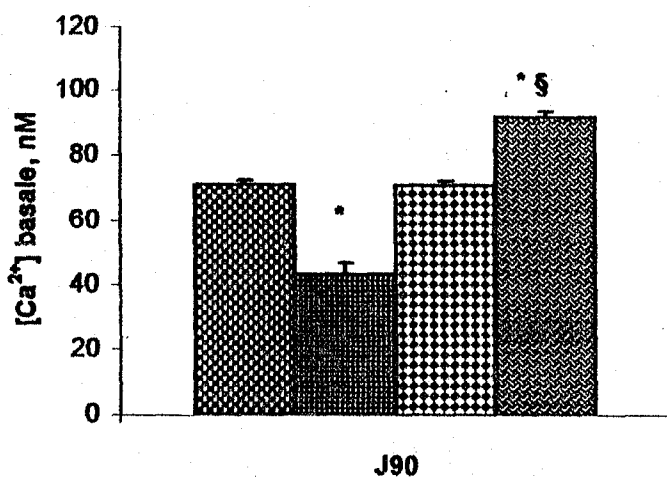
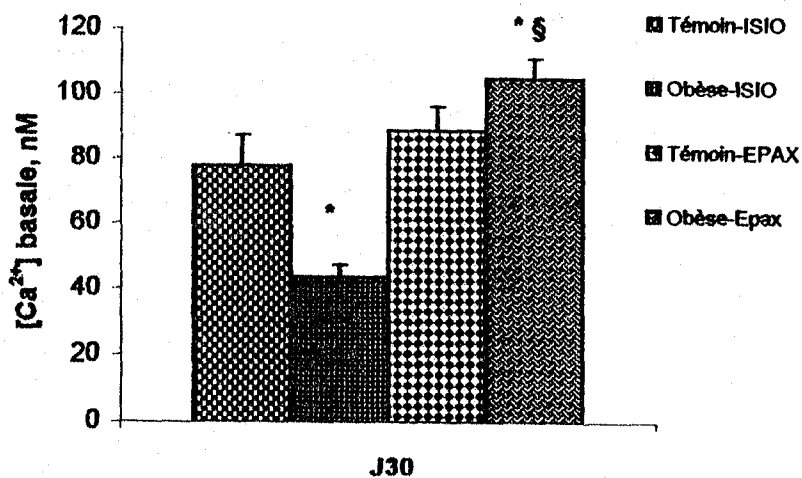
La  $[Ca^{2+}]_i$  basale est significativement inférieure dans les splénocytes T des rats obèses de mères diabétiques ISIO comparés aux témoins du même groupe.

Le régime EPAX entraîne une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) de la  $[Ca^{2+}]_i$  basale chez les rats obèses comparés à leurs témoins et aux rats obèses nourris de régime ISIO (Fig 18). A J90, les rats adultes présentent des résultats similaires à ceux observés à J30 (Fig 18).

## **2- Effet du régime EPAX sur l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'ionomycine. (Fig 19 et Fig 20).**



**Fig 17** : Effet du régime EPAX sur la concentration basale intra cellulaire ( $[Ca^{2+}]_i$ , nM basale) des splénocytes Tchez les mères diabétiques à j12 et j21 de la gestation et à J51(1mois après la gestation)  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n =15, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \* ( $P < 0.05$ ) Différence significative entre témoins et diabétiques pour chaque régime  
 § ( $P < 0.05$ ) Différence significative entre ISIO et EPAX



**Fig 18** : Effet du régime EPAX sur la concentration basale Intra cellulaire ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, nM basale) des splénocytes T chez les rats témoins et obèses à J 30 et J 90

Chaque valeur représente la moyenne ± ES, n =15, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student

\* (P<0.05) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime

§ (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

L'ionomycine utilisée à une concentration de 100nM permet l'ouverture spécifique des canaux calciques membranaires (Ferriere et al, 1997).

A J12 et J21 de la gestation, l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  induite par l'ionomycine est significativement plus élevée chez les rates diabétiques sous régime ISIO comparées aux témoins du même groupe

Le régime EPAX diminue significativement l'élévation du calcium intracellulaire suite à l'ionomycine chez les mères diabétiques à J12 et J21 de la gestation comparées à leurs témoins et aux mères diabétiques ISIO (Fig19).

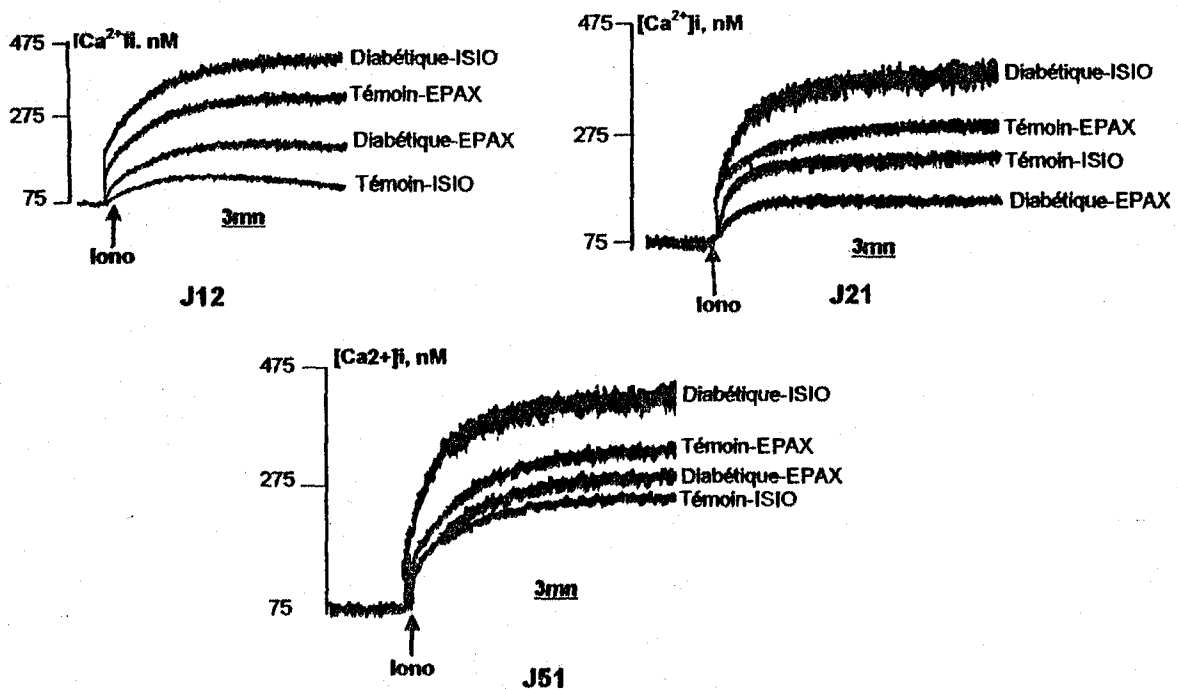
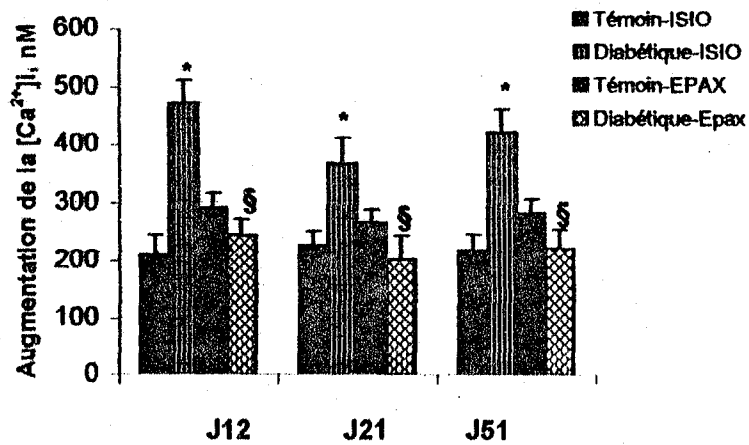
Des résultats similaires sont retrouvés chez les mères un mois après la gestation (J51) (Fig 19).

Après le sevrage (J30), les rats obèses de mères diabétiques du groupe ISIO présentent une élévation significative de l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  induite par l'ionomycine comparés aux témoins, alors qu'on note une diminution significative de cette concentration chez les rats obèses de mères diabétiques consommant le régime EPAX comparés à leurs témoins et aux rats obèses de mères ISIO diabétiques (Fig 20).

Des résultats similaires sont retrouvés chez les rats à l'âge adulte à J90 (Fig 20).

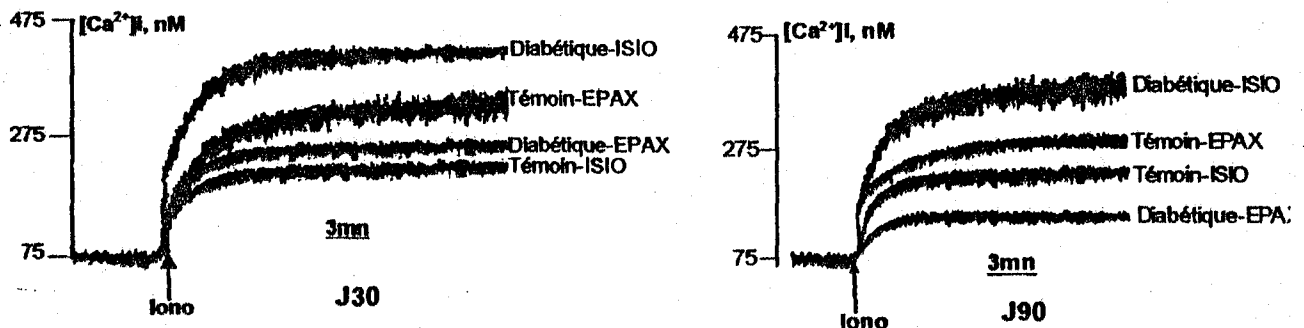
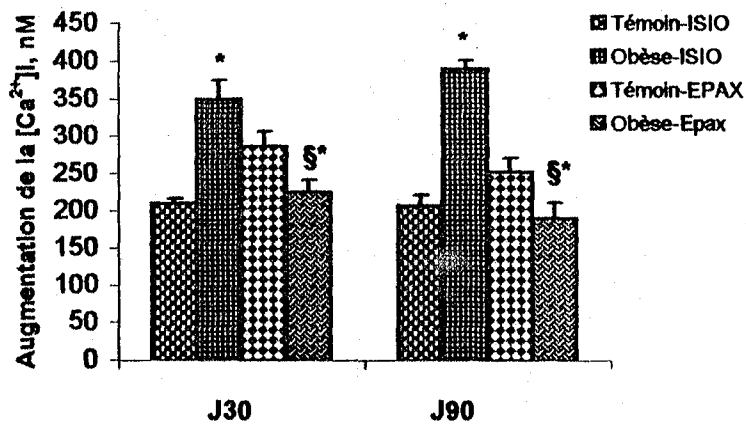
## **2- Effet du régime EPAX sur l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par la thapsigargine. (Fig 21, Fig 22, Fig 23 et Fig 24).**

La thapsigargine (Tg) est un inhibiteur de l'enzyme  $Ca^{2+}$ -ATPase, présente dans le reticulum endoplasmique (RE). Cet agent engendre une faible augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  en inhibant la recapture du calcium par le RE (Thastrup et al., 1990). Cette augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  conduit à une libération de calcium à partir du pool CICR



**Fig 19** : Effet du régime EPAX sur l'augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  dans les splénocytes de mères témoins et diabétiques à J12 et J21 de la gestation et à J51 (1 mois après la gestation) sous l'action de l'ionomycine (100nM) en présence de calcium extra-cellulaire. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES,  $n = 15$ . La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \* ( $P < 0.05$ ) Différence significative entre témoins et diabétiques pour chaque régime  
 § ( $P < 0.05$ ) Différence significative entre ISIO et EPAX





**Fig 20** : Effet du régime EPAX sur l'augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  dans les splénocytes des rats témoins et obèses à J30 et J90 sous l'action de l'ionomycine (100nM) en présence de calcium extra-cellulaire, Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES,  $n = 15$ , La comparalson des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \* ( $P < 0.05$ ) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime  
 § ( $P < 0.05$ ) Différence significative entre ISIO et EPAX

(Calcium Induced Calcium Release) puis à une sortie de calcium vers le milieu extracellulaire et enfin à un influx massif de calcium à partir du milieu extracellulaire afin de remplir les pools-intracellulaires.

A J12 et J21 de la gestation, les splénocytes des rates diabétiques ISIO présentent une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  suite à l'action de la Tg, significativement supérieure à celles des splénocytes des rates témoins consommant le même régime.

Le régime Epax diminue l'élévation de calcium intracellulaire suite à l'action de la Tg dans les splénocytes des rates diabétiques par rapport aux rates témoins et aux rates ISIO diabétiques (Fig 21).

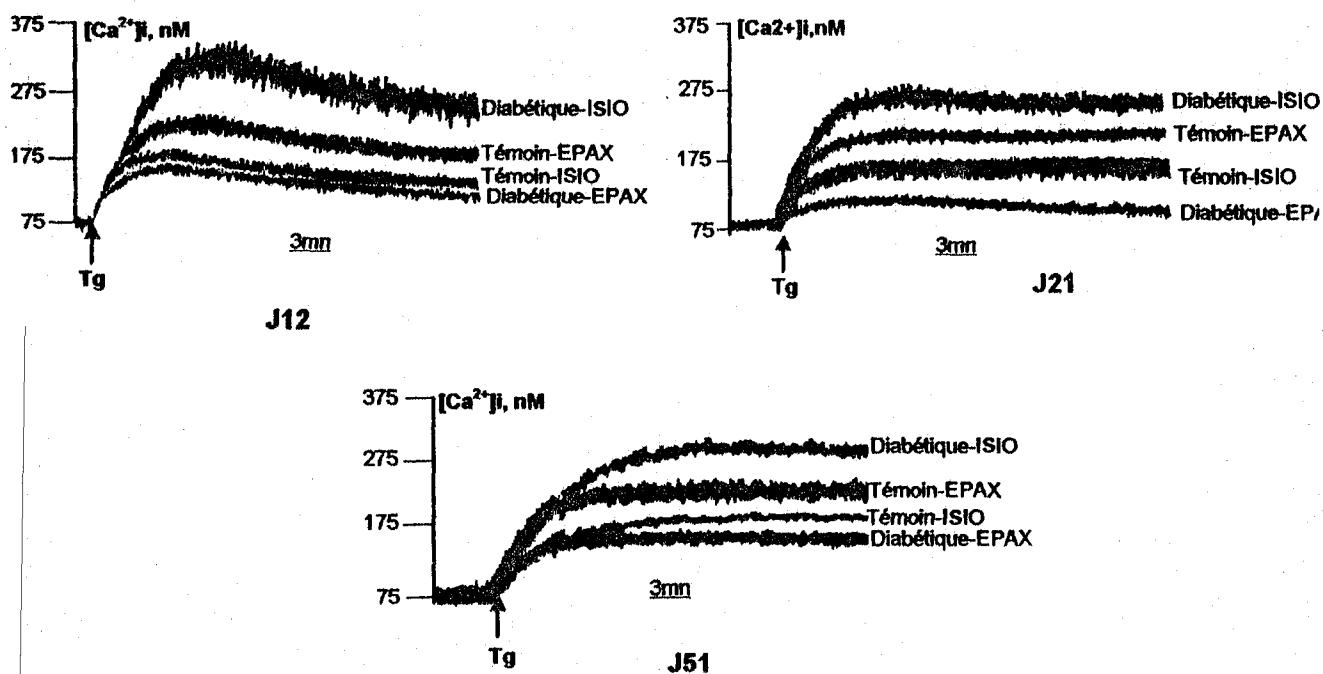
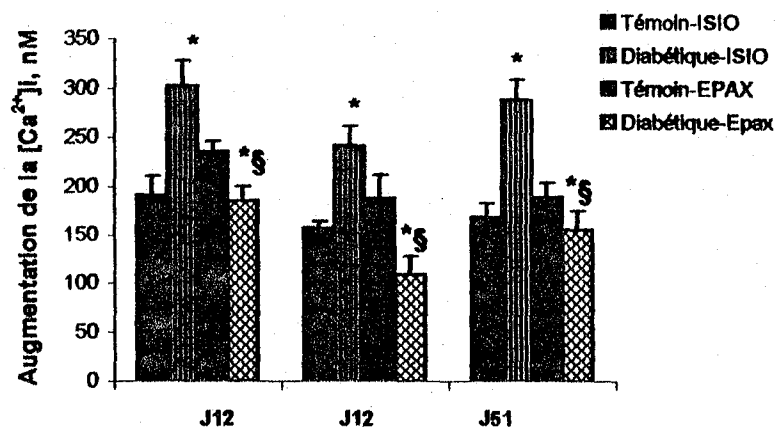
Les mêmes résultats sont retrouvés chez les mères un mois après la gestation (J51) (Fig 21).

A J30, les rats obèses de mères diabétiques ISIO présentent eux aussi une élévation significative de l'augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  par la Tg comparés à leurs témoins, alors qu'elle est diminuée significativement chez les rats obèses de mères diabétiques EPAX comparés aux témoins du même groupe (Fig 22).

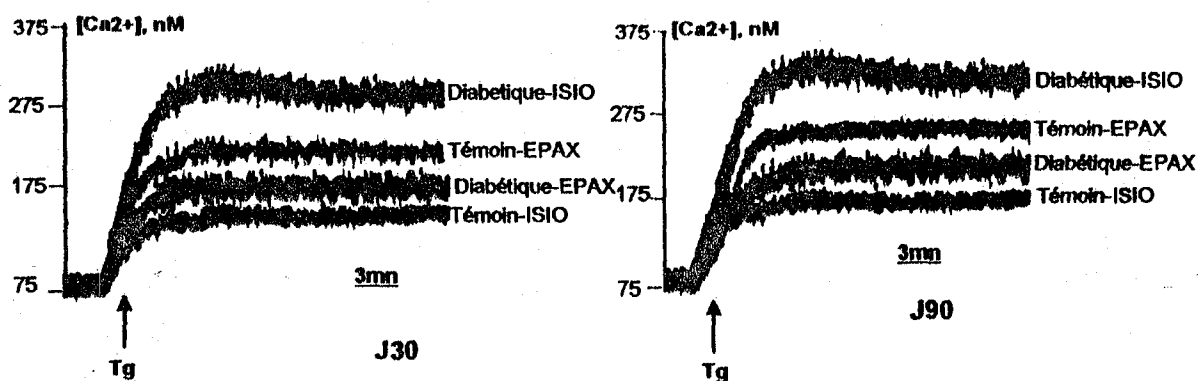
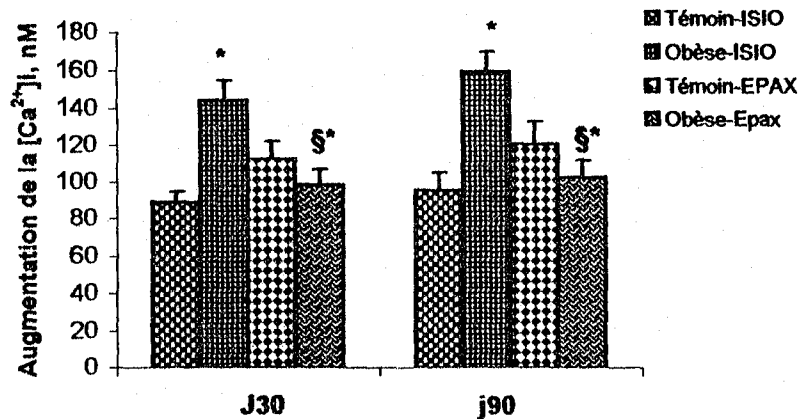
Le régime EPAX diminue également l'augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  par la Tg chez les rats obèses EPAX comparés aux rats obèses ISIO (Fig 22).

Le même profil calcique a été retrouvé chez les rats adultes à J90 (Fig 22).

Nous avons également entrepris les mêmes expériences dans un milieu à 0% calcium. Nous avons observé que l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  suite à l'action de la Tg est significativement supérieure dans les splénocytes des mères diabétiques ISIO gestantes à J12 et J21 et à un mois après la gestation (J51) comparés aux rates témoins sous le même régime, alors qu'une diminution significative est observée chez les mères diabétiques nourries par le régime EPAX comparées aux mères diabétiques consommant le régime ISIO (Tableau III et Fig 23).



**Fig21:** Effet du régime EPAX sur l'augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  dans les splénocytes des mères témoins et diabétiques à J12 et J21 de la gestation et à J51 (1 mois après la gestation) sous l'action de la thapsigargine (Tg) ( $1\mu M$ ) en présence de calcium extracellulaire  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES,  $n = 15$ , La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \* ( $P < 0.05$ ) Différence significative entre témoins et diabétiques pour chaque régime  
 § ( $P < 0.05$ ) Différence significative entre ISIO et EPAX



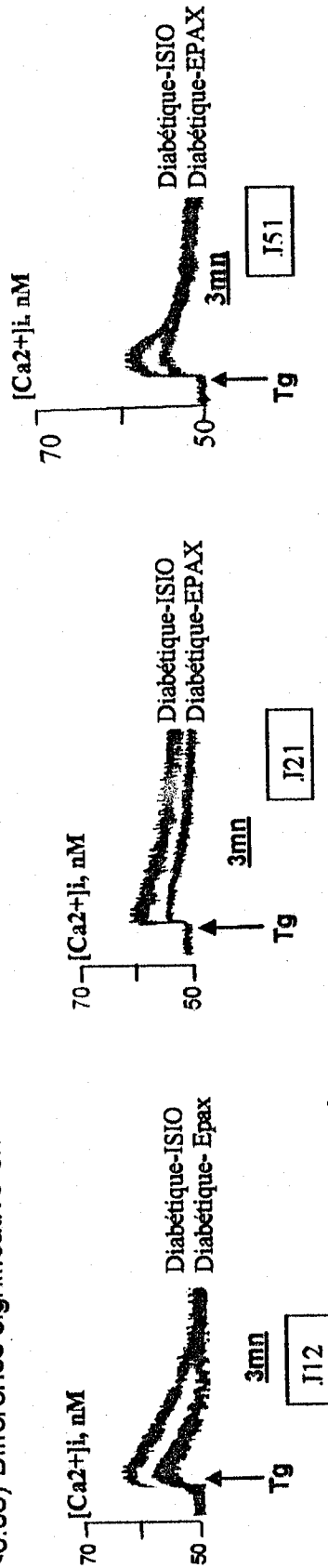
**Fig 22** : Effet du régime EPAX sur l'augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  dans les splénocytes des rats témoins et obèses à J30 et J90 sous l'action de la thapsigargine (Tg) ( $1\mu M$ ) en présence de calcium extra-cellulaire  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES,  $n = 15$ , La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \* ( $P < 0.05$ ) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime  
 § ( $P < 0.05$ ) Différence significative entre ISIO et EPAX

**Tableau III** : Effet du régime EPAX sur l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  dans les splénocytes-T des mères témoins et diabétiques à J12 et J21 de la gestation et à J51(1mois après la gestation) sous l'action de la Thapsigargine en absence de calcium extracellulaire.

Augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ (Thapsigargine)	Témoin -ISIO	Diabétique -ISIO	Témoin -EPAX	Diabétique-EPAX
J12	7.68 ± 1.22	12.20 ± 2.20 *	8.93 ± 0.58	7.93 = 1.25 §
J21	8.35 ± 2.12	16.85 ± 1.70 *	11.23 ± 0.94	10.72 ± 0.25 §
J51	8.90 ± 1.28	15.64 ± 1.87 *	8.42 ± 0.93	8.63 = 1.08 §

Chaque valeur représente la moyenne ± ES, n=15, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student

- \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques pour chaque régime
- § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX



**Fig 23** : Effet du régime EPAX sur la  $[Ca^{2+}]_i$  dans les splénocytes-T des mères et diabétiques à J12 et J21 de la gestation et à J51(1mois après la gestation) sous l'action de la Thapsigargine en absence de calcium extracellulaire.

Des résultats similaires sont retrouvés chez la progéniture obèse à J30 et J90 (Tableau IV et Fig 24).

### **VIII Effet du régime EPAX sur la composition en acide gras des phospholipides membranaires. (Fig 25 et Fig 26).**

#### **Effet du régime EPAX sur le pourcentage de C18 : 2n-6**

L'analyse de la composition en acides gras des phospholipides (PL) membranaires lymphocytaires montrent qu'il y'a une diminution significative ( $P < 0.05$ ) du C18 :2n-6 chez les mères diabétiques à J12 et J21 de la gestation et un mois après la gestation (J51) comparées aux rates témoins dans le groupe ISIO (Fig 25).

Le régime EPAX diminue significativement le pourcentage du C18 : 2n-6 chez les mères diabétiques à J12 de la gestation comparés aux rates témoins consommant le même régime, alors qu'aucune différence significative n'est notée chez les rates consommant le régime EPAX à J21 de la gestation et un mois après la gestation (J51) (Fig 24).

A J12 et J21 de la gestation et à un mois après la gestation (J51), le pourcentage de C18 :2n-6 augmente significativement chez les rates témoins consommant le régime EPAX comparées aux rates témoins sous régime ISIO (Fig 25).

Des résultats similaires sont retrouvés entre les rates diabétiques sous régime ISIO ou EPAX.

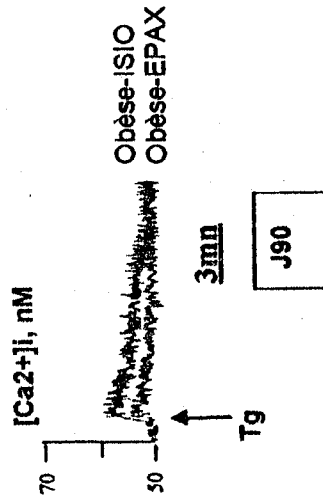
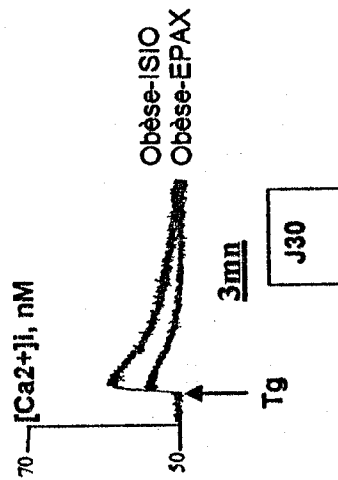
A J30 et J90, le pourcentage de C18 : 2n-6 diminue significativement chez les rats obèses de mères diabétiques sous régime ISIO comparées aux valeurs témoins, alors qu'on note une diminution significative chez les rats obèses de mères diabétiques sous régime EPAX comparés aux témoins consommant le même régime (Fig 26).

**Tableau IV** : Effet du régime EPAX sur l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  dans les splénocytes-T des rats témoins et obèses à J30 et J90 sous l'action de la Thapsigargine en absence de calcium extracellulaire.

Augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ (Thapsigargine)	Témoin -ISIO	Obèse -ISIO	Témoin -EPAX	Obèse-EPAX
J30	8.35 ± 0.64	14.01 ± 1.10 *	9.12 ± 0.88	8.11 ± 1.15 §
J90	7.80 ± 2.12	13.45 ± 1.45 *	9.23 ± 0.94	8.14 ± 1.25 §

Chaque valeur représente la moyenne ± ES, n=15, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student

- \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime
- § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX



**Fig 24** : Effet du régime EPAX sur la  $[Ca^{2+}]_i$  dans les splénocytes-T des rats obèses à J30 et J90 sous l'action de la Thapsigargine en absence de calcium extracellulaire.

Le régime EPAX augmente significativement la valeur de C18 : 2n-6 chez les rats témoins à J30 et J90 comparés aux rats témoins consommant le régime ISIO

A J30 et J90, les rats obèses de mères diabétiques sous régime EPAX montrent une augmentation significative du pourcentage du C18 : 2n-6 comparés aux rats obèses sous régime ISIO (Fig 26).

#### **Effet du régime EPAX sur le pourcentage de C20 : 4n-6 (Fig 27 et Fig 28).**

A J12 et J21 de la gestation et à un mois après la gestation (J51), le pourcentage de C20 : 4n-6 augmente significativement chez les mères ISIO diabétiques comparées à leurs témoins (Fig 27).

Par contre, les valeurs de C20 : 4n-6 diminuent significativement chez les rates témoins sous régime EPAX comparées aux rates témoins consommant le régime ISIO au 12<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jour de la gestation et à 1 mois après la gestation (J51).

Les mêmes variations sont trouvées chez les rates diabétiques EPAX par rapport au rates diabétiques ISIO (Fig 28).

A J 30 et J90, les rats obèses de mères diabétiques sous régime ISIO présentent une augmentation significative du pourcentage de C20 : 4n-6 avec leurs témoins.

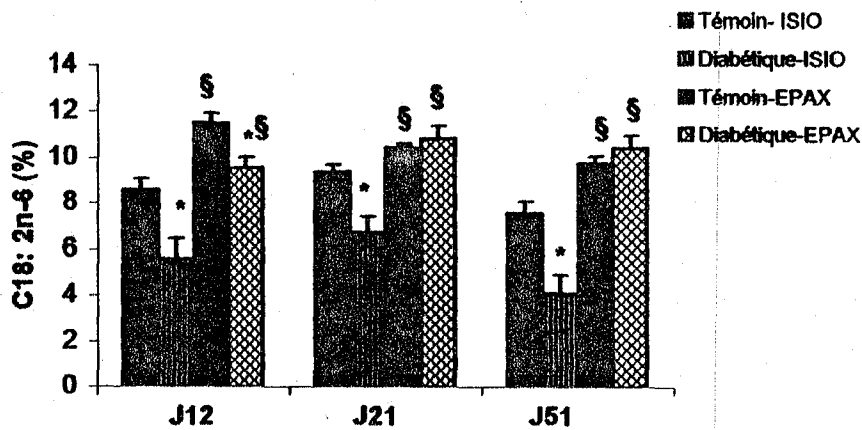
Aucune variation n'est retrouvée chez les rats obèses consommant le régime EPAX comparés aux témoins sous le même régime (Fig 28).

Le Régime EPAX diminue significativement le taux de C20 : 4n-6 chez les rats témoins à J30 et J90 comparés aux témoins sous régime ISIO.

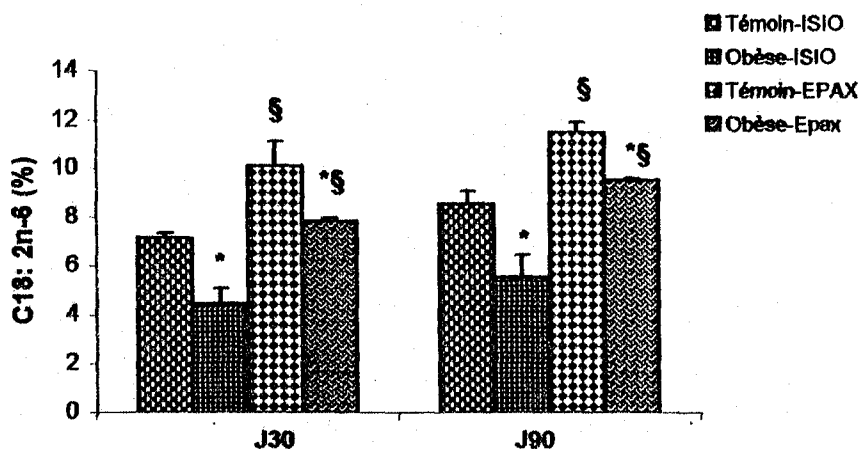
Les mêmes résultats sont retrouvés chez les groupes de rats obèses EPAX comparés aux rats ISIO obèses (Fig 28).

#### **Effet du régime EPAX sur le pourcentage de C20: 5n-3 et C22: 6n-3 (EPA, DHA) (Fig 28-31).**

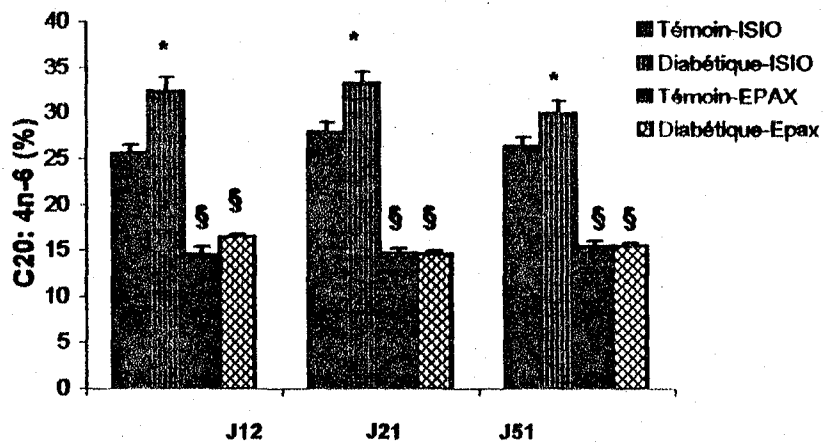




**Fig 25** : Effet du régime EPAX sur les pourcentages en C18: 2n-6 des phospholipide membranaires des splénocytes T chez les mères témoins et diabétiques à j12 et j21 de la gestation et à J51(1mois après la gestation)  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n =15, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX



**Fig 26** : Effet du régime EPAX sur les pourcentages en C18: 2n-6 des phospholipide membranaires des splénocytes T chez les rats témoins et obèses à J30 et J90,  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n =15, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

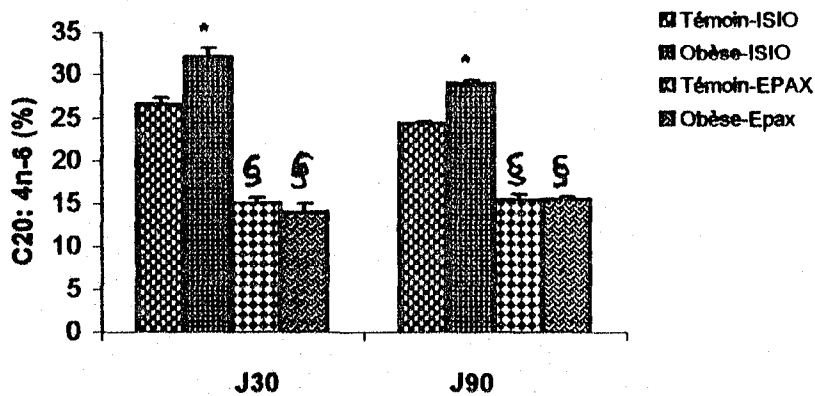


**Fig 27:** Effet du régime EPAX sur les pourcentages en C20: 4n-6 des phospholipides membranaires des splénocytes T chez les mères témoins et diabétiques à j12 et j21 de la gestation et à J51 (1 mois après la gestation)

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n = 15, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student

\* (P < 0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques pour chaque régime

§ (P < 0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX



**Fig 28:** Effet du régime EPAX sur les pourcentages en C20: 4n-6 des phospholipides membranaires des splénocytes T chez les rats témoins et obèses à J30 et J90

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n = 15, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student

\* (P < 0.05) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime

§ (P < 0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

A J12 et J21 de la gestation, et à 1 mois après la gestation, les pourcentages de l'EPA et de DHA ne montrent aucune variation chez les rates diabétiques sous régime ISIO comparés aux témoins nourris par même régime. Des résultats semblables sont retrouvés chez rates diabétiques nourries par le régime EPAX comparées aux rates témoins sous le même régime (Fig 29, 31).

Le régime EPAX augmente significativement le taux d'EPA et de DHA dans les splénocytes T des rates témoins par rapport aux mères témoins nourries par le régime ISIO au 12<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jour de la gestation et à 1 mois après la gestation (J51).

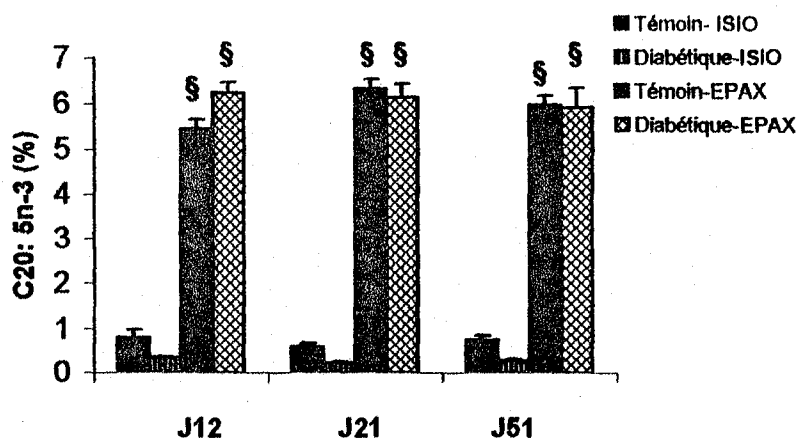
Les mêmes variations sont observées chez les rates diabétiques EPAX comparées aux rates diabétiques ISIO (Fig 29, 31).

A J30 et J90, les pourcentages d' EPA ne montrent aucune différence significative chez les rats obèses sous régime ISIO comparés à leurs témoins, contrairement aux taux de DHA qui sont significativement augmentés chez le même groupe de rats comparés aux témoins du même groupe (Fig 30, 32).

Cependant, on ne note aucune variation du pourcentage d'EPA et de DHA chez les rats obèses consommant le régime EPAX comparés aux témoins nourris par le même régime.

A J30 et J90, le régime EPAX augmente significativement le taux d'EPA et de DHA dans les splénocytes T des rats témoins par rapport au groupe témoin nourri par le régime ISIO.

Les mêmes variations sont observées chez les rats obèses sous régime EPAX comparés aux rats obèses sous régime ISIO (Fig 30, 32).

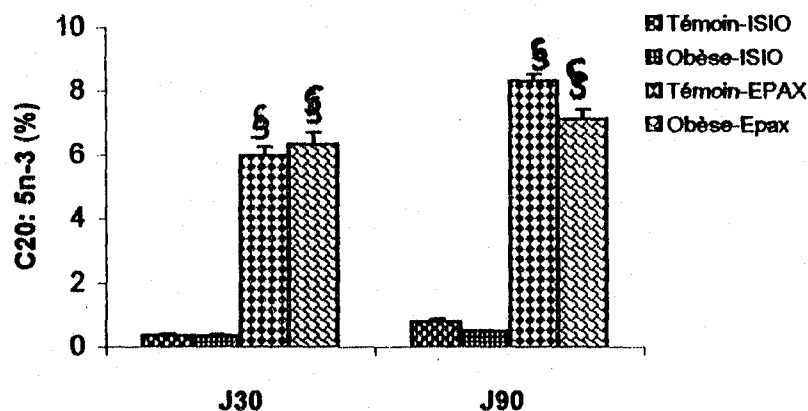


**Fig 29** : Effet du régime EPAX sur les pourcentages en C20: 5n-3 des phospholipide membranaires des splénocytes T chez les mères témoins et diabétiques à j12 et j21 de la gestation et à J51 (1 mois après la gestation)

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n =15, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student

\* (P<0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques pour chaque régime

§ (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

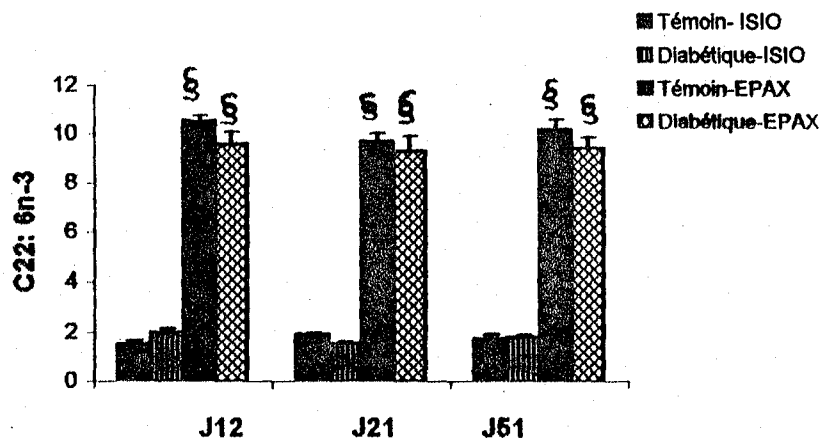


**Fig 30** : Effet du régime EPAX sur les pourcentages en C20: 5n-3 des phospholipide membranaires des splénocytes T chez les rats témoins et obèses à J30 et J90

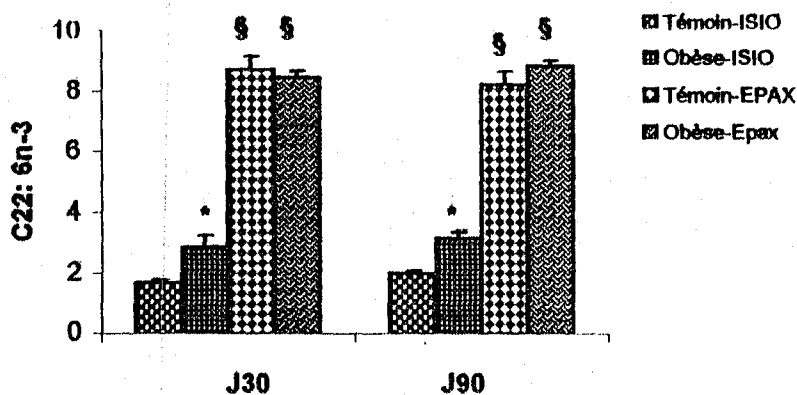
Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n =15, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student

\* (P<0.05) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime

§ (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX



**Fig 31** : Effet du régime EPAX sur les pourcentages en C22: 6n-3 des phospholipide membranaires des splénocytes T chez les mères témoins et diabétiques à j12 et j21 de la gestation et à J51 (1 mois après la gestation)  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n =15, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX



**Fig 32** : Effet du régime EPAX sur les pourcentages en C22: 6n-3 des phospholipide membranaires des splénocytes T chez les rats témoins et obèses à J30 et J90  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n =15, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

## Discussion

Au cours de la gestation, le diabète maternel est un facteur de risque très important de la suralimentation in utero associé à un hyperinsulinisme responsable d'un excès de croissance appelé macrosomie ou obésité fœtale (Jones, 2001 ; Schwartz, 2000). L'obésité fœtale constitue un syndrome de troubles nutritionnels et hormonaux du développement fœtal. De plus, des études ont mis en évidence ces dernières années les conséquences à long terme des perturbations du développement fœtal. La macrosomie fœtale constitue un des facteurs de risques de l'apparition de nombreuses maladies métaboliques à l'âge adulte, notamment l'obésité, le diabète, l'hypertension et les maladies cardiovasculaires (Dorner & Plagemann, 1994 ; Barker, 1995 ; Stanner et al., 1997).

Ainsi, l'hyperinsulinisme Fœtal est associé au développement de l'intolérance au glucose, l'obésité et le diabète au cours de l'enfance et à l'âge adulte (Dorner et al., 1994 ; Pribylova, 1996 ; Plagemann et al., 1997). Chez l'adulte, ces maladies sont caractérisées par des altérations du métabolisme des lipides et des lipoprotéines. De plus, la suralimentation à l'âge adulte entraîne des perturbations lipidiques. Ces données justifient donc l'intérêt que nous portons à ce type d'agression pendant la vie fœtale sachant l'importance du métabolisme des lipides au cours des périodes anté- et néonatale.

La première partie de notre travail permet de connaître les effets à long terme de l'obésité fœtale chez les rats nés de rates rendues diabétiques par la STZ.

Les résultats obtenus, comparés à ceux de l'enfant obèse né de mère diabétique insulino-dépendante permettent de mieux suivre l'évolution des modifications du métabolisme des lipides entraînés par la macrosomie.

Comme l'effet toxique de la streptozotocine est dose dépendant, nous avons choisi une dose de 40mg/kg de poids corporel au 5<sup>ème</sup> Jour de gestation provoquant ainsi une hyperglycémie moyenne (comprise entre 1.5 et 2.5 g/l). L'hyperglycémie de la mère entraîne chez le fœtus une hyperglycémie et un hyperinsulinisme, causes majeures de la macrosomie (Pedersen et Oster, 1961; Hill, 1978 ; Stevenson et al., 1982 ; Berket et al., 1989). Cette macrosomie est le reflet d'une croissance postnatale accélérée, et d'une augmentation de l'adiposité, de masse musculaire et d'une organomégalie généralisée (Hill, 1978 ; Cowett et Shwartz, 1982).

D'autres part dans notre étude, nous nous sommes aussi intéressés à l'importance des AGPI n-3 alimentaires dans l'évolution et la prévention du diabète chez les rates gestantes diabétiques et leurs progénitures obèses ou macrosomiques. Plusieurs études ont montré que les AGPI de la série n-3 exercent des effets anti-inflammatoires, vasodilatateurs, anti hypertensifs et sont considérés comme des immunosuppresseurs en plus de leurs actions hypolipémiante et hypoglycémiant (Lichtenstein, 1998; Harris, 1989). D'autres études ont démontré qu'une supplémentation de l'alimentation par de l'huile de poisson contenant les AGPI n-3 exerçait un effet bénéfique dans la progression des maladies cardio vasculaires y compris le diabète et l'obésité.

Nous avons évalué dans un premier temps l'effet des AGPI n-3 (EPA et DHA) sur l'évolution postnatale du poids corporel, les bilans nutritionnels, les teneurs en glucose et en insuline, les teneurs en lipides du foie et du tissu adipeux chez les nouveaux nés obèses de mères diabétiques et sur l'évolution des teneurs sériques en cholestérol total, phospholipides et triglycérides chez les mères au cours de la gestation et un mois après, et chez leurs progénitures jusqu'à l'âge adulte.

Dans notre étude, on remarque que le régime EPAX diminue l'hyperglycémie chez les rates gestantes diabétiques, ce qui va entraîner une réduction de la prévalence de la macrosomie chez les nouveaux nés de mères diabétiques. Dans cette première partie du travail, la discussion sur le métabolisme des lipides est faite chez les mères diabétiques à J12 et J21 de la gestation et un mois après la gestation. En accord avec plusieurs études (Jones et al., 2001; Schwartz et al., 2000 ; Knopp et al., 1986 ; Shafrir et al., 1982 ; Oh et al., 1988 ; Gelardi et al., 1990 ; Merzouk et al., 2003), nous avons observé que le diabète induit des altérations du métabolisme des lipides chez les rates gestantes et leurs progénitures. Durant la gestation et 1 mois après la gestation, les rates diabétiques sous régime ISIO présentent une augmentation des teneurs sériques en TG et CT. Ces résultats sont corrélés à l'augmentation de synthèse et de sécrétion des lipoprotéines observée durant le diabète gestationnel (Knopp et al., 1986 ; Shafrir et al., 1982). Chez ces femelles diabétiques, des concentrations plus élevées en oestrogènes peuvent expliquer l'augmentation des TG sériques et hépatiques, puisque les oestrogènes stimulent leur synthèse hépatique (Weinstein et al., 1979, Schaeffer et al., 1983 ). En effet, l'augmentation des TG sériques s'accompagne de l'augmentation des VLDL. Elle dépend d'une surproduction hépatique des VLDL et parfois d'un déficit de leur catabolisme. Cette hypertriglycéridémie est dépendante de l'hyperglycémie, c'est-à-dire que le glucose en excès dans le sang est transformé en acides gras et triglycérides. De plus, l'activation directe de la synthèse hépatique des VLDL s'associe souvent à un déficit de l'activité de la lipoprotéine-lipase (LPL) chargée de détacher directement les acides gras des chylomicrons circulants et de les faire entrer à travers la paroi vasculaire vers les adipocytes et les cellules hépatiques.



L'augmentation du taux de CT sériques chez les mères gestantes diabétiques du groupe ISIO est liée à un taux élevé de LDL. En effet, il existe une anomalie structurale des récepteurs des LDL chez les sujets diabétiques (qui reconnaît et fixe l'apo B<sub>100</sub>) comme l'ont démontré Brown et Goldstein (2004). Selon la place de mutation dans le gène du récepteur (Chromosome 19), ce dernier est totalement ou partiellement incapable d'assurer la captation cellulaire des LDL. Normalement le cholestérol qui entre dans la cellule par cette voie, est libéré dans le lysosome et sert d'inhibiteur du premier stade de la voie de biosynthèse du cholestérol. Si son entrée est rendue impossible, la synthèse endogène du cholestérol fonctionne sans limitation et ce cholestérol sort de la cellule pour aller accroître la cholestérolémie, déjà rendue anormalement élevée par la stagnation des LDL chez les sujets diabétiques (Brown & Goldstein, 2004).

Vileisis & OH (1983) et Shafrir et al. (1982 et 1987) notent que les teneurs sériques en TG et en AGL sont augmentées chez la rate gestante diabétique. Ceci entraîne une augmentation du transfert transplacentaire des acides gras vers le fœtus. D'autre part, les activités de la LPL et de la lipase intracellulaire placentaire sont élevées chez la rate diabétique, ce qui augmente l'hydrolyse des TG maternels et la captation des AG par le placenta, et par la suite leur libération dans la circulation fœtale (Shafrir & Barash, 1987). Ces acides gras sont alors captés par le foie ou ils contribuent à la synthèse des TG. En effet, chez la rate gestante diabétique, les teneurs sériques en TG et en AGL maternels sont corrélées positivement avec les teneurs fœtales en triglycérides (Goldstein et al., 1985).

Dans notre étude, les nouveaux nés de rates rendues diabétiques par la STZ et nourris par le régime ISIO et EPAX présentent un poids significativement plus élevé que celui des nouveaux nés de rates témoins nourries par le régime ISIO et EPAX.

De plus, ces rats obèses sont hyper glycémiques et hyper insulinémiques à la naissance. Nos résultats confirment ceux de Mezrouk et al. (2001, 2003) montrant que la STZ injectée à la mère au 5<sup>ème</sup> jour de la gestation à la dose utilisée n'a pas d'effet destructeur sur le pancréas foetal. Ainsi l'hyperglycémie maternelle conduit à une hyperglycémie foetale qui va stimuler les cellules pancréatiques, entraînant une hyper insulinémie foetale (Oh et al., 1988).

Cet hyperinsulinisme intra-utérin induit l'augmentation de l'adiposité (Vileisis et al., 1983). L'insuline, principale hormone anabolisante lors du développement foetal, stimule la croissance, celle-ci est corrélée avec une augmentation de la synthèse protéique, du glycogène et de la graisse chez le foetus (Susa et Schawtz, 1985).

Après la naissance, ces rats obèses sous régime ISIO et EPAX maintiennent une croissance plus importante jusqu'à la fin de l'expérience, lorsque les rats sont âgés de 3 mois. Ces résultats en accord avec ceux d'autres auteurs (Mezrouk et al., 2001; 2003) qui montrent que le poids élevé des rats obèses à la naissance reste plus important celui des rats témoins, jusqu'à l'âge adulte. L'excès pondéral est dû en particulier à une augmentation de la masse grasse, puisque le poids relatif du tissu adipeux est significativement plus élevé chez les obèses par rapport aux témoins. Après la naissance, les rats obèses sous régime ISIO et EPAX restent hyper insulinémiques et hyper glycémiques. D'après certains auteurs, les rats obèses sont caractérisés par une période de grande sensibilité à l'insuline allant de la naissance jusqu'à 2 mois de vie post- natale (Oh et al., 1988 ; Gelardi et al., 1990 ; 1991 ; Merzouk et al., 2001). L'augmentation de la sensibilité tissulaire à l'insuline est secondaire au conditionnement de la cellule B pancréatique in utero et la persistance d'un nombre élevé de récepteur à l'insuline et de l'augmentation de la fixation de l'insuline aux cellules cibles. Ceci peut expliquer le développement postnatal de

l'obésité chez les nouveaux nés Après l'âge de 2 mois, c'est-à-dire après l'installation de l'obésité, les rats obèses deviennent insulino-résistants.

En Effet, plusieurs auteurs ont mis en évidence un hyperinsulinisme, associé à une résistance périphérique à l'insuline chez les rats obèses âgés de 12 semaines (Oh et al., 1988; Gelardi et al., 1990 et 1991 ). De nombreux travaux, réalisés chez l'homme, rapportent que l'obésité définie par un excès de masse grasse, s'accompagne très souvent d'une insulino résistance et de son corollaire, l'hyperinsulinisme (Reaven, 1988 ; Bjorntorp, 1991).

Chez l'homme, l'installation progressive de l'obésité est aussi associée à un état d'hypersensibilité à l'insuline, et le maintien de l'obésité entraîne une résistance à cette hormone (Delprato et al., 1990 ; Frayn & Coppack, 1992). De plus, l'hyperinsulinisme s'accroît avec l'accroissement de l'obésité (Delprato et al., 1990).

Dans plusieurs modèles d'obésité (rat Zucker fa/fa, souris ob/ob), la résistance à l'insuline est retrouvée et elle est une conséquence du développement de l'obésité (Dubuc, 1976 ; Sclafani, 1984 ; Connelly & Taberner, 1989).

Les mécanismes impliqués dans l'insulino-résistance chez l'obèse sont complexes.

L'accumulation progressive des triglycérides dans le tissu adipeux aboutit à une saturation lipidique des adipocytes qui deviennent moins sensibles à l'action principale de l'insuline, à savoir l'entrée du glucose et sa conversion en lipides (Olefsky, 1977 ; Kissebah et al., 1989). De plus, ces adipocytes montrent non seulement une diminution du nombre et de l'affinité des récepteurs à l'insuline, mais aussi une réduction des activités enzymatiques impliquées dans la conversion du glucose en AG et en TG (Kissebah et al., 1989 ). Une réduction de l'activité de l'enzyme acyl CoA carboxylase et une inhibition de la voie des pentoses phosphates

sont aussi observées, ce qui diminue la synthèse des AG dans les adipocytes déjà très riche en lipides (Richardson & Czech, 1978 ). Ces mêmes mécanismes de rétrocontrôle de la lipogenèse adipocytaire ont été mis en évidence par Gelardi et al. (1990) chez les rats obèses, ils apparaissent à l'âge de 10 semaines.

De la naissance à l'âge adulte (J0 – J90), chez les rats obèses sous régime ISIO et EPAX, le poids relatif du foie est similaire à celui des témoins, alors que celui du tissu adipeux est significativement augmenté. Ceci souligne le caractère précoce de l'installation de l'obésité chez les rats nourris par le régime ISIO et EPAX comparé à leurs témoins respectifs.

De même, les rats obèses sous régime EPAX présente une diminution du poids corporel, du poids du tissu adipeux et une réduction des teneurs en lipides du foie et du tissu adipeux, ainsi qu'une diminution de l'hyperglycémie et de l'hyperinsulinémie comparés aux rats obèses nourris par le régime ISIO. Ces résultats indiquent l'effet bénéfique du régime EPAX. De nombreuses études ont démontré qu'un régime enrichi en AGPI n-3 induit une variation de la balance énergétique et du poids corporel entraînant une réduction de l'obésité (Storlien et al., 1987; Cunnane et al., 1986). Cunnane et al. (1986) ont montré chez la souris ob/ob qu'un régime à base d'huile de poisson entraîne une réduction de gain de poids comparé à un régime enrichi en AGPI n-6.

D'autres études effectuées chez le rat ont montré que l'huile de poisson a un effet bénéfique sur l'insulino résistance, entraînant une prévention totale du développement de la résistance à l'insuline induite par les régime riches en AGS (Storlien et al., 1987; Cunnane et al., 1986., Storlien et al., 1991). De plus, les AGPI réduisent l'utilisation du glucose périphérique chez les rats (Storlien et al., 1991).

La constitution de l'obésité dépend de l'apport nutritionnel et du bilan énergétique.

La constitution d'une obésité nécessite un excès d'apport d'énergie par rapport aux besoins. C'est la raison pour laquelle nous avons déterminé les bilans nutritionnels chez les rats obèses.

Après le sevrage, la prise alimentaire et par conséquent l'azote ingéré, ainsi que l'apport énergétique chez les rats obèses nourris par le régime ISIO et EPAX sont similaires à leurs témoins respectifs. Ces résultats sont en accord avec ceux de Oh et al. (1991) qui notent que la prise alimentaire des rats obèses ne diffère pas de celles des témoins. Ainsi la persistance de l'obésité chez les rats obèses ne semble pas être liée à une suralimentation.

Au bilan BI (du 30<sup>ème</sup> au 37<sup>ème</sup> jour), qui correspond à la première semaine après le sevrage, quand les animaux sont âgés de 5 semaines, non seulement la prise alimentaire, mais aussi les pertes azotées et lipidiques sont similaires dans les 2 groupes de rats (obèses et témoins) pour les deux régime ISIO et EPAX. Cependant, les rats obèses sont moins actifs que les témoins (notre propre constatation in vivo), ce qui contribue à la diminution de leurs dépenses énergétiques.

Aux bilans BII (53<sup>ème</sup> au 60<sup>ème</sup> j), BIII (60<sup>ème</sup> au 67<sup>ème</sup> j) et BIV (83<sup>ème</sup> au 90<sup>ème</sup> j), malgré une consommation alimentaire (g/j/rat) similaire à celles des témoins, les rats obèses du groupe ISIO montrent des pertes azotées et lipidiques plus faibles, ce qui entraîne un BA et un CUD des lipides plus élevés. En effet, au cours des bilans BII, BIII, et BIV, l'excrétion de l'azote urinaire est plus faible chez les rats obèses du groupe ISIO comparés aux témoins. Chez ces obèses, la diminution des pertes urinaires d'azote peut être produite par une augmentation de l'efficacité de synthèse et / ou une diminution de la dégradation des protéines.

Aux bilans BII, BIII et BIV, la diminution du rapport azote urinaire/azote ingéré indique une meilleure rétention azotée chez les obèses nourris par le régime ISIO, ce qui est en faveur d'une augmentation des synthèses protéiques. Ceci est confirmé par l'augmentation des teneurs en protéines des différents tissus (Merzouk et al., 2000). La diminution de l'azote urinaire chez les rats obèses du groupe ISIO est due essentiellement à une réduction de l'azote uréique. Dans l'azote urinaire, l'azote uréique représente la fraction la plus importante. La diminution de l'azote uréique chez les rats obèses résulte probablement de la réduction de la quantité de substrat ( $\text{NH}_3$ ), issu de la désamination oxydative des acides aminés, ce qui est le signe de leur meilleure utilisation pour les synthèses protéiques.

Les rats obèses du groupe EPAX montrent des pertes azotées plus importantes comparés aux rats obèses du groupe ISIO, ce qui entraîne un bilan azoté (BA), et un coefficient d'utilisation digestive (CUD) de l'azote similaires aux rats témoins du groupe ISIO et EPAX. Aux cours des trois derniers bilans l'excrétion de l'azote urinaire est plus élevée chez les rats obèses nourris par le régime EPAX comparés aux rats obèses nourris par le régime ISIO, alors qu'elle est similaire à celle des témoins ISIO et EPAX. Ainsi le régime EPAX enrichi en AGPI n-3 a tendance à régulariser l'efficacité de synthèse et la dégradation des protéines chez les rats obèses.

Aux différents bilans nutritionnels, l'azote fécal ne varie pas significativement entre les obèses et les témoins pour les deux régime ISIO et EPAX. Cette fraction azotée correspond à l'azote alimentaire non absorbé, mais aussi et surtout à l'azote endogène. Le coefficient d'utilisation digestive de l'azote ( $\text{CUD}_N$ ) chez les rats obèses est similaire à celui des rats témoins, quelque soit le bilan nutritionnel et le

régime alimentaire. Ceci montre que les fractions d'azote non absorbé et d'azote endogène restent proportionnelles à l'azote ingéré chez les 4 lots de rats.

Les rats obèses du groupe ISIO ont toujours des valeurs plus importantes de BA, ce qui confirme leur meilleure utilisation métabolique de l'azote et leur meilleure capacité de rétention azotée. Cependant le régime EPAX enrichi en AGPI n-3 a tendance à normaliser le BA chez les rats obèses.

Au bilan BI, quelque soit le régime, la digestion des lipides n'est pas perturbée chez les rats obèses puisque le coefficient d'utilisation digestive apparente des lipides ( $CUD_L$ ) est similaire dans tous les lots de rats. Cependant, lors des bilans BII, BIII et BIV, les lipides fécaux sont plus faibles chez les rats obèses nourris par le régime ISIO et EPAX, ce qui augmente les valeurs des  $CUD_L$ . Chez les rats obèses, l'absorption intestinale des lipides est donc majorée. Une meilleure efficacité nutritionnelle (REN) est obtenue alors chez les rats obèses du groupe ISIO et EPAX, ce qui favorise leur plus forte croissance pondérale.

Ces différents résultats, reliés à l'augmentation du poids corporel et de la masse adipeuse chez les rats obèses, montrent que les deux régimes ISIO et EPAX sont mieux assimilés et que leur mise en réserve est augmentée, en dépit d'une consommation alimentaire non majorée.

Nos résultats montrent que l'obésité entraîne aussi de nombreuses modifications métaboliques qui varient selon l'âge et le régime alimentaire consommé.

Dans cette partie du travail, la discussion sur le métabolisme des lipides est faite chez les rats obèses à différentes périodes (J0, J30 et J90), car les effets de la macrosomie aux différents âges ne sont pas semblables. De plus ces modifications métaboliques en fonction du temps pour les deux types de régime ISIO et EPAX sont le fondement de cette partie de notre travail expérimental.

A la naissance, les rats obèses du groupe ISIO présentent une augmentation des TG, ces résultats sont en faveur d'une augmentation de la synthèse et de la sécrétion des TG par le foie. De plus ces nouveaux nés obèses ont des teneurs élevés en LDL, HDL, et VLDL (Merzouk et al., 2001).

Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus chez les nouveaux-nés obèses humains (Merzouk et al ; 1999 ; 2000)

L'hyperinsulinisme foetal et l'abondance de substrats provenant de la mère diabétique sont à l'origine d'une augmentation de la synthèse des apo proteines et d'une lipogenèse exagérée dans le foie foetal (Vileisis & Oh, 1983).

L'augmentation de transfert placentaire du glucose et des AGL de la rate diabétique vers le foetus, ainsi que l'hyperinsulinisme foetal peuvent être à l'origine de la stimulation de la production hépatique des TG. Chez les nouveaux nés obèses hyper glycémiques, le glucose capté par le foie en grande quantité, est soit stocké sous forme de glycogène hépatique, soit dégradé par la voie de la glycolyse et la voie des pentoses. La dihydroxyacétone phosphate et le pyruvate, produits de la glycolyse, constituent des substrats pour la synthèse des AG et des lipides. La formation du NADPH par la voie des pentoses est aussi essentielle pour cette synthèse.

Plusieurs auteurs montrent que l'activité des enzymes hépatiques de la glycolyse et de la lipogenèse est élevée chez le foetus hyper insulinémique de rates diabétiques. (Merzouk et al ; 2000 ; 2002). Chez le rat nouveau-né de mère ISIO diabétique, les teneurs sériques en CT sont significativement élevées par rapport à leurs témoins. En effet chez les nouveaux nés, les récepteurs hépatiques des LDL sont fonctionnels et jouent un rôle important dans la régulation de la concentration sérique en cholestérol (Durer et al., 1987). La synthèse du cholestérol hépatique peut être



élevée chez le foetus obèse, en raison d'un excès d'acétyl-CoA provenant du glucose et des acides gras. Ceci peut entraîner une diminution de la synthèse des récepteurs hépatiques des LDL avec une réduction de la captation des LDL sériques, phénomène de rétrocontrôle destiné à protéger le foie d'une surcharge éventuelle en cholestérol.

Chez le foetus, les HDL représentent la fraction majeure des lipoprotéines, elles jouent un rôle important dans le transport du cholestérol aux différents tissus, aussi bien chez l'homme (Rossenen et al., 1983) que chez le rat (Argiles & Herrera., 1991 ; Garcia-Molina et al., 1996). L'augmentation du cholestérol peut être liée à celle des HDL chez le nouveau né obèse, ce qui reflète certainement des besoins majorés en cholestérol pour assurer la croissance de ses différents tissus, sachant que la majorité des tissus sont hypertrophiés chez le foetus hyperinsulinémique obèse (Hill., 1978).

A J 30 et J 90, les anomalies présentes à la naissance persistent et s'aggravent. L'augmentation des teneurs sériques en TG et CT chez les rats obèse du groupe ISIO peut être due à une augmentation de leur synthèse hépatique. L'association de l'hyperinsulinisme et l'hypertriglycémie a été bien établie chez l'homme et chez le rat. L'hyperinsulinisme chez les sujets obèses ou diabétiques non insulino-dépendants est à chaque fois lié à une surproduction hépatique des VLDL (Tomkin & Owens, 1994 ; Taskinen, 1997). Steiner et al. (1984) montrent que le taux de sécrétion des TG par le foie est élevé chez les rats rendus hyperinsuliniques par injection sous-cutané d'insuline. Chez le rat obèse Zucker (fa/fa), l'hyperinsulinisme est aussi associé à une surproduction hépatique des TG et des VLDL (Schonfeld et al., 1974; Boulange et al., 1981). A J90, les rats obèses répondent à l'augmentation de la lipogenèse hépatique par une augmentation de la production des triglycérides

et par la suite des VLDL. Cependant, ce processus n'est pas suffisant pour prévenir l'accumulation des lipides hépatiques (stéatose hépatique) chez les rats obèses. De plus, l'augmentation de l'activité de l'enzyme triglycéride lipase hépatique (HTGL) peut permettre de majorer la captation des AG par les hépatocytes, après hydrolyse des PL et des TG des lipoprotéines, contribuant aussi à l'élévation des lipides hépatiques chez les obèses adultes.

A J90, les rats obèses ISIO ont des concentrations élevées en CT. Il a été démontré que cette augmentation est le reflet de l'augmentation des HDL, dont la composition est modifiée (Merzouk et al., 2000). Les travaux de COHN et al. (1987) sur les rats génétiquement obèses (SHR-N) montrent que les HDL circulantes sont élevées avec une augmentation de leur contenu en apos, en cholestérol, en TG et en PL. Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus dans notre travail chez les rats obèses adultes consommant le régime ISIO.

Après avoir observé que le régime EPAX enrichi en EPA et DHA diminue la prévalence de l'obésité, nous avons constaté qu'il induit aussi la régulation des anomalies lipidiques observées chez les mères gestantes diabétiques et leurs progénitures obèses. En effet, le régime EPAX induit une diminution significative des teneurs sériques en TG chez les mères gestantes diabétiques au cours et après la gestation ainsi que chez les nouveaux nés obèses de la naissance jusqu'à l'âge adulte. Cette réduction des TG sériques est la conséquence de la réduction des TG hépatiques. Les études effectuées chez l'homme ainsi que chez des modèles expérimentaux ont aussi démontré que la diminution du taux de triglycérides plasmatiques est la conséquence de la diminution de synthèse des TG hépatiques (Lichtenstein et al., 1988; Harris, 1989; Nassar et al., 1986; Sanders et al., 1985; Wong et al., 1985).

Dans notre étude, nous avons aussi observé que le régime EPAX riche en EPA et DHA a un effet hypocholestérolémiant chez les mères diabétiques à J12 de la gestation, ainsi que chez les nouveaux nés obèses à différentes périodes de la vie. L'effet hypocholestérolémiant des AGPI n-3 est accompagné par une diminution du cholestérol hépatique suggérant une diminution de synthèse du cholestérol ou une augmentation de son excrétion dans la bile. En effet, il a été démontré que l'huile de poisson induit des variations du métabolisme de cholestérol dans le foie des rats conduisant à une augmentation de son excrétion biliaire (Smit et al., 1991).

Les études épidémiologiques ont démontré la diminution de l'incidence des pathologies inflammatoires chez les Japonais et les esquimaux de Groenland. Ceci est attribué à une grande consommation de poissons de mer froide riches en AGPI n-3 (Jolly et al., 1997; Miles et Calder., 1998; Roberts et al., 1998; Wesly et al., 1998). En outre, il a été démontré que les AGPI n-3 exercent des effets curatifs dans certaines maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde et la sclérose en plaque (Bittiner et al., 1988; Kremer et al., 1987) car ces pathologies sont caractérisées par la présence des cellules T activées et des cytokines dans la circulation (Merrill et al., 1984; Wolf et al., 1988), et dans les tissus endommagés (Kontinnen et al., 1987; Barker et al., 1991). Les effets des AGPI n-3 sur les fonctions des lymphocytes après stimulation mitogénique ont été conséquents chez les humains et les animaux, démontrant une suppression lymphocytaire (Calder, 1995; 1999).

Un régime à base d'huile riche en AGPI n-3 induit une diminution de production d'interleukine (IL), IL-1, IL-6 et de TNF $\alpha$  par les macrophage péritonéaux murins (Yaqoob et calder, 1993). Plusieurs auteurs ont étudié le statut immunologique chez les mères gestantes diabétiques et l'impact du diabète sur le système immunitaire de

lymphocytes au repos et non activés. Dans ce cas, les lymphocytes déjà activés chez les diabétiques répondent peu à l'effet de la Con A et leur prolifération in vitro est faible comparée à celle des lymphocytes des sujets témoins. En effet, plusieurs auteurs notent un pourcentage élevé de lymphocytes-T activés chez les diabétiques (Hoffman et al., 2001 ; Peterson et al., 1999). Ainsi, nous pouvons présumer que la prolifération des cellules T altérée in vitro est due au fait que dans ces pathologies, les cellules des rates diabétiques gestantes et de leurs nouveaux nés sont déjà activés in vivo. Des résultats contradictoires sont notés par certaines études qui ont démontré que la réponse des lymphocytes T aux mitogènes, ainsi que la sécrétion des cytokines sont élevées chez les enfants obèses de mères diabétiques (El Mohandes et al., 1982) comparés à leurs témoins. Cependant, notre hypothèse peut être soutenue par les observations de plusieurs auteurs qui ont démontré une augmentation significative dans le pourcentage des lymphocytes activés in vivo chez les rats diabétiques (Peterson et al., 2002 ; Stentz et al., 2000) et chez les hommes diabétiques (Bansal et al., 1993). De même, la présence de lymphocytes activés a été trouvée chez les nouveaux nés de mères gestantes atteinte de diabète de type I et de type II (Di Mario et al., 1987). De plus, les nouveaux nés de mères diabétiques notent une réduction significative des cellules NK indiquant ainsi un déficit de l'immunité naturelle à la naissance (Lapolla et al., 1997 ; Lapolla et al., 1999).

La plupart des études ont indiqué que la prolifération des cellules T était initiée exclusivement par la production des IL-2 et par conséquent l'expression de son récepteur membranaire IL-2R (Canterell et al., 1984 ; Smith., 1988). Un déficit dans l'expression de leur récepteur peut aboutir à une réponse proliférative basse.

Nos résultats montrent que le taux circulant d' IL-2 est élevé chez les rates gestantes diabétiques à J12 et J 21 de la gestation ainsi que chez leurs nouveaux nés obèses.

D'autres études ont trouvé les mêmes résultats chez les diabétiques (Mc Carty, 1999). L'hyperglycémie du diabète est un facteur favorisant la synthèse d'interleukine IL-2 et IL-6 par l'endothélium (McCarty, 1999). Ces interleukines stimulent la croissance et la différenciation des lymphocytes, et augmentent la synthèse hépatique du fibrinogène, constituant ainsi des facteurs de risque de complications vasculaires au cours du diabète et l'obésité. L'augmentation des LDL sériques favorise la prolifération des cellules musculaires lisses et des fibroblastes, l'activation des plaquettes, des lymphocytes et des macrophages au niveau vasculaire (Colwell, 1993). L'augmentation des fibroblastes entraîne une libération plus importante d'interférons qui stimulent la synthèse des cytokines et la prolifération des lymphocytes. D'autres part, les interférons amplifient le processus d'auto-immunité du diabète de type I (Weigent et Blalock, 1989). L'activation des plaquettes induit la libération de facteurs de croissance comme le PDGF (platelet derived growth factor) qui stimulent l'action des interleukines et des leucotriènes.

A l'heure actuelle, il est bien établi qu'il existe une corrélation entre la sécrétion de cytokines proinflammatoires tels que les IL-2 et IL-6 et la destruction des cellules pancréatiques par l'insuline (Rabinovitch, 1999). En effet, les cytokines participent à la diabétogénèse, en favorisant la recrutement et l'activation des cellules-T CD4<sup>+</sup>, des macrophages et des cellules dendritiques (Rabinovitch, 1999). Chritanson et al. (1993) ont démontré que pour l'apparition de symptômes diabétiques chez la souris NOD (non obèse diabétique), l'activation des cellules-T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> est indispensable. Selon Katz et al. (1993), les cellules CD8<sup>+</sup> sont impliquées dans le relargage des auto-antigènes membranaires dans le milieu extracellulaire. Par ailleurs, les cellules CD4<sup>+</sup> sont responsables de l'auto-destruction des cellules  $\beta$  lorsque les autoantigènes sont présentés par les cellules présentatrices d'antigènes

(CPAg). La différenciation de cellules  $T\ CD4^+$  de phénotypes  $T_H0$  vers le phénotype  $T_H2$ , au lieu du phénotype  $T_H1$ , peut jouer aussi un rôle primordial dans l'induction du diabète chez la souris NOD (Serreze et al., 1994). Les cytokines tel que les IL-2 sont responsable pour cibler les cellules  $\beta$  et entraîner leur destruction par apoptose (Amrani et al., 2000).

Il a été récemment établi que les AGPI n-3 régulent les fonctions des cellules immunocompétentes : les AGPI n-3 sont des immunosuppresseurs (Harbige, 1998).

Dans notre étude, nous avons constaté que le régime AGPI/EPAX enrichi en EPA et DHA augmente significativement la prolifération cellulaire induite par la ConA chez les rates gestantes diabétiques et leurs progénitures obèses comparées aux rats diabétiques et obèses sous régime ISIO. On note aussi que ce régime a tendance à normaliser la prolifération cellulaire. D'autres part, le résultat sur le dosage de l'IL-2 montrent que le régime AGPI/EPAX inhibe la sécrétion d'IL-2 par les spénocytes T de rates gestantes diabétiques et les nouveaux nés obèses. Les effets du régime sur la sécrétion d'IL-2 sont à mettre en relation avec ceux du TTL, vu que l'IL-2 est une cytokine qui stimule la prolifération cellulaire. Ces données corroborent plusieurs études précédentes qui ont prouvé que la prolifération des lymphocytes, ainsi que leurs activités cytotoxiques, diminuent suite à un régime enrichi en AGPI n-3 (Lochniskar et al., 1983 ; Calder et al., 1995 ). Jeffery et al.(1996) rapportent que chez des rats nourris avec un régime enrichi en EPA et DHA, l'effet immunosuppresseur est marqué par une diminution de la production des lymphocytes actifs et de l'activité lytique NK (natural Killer). Ces modifications sont associées à un changement de la composition en acides gras des membranes des lymphocytes (Jeffery et al., 1996 ; Yaqoob et al., 1995.). Le nombre de récepteurs à l'IL-2 est un facteur déterminant de la prolifération lymphocytaire après l'activation antigénique. Ce nombre de

récepteurs à l'IL-2 à la surface des lymphocytes est réduit par les AGPI n-3 (Yaqoob et al., 1995).

Les lymphocytes de la rate jouent un rôle central dans l'initiation, la régulation et les fonctions effectrices du système immunitaire. Des changements dans la composition de la membrane peuvent altérer sa fluidité, la distribution des récepteurs et par conséquent la fonction des cellules. Les altérations des réponses immunes dans l'état du diabète peuvent être attribuées en partie à l'induction de ce dernier dans les altérations du métabolisme des AGE. Les AGE et leurs dérivés (familles n-6 et n-3) présentent de nombreuses et très importantes propriétés biologiques qui expliquent leur importance nutritionnelle. Certains servent non seulement à l'élaboration des PI des membranes cellulaires, contribuant à la fluidité membranaire et régulant les activités des protéines membranaires intrinsèques (Christon et al., 1988 ; Leger et al., 1989), mais aussi constituent les substrats pour la synthèse des eicosanoïdes d'origine microsomale<sup>7</sup>, (endopéroxydes, prostaglandines, thromboxanes, prostacyclines et leucotriènes) qui jouent de nombreux rôles physiologiques et qui sont impliqués dans différentes pathologies (Spector et al., 1988). Ainsi, toute perturbation de la composition en AG des lipides sériques peut entraîner des altérations métaboliques et modifier le fonctionnement des membranes cellulaires et intracellulaires.

Les rates gestantes ISIO diabétiques et leurs progénitures obèses à J 30 et J 90 présentent une diminution du pourcentage de C18:2n-6, associée à une augmentation du pourcentage C20:4n-6 dans les phospholipides membranaires des lymphocytes de la rate, ce qui est en faveur d'une élévation de la conversion microsomale du C18:2n-6 en C20:4n-6, suite à l'action de  $\Delta 6$  et  $\Delta 5$  désaturase et des élongases. L'insuline stimule les activités des désaturases, probablement en

augmentant la synthèse de ces enzymes (ECK et al., 1979). De plus, les teneurs en C20 : 5n-3 et C22 : 6n-3 dans ces phospholipides membranaires sont diminuées chez les rates gestantes ISIO diabétiques et leurs progénitures obèses à J 30 et J 90, ce qui peut être dû à une augmentation de l'utilisation de ces acides gras par les rates gestantes diabétiques et par les rats obèses. Il a été démontré que le tissu adipeux chez les rats obèses accumule une grande quantité d'AGPI, et le dépôt d'AGPI de la série n-3 dans le tissu adipeux dépasse largement celui des autres tissus (Innis, 1991). L'excès du tissu adipeux chez les rats obèses hyper insuliniques peut augmenter l'accumulation du C20 : 5n-3 et C22 : 6n-3 dans ce tissu, ce qui diminuerait leurs teneurs dans les phospholipides membranaires de la rate.

Nos résultats montrent clairement que les acides gras ne sont pas représentés de la même façon chez les animaux témoins et chez les animaux nourris avec un régime AGPI/EPAX. En effet, l'EPA et le DHA non détectable dans les lymphocytes de rats sous régime ISIO, sont présents en quantité significative chez les rates gestantes et leurs progénitures maintenus sous le régime AGPI/EPAX. Ainsi, l'EPA et le DHA ont été significativement incorporés aux lipides membranaires des splénocytes des rates diabétiques gestantes et leurs progénitures. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer le mode d'action de ces AGPI exogènes. Ils peuvent participer à la production d'eicosanoïdes de la série n-3 ayant des actions biologiques différentes de ceux de la série n-6 normalement produits à partir de l'acide arachidonique (Fitzgerald et al., 1989). Il est possible qu'ils participent dans la composition du diacylglycérol (DAG), composé clé lors de la transduction du signal conduisant à l'activation cellulaire T. Nos résultats corroborent les résultats de Triboulot et al. (2001), et d'autres qui ont également signalé que les acides gras n-3 sont significativement incorporés aux phospholipides membranaires plasmatiques et



par conséquent modulent l'activation des cellules T (Fan et al., 2003). Enfin, l'EPA et le DHA pourraient moduler la signalisation calcique.

Dans toutes les cellules, le calcium ionisé est stocké dans le réticulum endoplasmique (RE), les mitochondries et également, dans un compartiment dit « pool cytosolique ».

Puisque, à l'état de repos, la concentration intracellulaire du  $Ca^{2+}$ ,  $[Ca^{2+}]_i$ , est très faible, des petites augmentations des flux du  $Ca^{2+}$ , notamment au niveau de la membrane plasmique ou de la membrane du RE, entraînent des variations à la fois très importantes et très rapides du taux de calcium intracellulaire (Khan et al., 1995 ; Khan et al., 1996). Ceci explique pourquoi le  $Ca^{2+}$  est utilisé comme signal intracellulaire, notamment dans des fonctions biologiques telles que le transport intracellulaire (Khan et al., 1993) et l'activation des cellules T (Khan et al., 1995 ; Khan et al., 1996). Les AGPI n-3 modulent la  $[Ca^{2+}]_i$  dans les cellules-T humaines (Bonin et Khan., 2000). Ainsi, l'EPA et le DHA augmente le  $[Ca^{2+}]_i$  à partir des pools intracellulaires et extracellulaires, en ouvrant des canaux CRAC ( $Ca^{2+}$ -release activated  $Ca^{2+}$ -channels).

L'importance des AGPI dans l'homéostasie calcique intracellulaire des cellules -T diabétiques n'est pas encore totalement étudiée. De nombreux sujets diabétiques présentent des anomalies de l'homéostasie calcique intracellulaire. Nos résultats montrent que la  $[Ca^{2+}]_i$  est inférieure dans les splénocytes -T de rates gestantes ISIO diabétiques et leurs progénitures obèses à J30 et J90 en comparaison avec leurs témoins respectifs. Ceci peut être mis en relation avec des études précédentes montrant une implication de dysfonctionnement du système immunitaire et en particulier des cellules-T dans la pathologie du diabète et de l'obésité (Rabinovitch, 1999). Le régime EPAX enrichi en EPA et DHA augmente significativement la  $[Ca^{2+}]_i$

basale les rates gestantes diabétiques et leurs progénitures obèses à J30 et J90 en comparaison avec les rates gestantes ISIO diabétiques et leurs progénitures . Ces résultats sont en accord avec une étude qui a montré que l'augmentation de la concentration en  $[Ca^{2+}]_i$  peut être corrélée avec une baisse de la glycémie (Henquin, 1979). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que contrairement à nous, ils ont déterminé la concentration en calcium en utilisant un spectrofluoromètre à une seule longueur d'onde 340nm alors que nos mesures ont été effectuées à deux longueurs d'onde 340 et 380nm pour plus de précision. D'autre part, certains auteurs ne constatent pas de différence au niveau de la concentration en calcium libre basale des lymphocytes-T de rats diabétiques et normaux (Bonin et al., 2000).

Dans les cellules-T, une augmentation biphasique de la concentration en calcium intracellulaire  $[Ca^{2+}]_i$ , est induite par la liaison d'antigènes aux récepteurs de cellules-T.

D'après le modèle capacitif de Putney (1997) (Figure 5 dans la partie résultats), le calcium est d'abord libéré dans le cytosol à partir des réserves intracellulaires (principalement le RE) puis relargué dans le milieu extracellulaire. Les cellules T assurent le remplissage de leurs pools calciques préalablement vidés, via l'ouverture de canaux calciques dits canaux CRAC. L'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  constitue le signal essentiel du déclenchement de la prolifération et de la différenciation cellulaire-T (Lewis et Cahalan, 1995 ).

Afin de déterminer les modifications du pool calcique chez les rates gestantes diabétiques et leurs progénitures obèses, nous avons utilisé la Fura-2 pour mesurer l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Nous avons aussi utilisé divers agents mobilisant le calcium-intracellulaire via des voies cellulaires différentes. Ces agents sont la thapsigargine (Tg) et l'ionomycine.

La Tg conduit à une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  en inhibant la pompe  $Ca^{2+}$  ATPase du RE. Nous avons constaté que l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  est supérieure pour les splénocytes-T des rates gestantes ISIO diabétiques et les rats obèses à J30 et J90 en comparaison avec leurs témoins respectifs. Ainsi, il est possible que le pool du RE contienne une réserve calcique plus importante chez les rates diabétiques gestantes et chez les rats obèses, ou alors que le calcium libéré conduise à la libération de seconds messagers qualitativement et quantitativement différents de ceux produits chez les rats témoins.

Dans le milieu 0% calcium, les rates gestantes ISIO diabétiques et les rats obèses à J30 et J90 montrent une augmentation significative de la  $[Ca^{2+}]_i$  induite par la Tg. Cette augmentation vient exclusivement du pool du RE, et aucun influx ne peut se produire en absence du calcium dans le milieu extracellulaire (Grynkiewics et al., 1985).

Ces résultats démontrent que la signalisation calcique des splénocytes-T est altérée durant le diabète gestationnel et la macrosomie. Dans notre étude, nous avons observé de petites mais significatives augmentations de la  $[Ca^{2+}]_i$  dans les cellules-T. En effet, ces petites augmentations dans la  $[Ca^{2+}]_i$  sont cruciales pour l'activation des cellules -T. Cependant, Li et al. (1998) ont prouvé que les oscillations de calcium qui induisent de petites mais significatives augmentations dans la  $[Ca^{2+}]_i$  pendant des périodes de 100 secondes sont suffisantes pour activer les facteurs transcriptionnels au niveau des cellules -T humaines.

Le régime EPAX enrichi en EPA et DHA diminue significativement l'augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  induit par la Tg chez les rates gestantes diabétiques et les rats obèses.

Le mécanisme d'action de l'EPA et le DHA dans la modulation de l'homéostasie intracellulaire du calcium n'est pas bien élucidé. Cependant, notre étude peut être

justifiée en partie, par les résultats d'une étude récente qui a démontré qu'un régime enrichi en EPA et DHA a exercé non seulement des effets antinéoplasmiques, mais aussi une diminution de l'augmentation dans la  $[Ca^{2+}]_i$  induite par la Tg dans les cellules cancéreuses (Calviello et al., 2000).

En outre, il a été démontré que l'addition in vitro de l'EPA et le DHA peut de manière significative diminuer l'augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  induit par la Tg (Bonin et al., 2000).

Cependant, le mécanisme d'action de l'enrichissement des phospholipides des cellules-T par les AGPI in vivo peut être expliqué sur la base des études récentes qui ont démontré que l'incubation des cellules-T avec les AGPI mène au déplacement de la protéine tyrosine kinase de la famille Src à partir de lipides membranaires parallèlement à l'inhibition de la réponse de calcium (Zeyda et al., 2002). Les Src kinases sont attachées à la couche cytoplasmique de domaines détergent-résistants de la membrane (DRM), saturés par des parties d'acyls (myristol, palmitoyl) (Stuling et al., 1998). Le degré élevé de l'insaturation par les AGPI dans les lipides de DRM pourrait entraîner des modifications de la couche inférieure des lipides et par conséquent exclure la protéine tyrosine kinase de la famille Src des domaines membranaires (Stuling et al., 2000).

Ceci pourrait être le mécanisme par lequel les AGPI agissent sur la modulation de la signalisation des cellules-T. Puisque l'action de la Tg dans le milieu 100%  $Ca^{2+}$  montre une réponse élevée de la mobilisation du calcium, il a été suggéré que l'influx de calcium puisse être également modifié chez les rates gestantes diabétiques et leurs progénitures obèses.

L'ionomycine induit également l'élévation de l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  dans les cellules-T des rates gestantes ISIO diabétiques et les rats obèses à J30 et J90 en comparaison avec leurs témoins respectifs. Nos résultats sont en accord avec ceux

d'Ebata et al. (1991) qui ont démontré l'augmentation de la densité des canaux calciques chez les rats diabétiques. De même, l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$ , induit par l'ionomycine est significativement plus élevée chez les rats obèses sous régime ISIO comparés aux témoins du même groupe. Le régime EPAX réduit significativement l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  induite par l'ionomycine chez les rats obèses .

Ces derniers résultats permettent de conclure qu'au niveau de l'homéostasie calcique, c'est le fonctionnement des canaux calciques qui est modifié ainsi que le pool du RE qui est altéré chez les rates diabétiques au cours de la gestation et chez les rats obèses. De plus, nous avons constaté que le régime EPAX est capable de restaurer cette modification chez les animaux diabétiques et obèses.

## CONCLUSION

Le Diabète provoqué expérimentalement chez le rat, entraîne des modifications du métabolisme des lipides et des altérations du système immunitaire, à la naissance et à l'âge adulte.

Nos résultats mettent en évidence que le métabolisme des lipides, la prolifération des lymphocytes T, la sécrétion d'interleukine-2, la composition en acides gras des phospholipides membranaires, et l'homéostasie calcique des splénocytes-T des rattes gestantes nourris par le régime ISIO et leurs nouveaux nés sont profondément perturbés par le diabète.

Les profils lipidiques, et immunologiques chez les mères gestantes ISIO diabétiques sont différents de ceux des mères témoins. Les mères gestantes ISIO diabétiques présentent des teneurs sériques élevés en TG, CT. La prolifération lymphocytaire stimulée par la Con A diminue significativement chez les mères pendant et après la gestation due au fait que pendant le diabète, les cellules sont déjà activées in vivo par contre le taux circulant d'IL-2 est élevé en relation avec l'hyperglycémie qui est un facteur favorisant la synthèse des interleukines (IL-2). Les rattes gestantes ISIO diabétiques présentent une diminution du pourcentage de C18 :2n-6 associé une augmentation du pourcentage C20 : 4n-6 dans les phospholipides membranaires des splénocytesT, de plus les teneurs en C20 :5n-3 et C22 : 6n-3 sont diminués. Nos résultats montrent aussi que la  $[Ca^{2+}]_i$  basale est diminuée dans les splénocytes-T des rattes gestantes ISIO diabétiques. Cependant, l'utilisation d'agents mobilisant le calcium intracellulaire via des voies cellulaires différentes tels que la Tg et l'ionomycine dans des milieux à 0 et 100%  $Ca^{2+}$  montrent que la signalisation calcique des splénocytes-T est altérée durant le diabète gestationnel et après la gestation.

L'utilisation d'un modèle animal, le rat obèse né de ratte rendue diabétique par la streptozotocine consommant le régime ISIO permet d'établir définitivement que l'obésité foetale est associée à des troubles du métabolisme et à un dysfonctionnement du système immunitaire, non seulement à la naissance (J0) et après 1 mois de vie post-natale (J30), mais aussi et surtout à l'âge adulte (J90). En effet, les rats nouveaux-nés obèses de mères ISIO diabétiques montrent un hyperinsulinisme, une hyperlipidémie qui sont en faveur d'une stimulation de la lipogénèse in utero. Ces rats obèses maintiennent une croissance accélérée et un excès du tissu adipeux jusqu'à 3 mois de vie. Il apparaît que le facteur primaire d'induction de l'obésité est la suralimentation subie in utero. Cependant, la persistance de cette obésité n'est pas liée à une augmentation de la consommation alimentaire post-natale, mais plutôt à une meilleure utilisation des nutriments et à une augmentation de la capacité de mise en réserve. De plus, des modifications immunologiques similaires à ceux des mères gestantes diabétiques sont observées à chaque temps de l'expérimentation chez les rats obèses consommant le régime ISIO. Toutes ces perturbations semblent être liées initialement à une plus grande sensibilité des tissus à l'insuline acquise in utero. Cette sensibilité à l'insuline paraît diminuer progressivement, puis s'installe une résistance à l'insuline. La majorité des troubles lipidiques et immunologiques chez les rats obèses adultes sous régime ISIO peuvent être rapprochés de ceux observés chez leurs mères ISIO diabétiques.

Dans notre étude, nous avons aussi élucidé l'effet in-vivo d'un régime enrichi en AGPI (n-3), DHA et EPA sur le métabolisme lipidique et sur la modulation du système immunitaire chez la ratte gestante diabétique, et ses nouveaux-nés. Ces AGPI sont considérés comme des immunosuppresseurs. Nous avons déterminé l'effet de ce régime sur les troubles glycémiques et lipidiques ainsi que sur la

prolifération cellulaire, la sécrétion des IL-2, la composition en acides gras des phospholipides membranaires et l'homéostasie calcique des splénocytes-T des rattes diabétiques au cours et après la gestation ainsi que chez leurs progénitures obèses. Le régime EPAX enrichi en EPA et DHA diminue l'hyperglycémie chez les rattes gestantes diabétiques ce qui va entraîner une réduction de la prévalence de l'obésité chez leurs nouveaux nés. Ce régime induit également la régulation des anomalies lipidiques entraînant une diminution des TG et CT plasmatiques conséquence de leur réduction au niveau hépatique. Le test de transformation lymphoblastique-T révèle une inhibition de la prolifération induite par la concavaline-A et de la sécrétion d'interleukine-2 des splénocytes-T de rattes gestantes diabétiques nourris avec le régime EPAX comparés à ceux des témoins. L'analyse de la composition en acides gras des phospholipides des cellules-T montre une substitution de l'acide arachidonique par les acides gras de la série n-3 (EPA, DHA) chez les animaux nourris avec le régime EPAX. Nous avons également observé que l'homéostasie calcique intracellulaire est modifiée et a tendance à se normaliser chez les rattes diabétiques au cours et après la gestation.

Les nouveaux nés obèses de mères EPAX diabétiques présentent une diminution du poids corporel, du poids du tissu adipeux et une réduction des teneurs en lipides du foie et du tissu adipeux ainsi qu'une diminution de la glycémie et de l'hyperinsulinémie. Nos résultats mettent aussi en évidence les effets immunosuppresseurs des AGPI de la famille n-3 et par conséquent l'importance de leur ingestion au cours de l'obésité, ou comme prévention contre ce type de pathologie. Les résultats sur la prolifération cellulaire induite par la ConA, le dosage de l'IL-2, la composition en acides gras des phospholipides membranaires, et l'homéostasie calcique chez la progéniture obèse nourris par le régime EPAX sont



similaires à ceux de leurs mères diabétiques nourris par le régime EPAX et ceci à chaque temps de l'expérimentation (J30 et J90).

Toutes ces données tendent à prouver que les troubles nutritionnels (suralimentation) in utero provoquent des déviations de la croissance (obésité) associées à des altérations hormonales, métaboliques et immunologiques à l'origine d'une prédisposition à certaines maladies métaboliques à l'âge adulte (obésité, diabète, atherosclérose).

C'est dire tout l'intérêt d'identifier les femmes enceintes à risque comme les femmes diabétiques. Dans ce cas, il est nécessaire de réaliser un bon contrôle du diabète et du poids des mères avant et pendant la grossesse afin de diminuer la prévalence de l'obésité foetale. De plus, un contrôle métabolique rigoureux est chez toute femme enceinte diabétique nécessaire, car les effets délétères pour la descendance, engendrés par le diabète maternel, ne sont pas limités à la période foetale ou néonatale, mais persistent à l'âge adulte.

De plus, un suivi des nouveau-nés obèses est nécessaire dans le but de voir si les perturbations lipidiques et immunologiques persistent ou non. Ceci permettra un dépistage plus précoce des risques métaboliques, et nécessitera une prise en charge nutritionnelle dès le jeune âge.

Néanmoins, des approches nutritionnelles utilisant un supplément d'acides gras dans les pathologies comme le diabète et l'obésité soit en thérapie complémentaire soit comme thérapie alternative sont potentiellement très importantes, car la régulation de l'expression génique, la production des eicosanoïdes et des cytokines, l'action des enzymes antioxydantes et les paramètres lipidiques et glucidiques sont tous des mécanismes par lesquels les AGPI de la famille n-3 peuvent exercer des effets

**favorable sur le système immunitaire, les maladies auto-immunes et les anomalies métaboliques.**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALBERT ML., SAUTER B., BHARRDWAJ N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*. **392**: 86-89.

AMRANI A., VERDAGUER J., THIESSEN S., BOU S., SANTAMARIA P. (2000). IL-1 beta and INF gamma mark beta-cells for fas-dependant destruction by diabetogenic CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* **105**: 459-468.

ANEL A., RICHIERI GV., KLEIN FELD AM. (1993). Membrane partition of fatty acids and inhibition of T-cell function. *Biochemistry*. **32**: 530-536.

ARNOLD B., SCHÖRICH G., HÄMMERLING G. (1993). Multiple Levels of peripheral tolerance. *Immunol today*. **14**: 12-14.

ASSMANN G., DE BACKER G., BEGNARA S., BETTERIDGE J., CREPALDI G., FERNANDEZ-CRUZ A., GODZFREDZEN J., JACOTTO B., WILLIAMS C. (1997). International consensus statement on olive oil and mediteranean diet: implications for health in Europe. *Eur. J. cancer. prev.* **6**: 418- 421.

BACH JF. (1994). Insulin-dependent diabetes as an autoimmune disease. *Endocrin. Rev.* **15**: 516-542.

BACH JF. (1995). Insulin- dependent diabetes mellitus as a  $\beta$  cell targeted disease of immunoregulation. *J. autoimmun.* **8**: 439-463.

BANG HO., DYERBERG J., SINCLAIR HM. (1980). The composition of the Eskimo food in north western Greenland. *Am. J. Clin. Nutr.* **33**: 2657-2661.

BANSAL AS., WILSON PB., PUMPHREY RS., BOULTON AJ., MAILK RA. (1993). Cellular and humoral immunity in patients with insulin-dependant diabetes. *Lancet*. **341**: 1365-1369.

BARKER DJP. (1995). Fetal origins of coronary heart disease. *Br. Med. J.* **311**: 171-174.

BARKER JN. (1991). The pathophysiology of psoriasis. *Lancet.* **338**: 227-230.

BARONE J., HEBERT JR., REDDY MM. (1989) Dietary fat and natural-killer-cell activity. *Am. J. Clin. Nutr.* **50** : 861-867.

BATLLE DC., JANSSE G., LAPOINTE M., LLIBRE J., SALEH A. (1990). Cytosolic calcium in T lymphocytes from the spontaneously hypertensive rat. *Am. J. Hypertens.* **3**: 343-348

BENDELAC A., BOITARD C., BEDOSSA P., BAZIN H., BACH JF. (1988). Adoptive T cell transfer of autoimmune non obese diabetic mouse does not require recruitment of host B lymphocytes. *J. immunol.* **141**: 85-88.

BENDELAC A., CARNAUD C., BOITARD C., BACH JF. (1987). Synergic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. *J. Exp. Med.* **166**: 823-832.

BENDTZEN K., MANDRUP-POULSEN T., NERUP J., NIELSEN JH., DINARELLO C.A., SVENSON M. (1986). Cytotoxicity of human p 17 interleukin-1 for pancreatic islets of Langerhans. *Science.* **232**: 1545-1547.

BERK MA., MIMOUNI F., MODOVNIK, HERTZBERG V., VALUCK J. (1989). Macrosomia in infants of insulin-dependent diabetic mothers. *Pediatrics.* **83**: 1029-1034.

BERMAN MA., SANDBORG CI., WANG Z., IMFELD KL., ZALDIVAR FJR., DADULFALZA V. (1996). Decreased IL-4 Production in new onset type I insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Immunol.* **157**: 4690-4696.

BERRY EM. (1997). Dietary fatty acids in the management of diabetes mellitus. *Am. J. Clin. Nutr.* **66**, 991-997

BITTNER SB., TUCKER WF., CARTWRIGHT I., BLEEHEN SS. (1988). A double-blind, randomised, placebo-controlled trial of fish oil in psoriasis. *Lancet.* **1**: 378-380.

BJOMTORP P. (1991). Metabolic implication of body fat distribution. *Diabetes*. **14**: 1132-1143.

BLIGH EG, DYER WJ. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **37**: 911-917.

BLOND. JP. (1992). Acides gras essentiels et propriétés de la peau. *Revue Française des corps gras*. N° 3/4.

BLOOM SR., JOHNSTON DT. (1972). Failure of glucagon release in infants of diabetic mothers. *Br. Med. J.* **4**: 453-457.

BLOT WJ., LANIER A., FRAUMENI JF., BENDER TR. (1975). Cancer mortality among Alaskan natives, 1960-69. *J. Natl. Cancer. Inst.* **55**: 547-554.

BONIN A., KHAN NA., (2000). Regulation of calcium signalling by DHA in human T-cells : implication of CRAC channels. *J. Lipid. Res.* **41**: 277-284.

BOUDJEMA M., HASSANI N. (2002). Critère de diagnostic du diabète non insulino dépendant dans la population générale. *Diabète care. Médecine thérapeutique* Vol 380-386

BRAY MA. (1986). Leukotrienes in inflammation. *Agents Actions.* **19**: 87-99.

BRESCHI MC., SEGHIERI G., of birthweight BARTOLOMEI G., GIRONI A., BALDI S., FERRANNINI E. (1993). Relation to maternal plasma glucose and insulin concentrations during normal pregnancy. *Diabetologia.* **36**: 1315-1321.

BROWN MS., GOLDSTEIN JL. (2004). Lowering plasma cholesterol by raising ldl receptors. *Atheroscler Suppl.* **5** (3) : 57-59.

BURSTEIN D., HANDLER ES., SCHINDLER J., SEALS J., MORDES JP., ROSSINI AA. (1987). Effect of interleukin-2 on diabetes in the BB/Wor rat. *Diabetes. Res.* **5**: 163-167.

BUYSSCHAERT M. (1998). Diabétologie clinique. Ed. DEboeck. Larcier. 27-35.

CALANDRA C., ABELL DA., BESHEIR NA. (1981). Maternal obesity in pregnancy. *Obstet. Gynecol.* **57**: 8-12

CALDER PC. (1997). N-3 polyunsaturated fatty acids and cytokine production in health and disease. *Ann. Nutr. Metab.* **41**, 203-234.

CALDER PC, COSTA-ROSA LF., CURI R. (1995). Effects of feeding lipids of different fatty acid compositions upon rat lymphocyte proliferation. *Life. Sci.* **56**: 456-463.

CALDER PC. (1999). Dietary fatty acids and immune system. *Lipids.* **34**: S137-S140.

CALDER PC., NEWSHOLME EA. (1992). Polyunsaturated fatty acids suppress human peripheral blood lymphocyte proliferation and interleukin-2 production. *Clin. Sci. (Lond).* **82**: 695-700.

CALVIELLO G., PALOZZA P., DI NICUOLO F., MAGGIANO N., BARTOLI GM. (2000). N-3 PUFA dietary supplementation inhibits proliferation and store-operated calcium influx in thymoma cells growing in Balb/c mice. *J. Lipid. Res.* **41**:182-188.

CANTRELL DA., SMITH KA. (1984). The interleukin-2 T cell system: a new cell growth model. *Science* **224**, 1312-1316.

CARROLL KK. (1992). Dietary fat and breast cancer. *Lipids*, **27**: 793-797.

CARRUTHERS A., MELCHIOR DL. (1988). Effects of lipid environment on membrane transport: the human erythrocyte sugar transport protein/lipid bilayer system. *Annu. Rev. Physiol.* **50**: 257-271.

CELLA M., ENGERING A., PINET V., PIETERS J., LANZAVECCHIA A. (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature.* **388**:782-787.

CHANG FY., SHAIQ MF. (1995). Decreased cell mediated immunity in patients with NIDDM. *Diabet. Res. Clin. Pract.* **28**: 137-146.

CHRISTIANSON SW., SCHULTZ LD., LEITER EH. (1993). Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T cells from diabetic versus prediabetic NOD. NON-Thy-1a donors. *Diabetes*. **42**: 44-55.

CHRISTON R., FERNANDEZ Y., CAMBON-GROS C., PERIQUET A., DELTOUR P., LEGER CL., MITJAVILLAS S. (1988). The effect of dietary essential fatty acid deficiency on the composition and properties of the liver microsomal membrane of rats. *J.Nutr*. **118**: 1311-1318.

CLELAND LG., JAME MJ. (2000). Fish oil and rheumatoid arthritis: antiinflammatory and collateral health benefits. *J. Rheumatol*. **27**: 2305-2307.

COHN JS., NESTEL PJ., TURLEY SD. (1987). Metabolism of high density lipoprotein in the hyperlipidemic diabetic SHR-N- Corpulent rat. *Metab. Clin. Exp*. **36**: 230-236.

COLWELL JA. (1993). Vascular thrombosis in type II diabetes mellitus. *Diabetes*. **42**: 8-11

CONNELLY DM., TABERNER PV. (1989). Characterization of the spontaneous diabetes obesity syndrome in mature male CBA/Ca mice. *Pharmacol. Biochem. Behav*. **34**: 255-259.

CORBETT JA., MCDANIEL ML. (1992). Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of  $\beta$  cells? Possible therapeutic interventions in IDDM. *Diabetes*. **41**: 897-903.

COWETT RM., SHWARTZ R. (1982). The infant of the diabetic mother. *Pediatr. Clin. North. Am*. **29**: 1213-1231.

CUNNANE SC., MCADOO KR., HORROBIN DF. (1986). N-3 essential fatty acids decrease weight gain in genetically obese mice. *Br. J. Nutr*. **56**: 87-95.

DAUGHADAY WH., PHILLIPS LS., MUELLER MC., (1976). The effects of insulin and growth hormone on the release of somatomedin by the isolated rat liver. *Endocrinology*. **98**: 1214-1219.

DE CATERINA R., LIAO JK., LIBBY P. (2000). Fatty acid modulation of endothelial activation. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**: 213S-223S.

DE PABLO MA., ORTEGA E., GALLEGO AM., ALVAREZ C., PANCORBO PL., ALVAREZ DE CIENFUEGOS G. (1998). The effect of dietary fatty acid manipulation on phagocytic activity and cytokine production by peritoneal cells from Balb/c mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **44**(1): 57-67.

DELMIS J., DRAZANCIC., IVANISEVIC M., SUCHANEK E. (1992). Glucose, insulin, HGH and IGF-I levels in maternal serum, amniotic fluid and umbilical venous serum : A comparison between late normal pregnancy and pregnancies complicated with diabetes and fetal growth retardation. *J. Perinat. Med.* **20**: 47-56.

DELOVITSCH TL., SINGH B. (1997). The non-obese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity.* **7**: 727-738.

DEL-PRATO S., ENZI G., VIGILLI DE KREUTZBERG S., LISATO G., RICCIO A., MAIFRENI L., IORI E., ZURLO F., SERGI G., TIENGO A. (1990) . Insulin regulation of glucose and lipid metabolism in massive obesity. *Diabetologia.* **33**: 228-236.

DEVILLIERS TJ., MAC FARLANE CM., TSAKALAKOS N. , TALJAARD JF. (1984). Neonatal pancreatic function in infants born to mothers with gestational and overt diabetes. *S. Afr. Med. J.* **66**: 690-693.

DI MARIO U, DOTTA F, GARGIULO P, SUTHERLAND J, ANDREANI D, GUY K, PACHI A, FALLUCCA F. (1987). Immunology in diabetic pregnancy: activated T cells in diabetic mothers and neonates. *Diabetologia.* **30**(2): 66-71

DINARELLO CA., SVENSON M. 1986. Cytotoxicity of human interleukin-1 for pancreatic islets of Langerhans. *Science.* **232**: 1545-1547.

DORNER G., PLAGEMANN A. (1994). Perinatal hyperinsulinim as possible predisposing factor of diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. *Horm. Metab. Res.* **26**:213-221.



DOTTA F., GARGUILO P., TIBERTIC B., PACHI A., FALLUCCA F., ANDREANI D., DI MARIO V. (1987). Humoral and cellular immune abnormalities in neonates of diabetic mothers: any pathological role? *Exp. Clin. Endocrinologia*. **30**: 66-71.

DUBUC PU. (1976). The development of obesity, hyperinsulinemia and hyperglycemia in ob/ob mice. *Metabolism*. **25**: 1567-1574.

DURER U., FRANKE H., SOMMER M., SCHLAG B., DARGEL R. (1987). Binding and internalization of low density lipoproteins in fetal rat liver at term under in vivo and in vitro conditions. *Biomed. Biochem. Acta*. **46**: 695-703.

DURRINGTON PN., BHATNAGAR D., MACKNESS MI., MORGAN J., JULIER K., KHAN MA., FRANCE M. (2001). An omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrate administered for one year decreased triglycerides in simvastatin treated patients with coronary heart disease and persisting hypertriglyceridaemia. *Heart*. **(85) 5**: 544-548

EBATA H., NATSUME T., MITSUHASHI T. (1999). Reduced calcium sensitivity and density of dihydropyridine to calcium channels. *J. Lipid. Res*. **41**: 277-284.

ECK MG., WYNN JO., CARTER WJ., FAAS FH. (1979). Fatty acid desaturation in experimental diabetes mellitus. *Diabetes*. **28**: 479-485.

EDOUARD P., HISERODT JC., PLAMONDON C., POUSSIER P. (1993). CD8+ T-cells are required for adoptive transfer of the BB rat diabetic syndrome. *Diabetes*. **42** (3):390-397

EIZIRIK DL., TRACEY DE., BENDTZEN K., SANDLER S. (1991). An interleukin-1 receptor antagonist protein protects insulin-producing beta cells against suppressive effects of interleukin-1 beta. *Diabetologia*. **34**: 445-448.

EL MOHANDÉS A., TOURAINÉ JL., SHURKY AS., SALLE B. (1982). Lymphocyte populations and responses to mitogens in infants of diabetic mothers. *J. Clin. Labo. Immunol*. **8**: 25-29.

ENDRES S., GHORBANI R., KELLEY VE., GEORGILIS K., LONNEMANN G., VAN DER MEER JW., CANNON JG., ROGERS TS., KLEMPNER MS., WEBER PC.

(1989). The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N. Engl. J. Med.* **320**: 265-271.

ENDRES S., MEYDANI SN., GHORBANI R., SCHINDLER R., DINARELLO CA. (1993). Dietary supplementation with n-3 fatty acids suppresses interleukin-2 production and mononuclear cell proliferation. *J. Leukoc. Biol.* **54**: 599-603.

ENZI G., ZANARDO V., CARETTA F., INELMEN EM., RUBALTELLI F. (1981). Intrauterine growth and adipose tissue development. *Am. J. Clin. Nutr.* **34**: 1785-1790.

ERIKSSON U., ANDERSSON A., EFENDIC S. (1980). Diabetes in pregnancy: Effects on the foetal and newborn rat with particular regard to body weight, serum insulin concentration and pancreatic contents of insulin, glucagon and somatostatin. *Acta. endocrinol.* **94**: 354-364.

FAN YY, MCMURRAY DN, LY LH, CHAPKIN RS. (2003). Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids remodel mouse T-cell lipid rafts. *J Nutr.* **133**(6):1913-20.

FAUST A., KLEEMAN R., ROTHE H., KOLB H. (1996). Role of macrophages and cytokines in  $\beta$  cell death. In: Sharfir E. ed. *Lessons from animal diabetes*. VI: Cambridge: *Birkhauser Boston*. 47-56.

FOX CJ., DANSKA JS. (1997). IL-4 expression at the onset of islet inflammation predicts nondestructive insulinitis in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* **158**: 2414-2424.

FRAYN KN., COPPACK SW. (1992). Insulin resistance, adipose tissue and coronary heart disease. *Clinical Science.* **82**: 1-8.

FUMERON F., BRIGANT L., OLLIVIER V., DE PROST D., DRISS F., DARCEY P., BARD JM., PARRA HJ., FRUCHART JC., APFELBAUM M. (1991). N-3 polyunsaturated fatty acids raise low-density lipoproteins, high-density lipoprotein 2, and plasminogen-activator inhibitor in healthy young men. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**: 118-122.

GALLAI V., SARCHIELLI P., TREQUATTRINI A., FRANCESCHINI M., FLORIDI A., FIRENZE C., ALBERTI A., DI BENEDETTO D., STRAGLIOTTO E. (1995). Cytokine secretion and eicosanoid production in the peripheral blood mononuclear cells of MS patients undergoing dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Neuroimmunol.* **56** (2): 143-153.

GARCIA-MOLINA V., AGUILERA JA., GIL A., BERTHAULT MF., PICON L. (1990). Changes in plasma lipoproteins and liver lipids in neonatal rats. *Comp. Biochem. Physiol.* **113B**: 789-793

GELADI NL., CHA CJ., OH W. (1991). Evaluation of insulin sensitivity in obese offspring of diabetic rats by hyperinsulinemic-euglycemic clamp technique. *Pediatr. Res.* **30**: 40-44.

GELARDI NL., CHA CJ., OH W. (1990). Glucose metabolism in adipocytes of obese offspring of mild hyperglycemic rats. *Pediatr. Res.* **28**, 641- 645

GIORDANO C. (1990). Immunobiology of normal and diabetic pregnancy. *Immunol. Today.* **11**: 301-303.

GIORDANO C., DE MARIA R., MATTINA A., STASSI G., TODARO M., PUGLIESE A., GALLUZZO G., BOTTA RM., GALLUZZO A. (1982). Analysis of T-lymphocyte subsets after phytohemagglutinin stimulation in normal and type 1diabetic mothers and their infants. *Am. J. Reprod. Immunol.* **28**: 65-70.

GOLDSTEIN R., LEVY E., SHAFRIR E. (1985). Increased maternal-fetal transport of fat in diabetes assessed by polyunsaturated fatty acid content in fetal lipids. *Biol. Neonate.* **47**: 343-349.

GRANATO D., BLUM S., ROSSLEC C., LE BOUCHER J., MALNOE A., DUTOT G. (2000). Effects of parenteral lipid emulsion with different fatty acid composition on immune cell functions in vitro. *J. ParenterEnteral. Nutr.* **24** (2): 113-118.

GREEN EA., FLAVEL RA. (1999). The initiation of autoimmune diabetes. *Curr Opin Immunol.* **11**: 663-669.

GREEN EA., FLAVELL RA. (1999). TRANCE –RANK, a new signal pathway involved in lymphocyte development and T cell activation. *J. Exp. Med.* **189**: 1017-1020.

GRYNKIEWICZ G., POENIE M., TSIEN RY. (1985). A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**: 3440-3450.

HALL K., HANSSON U., LUNDIN G., LUTHMAN M., PERSSON B., POVOA G., STANGENBERG M., OFVERHOLM U. (1986). Serum levels of somatomedins and somatomedin-binding proteins in pregnant women with type I or gestational diabetes and their infants. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **63**: 1300-1306.

HARBIGE LS. (1998). Dietary n-6 and n-3 fatty acids in immunity and autoimmune disease. *Proc. Nutr. Soc.* **57**: 555-562.

HARBIGE LS. (2003). Fatty acids, the immune response and auto immunity: a question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. *lipids.* **38** (4): 32-41.

HARDMAN WE. (2004). (n-3) fatty acids and cancer therapy. *J. Nutr.* **134**: 3427S-3430S.

HARRIS WS. (1989). Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: A critical review. *J. Lipid. Res.* **30**, 785- 807

HENQUIN JC. (1979). Opposite effects of intracellular Ca<sup>2+</sup> and glucose on K<sup>+</sup> permeability of pancreatic islet cells. *Nature.* **280(5717)**:66-68.

HERRERA E., PALACIN M., MARTIN., LASUNCIRON MA. (1985). Relationship between maternal and fetal fuels and placenta glucose transfer in rats with maternal diabetes of varying severity. *Diabetes.* **34**: 42-46.

HERTEL J., ANDERSEN GE., CHRISTENSEN NJ. (1980). Plasma noradrenaline in infants of diabetics mothers. *Diabetologia.* **19**: 484-485.

HILL DE. (1978). Effect of insulin on fetal growth. *Semin. Perinatol.* **2**: 319-328.

HILL W., PELLE-DOY G., KITZMILLER JL., SPENCER ME. (1989). Insulin-like growth factors in fetal macrosomia with and without maternal diabetes. *Horm. Res.* **32**: 178-182.

HOEGSBERG B., GRUPPUSO PA., COUSTAN DR. (1993). Hyperinsulinemia in macrosomic infants of non diabetic mothers. *Diabetes. Care.* **16**: 32-36.

HOFFMAN WH., HELMAN SW., PASSMORE G. (2001). Acute activation of peripheral lymphocytes during treatment of diabetic ketoacidosis. *J. Diab. Comp.* **15**: 137- 146

HORROCS LA., YEO YK., (1999). Health benefits of docosahexaenoic acids. *Pharmacol. Res.* **40**: 211-225.

HUGHES JH., COLCA JR., EASOM RA., TURK J., MCDANIEL ML. (1990). Interleukin-1 inhibits insulin secretion from isolated rat pancreatic islets by a process that requires gene transcription and mRNA translation. *J. Clin. Invest.* **86**: 856-863.

HUTCHINGS P., ROSEN H., O'REILLY L., SIMPSON E., GORDON S., COOKE A. (1990). Transfer of diabetes in mice prevented by blockage of adhesion- promoting receptor on macrophages. *Nature.* **348**: 639-642.

IHM SH., YOON JW. (1990). Studies on autoimmunity for initiation of beta cell destruction: VI. Macrophages are essential for the development of beta cell specific cytotoxic effectors and insulinitis in NOD mice. *Diabetes.* **39**: 1273-1278.

INGULI E., MONDINO A., JENKINS MK. (1997). In vivo detection of dendritic cells antigen presentation to CD4+ T cells. *T. Exp. Med.* **185**: 2133-2141.

INNIS SM. (1991). Essential fatty acids in growth and development. *Prog. Lipid. Res.* **30**: 39-103.

ITOH M. (1989). Immunological aspects of diabetes mellitus. Prospects for pharmacological modification. *Pharm. Ther.* **44**: 351-406.

JASEN A., HOMO- DELARCH F., HOOIJKAAS HH., LEENEN PJ., DARDEN M., DREXHAGE HA. (1994). Immunohistochemical characterization of monocyte-

macrophages and dendritic cells involved in the initiation of insulinitis and beta cell destruction in NOD mice. *Diabetes*. **43**: 667-675.

JEFFERY NM., SANDERSON P., SHERRINGTON EJ., NEWSHOLME EA., CALDER PC. (1996). The ratio of n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat diet alters serum lipid levels and lymphocyte functions. *Lipids*. **31**: 737-745.

JEFFERY NM., YAQOUB P., NEWSHOLME EA., CALDER PC. (1996). The effects of olive oil upon rat serum lipid levels and lymphocyte functions appear to be due to oleic acid. *Ann. Nutr. Metab.* **40**, 71-80.

JOHSON SR., KOLGERG BH., VARNER MW. (1987). Maternal obesity and pregnancy. *Surg. Gynecol.Obset.* **164**: 431-437.

JOLLY CA., JIANG YH., CHAPKIN RS., MC MURAY DN. (1997). Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids suppress murine Lymphoproliferation, Interleukin-2 secretion, and the formation of diacylglycerol and ceramide. *J Nutr.* **127**:37-43.

JONES CW. (2001) Gestational diabetes and its impact on the neonate. *Neonat. Netw.* **20**, 17- 23

KALKHOFF RK., KANDARAKI E., MORROW PG., MITCHELL TH., KELBER S., BORKOWF HI. (1988). Relationship between neonatal birth weight and maternal plasma amino acid profiles in lean and obese non diabetic women and type 1 diabetic pregnant women. *Metabolim.* **37**: 234-239.

KAPLAN SA. (1984). The insulin receptor. *J. Pediatr.* **104**: 327-336.

KATZ J., BENOIST C., MATHIS D. (1993). Major histo-compatibility complex class I molecules are required for the development of insulinitis in non obese diabetic mice. *Eur. J. Immunol.* **23**: 3358-3360.

KELLEY DS., BRANCH LB., LOVE JE., TAYLOR PC., RIVERA YM AND IACONO JM. (1991). Dietary alpha-linolenic acid and immunocompetence in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**: 40-46.

KELLEY DS., NELSON GJ., BRANCH LB., TAYLOR PC., RIVERA YM. AND SCHMIDT PC. (1992). Salmon diet and human immune status. *Eur. J. Clin. Nutr.* **46**: 397-404.

KHAN NA., FERRIERE F., DESCHAUX P. (1995). Serotonin-induced calcium signalling via 5-HT<sub>1A</sub> receptors in human leukaemia (K562) cells. *Cell. Immunol.* **165**: 148-152.

KHAN NA., HICHAMI A. (1999). Ionotropic 5- hydroxytryptamine type 3 receptor is implicated in the activation of protein kinase C-dependent phospholipase D pathway in human T cells. *Biochem. J.* **344**: 199-204.

KHAN NA., MEYNIEL JPH., DESCHAUX P. (1996). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin and protein kinase C regulation of serotonin transport in human K 562 lymphocytes. *Cell. Immunol.* **172**: 269-274.

KHAN NA., SEZAN A., QUEMENER V., MOULINOUX JP. (1993). Polyamine transport regulation by calcium and calmodulin: role of Ca(2+)-ATPase. *J. Cell. Physiol.* **157** (3):493-501

KHURISHITA M., NAKASHIMA K., KOSU H. (1994). A retrospective study of glucose metabolism in mothers of large babies. *Diabetes. care.* **17**:649-652.

KIM JH., HUBBARD NE., ZIBOH V., ERICKSON KL. (2005). Conjugated linoleic acid reduction of murine mammary tumor cell growth through 5-hydroxyeicosatetraenoic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* **1687** (1-3): 103-109.

KING H., REWERS M., WHO AD HON-REPORTING GROUP. (1993). Global estimates for prevalence of Diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Diabetes care.* **16**:

KISSEBAH AH., FREEDMAN DS., PEIRIS AN. (1989). Health risks of obesity. *Med. Clin. N. Am.* **73**: 111-138.

KNOPP RH. (1986). Epidemiology of cardiovascular disease in women and the role of sex steroid hormone use. *J. Reprod. Med.* **34**(9 Suppl):691-715

KNOPP RH., MONTES A., CHILDS M., LI JR., MABUCHI H. (1981). Metabolic adjustments in normal and diabetic pregnancy. *Clin. Obstet. Gynecol.* **24**: 21-49.

KNOPP RH., VAN ALLEN MI., MC NEELY M., WALDEN CE., PLOVIE B., SHIOTA K., BROWN Z. (1993). Effect of insulin-dependent diabetes on plasma lipoprotein in diabetic pregnancy. *J. Reprod. Med.* **38**:703-710.

KNOPP RH., WARTH MR., CHARLES D. (1986). Lipoprotein metabolism in pregnancy, fat transport to the fetus, and the effects of diabetes. *Biol. Neonate* **50**, 297-317

KO IY., IHM SH., YOON JW. (1991). Studies on autoimmunity for initiation of beta-cell destruction VIII. Pancreatic beta-cell dependent autoantibody to a 38 kilodalton protein precedes the clinical onset of diabetes in BB rats. *Diabetologia.* **34**: 548-554.

KO IY., JUN HS., KIM GS., YOON JW. (1994). Studies on autoimmunity for initiation of beta-cell destruction X. Delayed expression of the membrane-bound islet cell specific 38 KDa autoantigen that precedes insulinitis and diabetes in the BB rats. *Diabetologia.* **37**: 460-465.

KOLB H., KANTWERK G., TREICHEL U., KURNER T., KEISEL U., HOPPE T. (1986). Prospective analysis of islet lesions in BB rats. *Diabetologia.* **29**: 1-13.

KOLB H., ZIELASEK J., TREICHEL U., FREYTAG G., WRANN M., KEISEL U. (1986). Recombinant interleukin-2 enhances spontaneous insulin-dependent diabetes in BB rats. *Eur. J. Immunol.* **16**: 209-212.

KONTTINEN YT., BERGROTH V., KINNUNEN E., NORDSTORM D., KOURI T. (1987). Activated T-lymphocytes in patients with multiple sclerosis in clinical remission. *J. Neurol. Sci.* **81**: 133-139.

KREMER JM., JUBIZ W., MICHALEK A., RYNES RI., BARTHOLONIEW LE., BIGAQUETTE J., TIMCHALCK M., BEELER D., LININGER L. (1987). Fish oil fatty acid supplementation in active rheumatoid Arthritis. *Am. Int. Med.* **106**: 479-503.



KREMER JM., LAWRENCE DA., JUBIZ W., DIGIACOMO R., RYNES R., BARTHOLOMEW LE., SHERMAN M. (1990). Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic effects. *Arthritis. Rheum*, **33**, 810-820.

KROMANN N., GREEN A. (1980). Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. *Acta. Med. Scand.* **208**: 401- 406.

KROMHOUT D. (1989). N-3 fatty acids and coronary heart disease: epidemiology from Eskimos to Western populations. *J. Intern. Med. Suppl.* **225**: 47-51.

KROMHOUT D., BOSSCHIETER E B., De LEZENNE COULANDER C. (1985). The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* **312**, 1205-1209.

KÜHL C., ANDERSEN GE., HERTEL J., MOLSTED-PEDERSEN L. (1982). Metabolic events in infants of diabetic mothers during first 24 hours after birth. I: Changes in plasma glucose, insulin and glucagon. *Acta paediatr. Scand* **.71**:19-25.

KURTS C., MILLER JFAP., SUBRAMANIAN RM., CARBONNE FR., HEATH WR. (1998). Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigen and those released during cellular destruction. *J. Exp. Med.* **188**: 409-414.

KWON B., YOUN BS., KWON B. (1999). Functions of newly identified members of the tumor necrosis factor receptor/ligand superfamilies in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* **11**: 340-345.

LANDON MB., OSEI K., PLATT M., O'DORISIO T., SAMUELS P GABBE SG. (1994). The differential effects of body fat distribution on insulin and glucose metabolism during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **171**:875-884.

LAPOLLA A., SANSARI M., MARINI S., FLORIANI F., PIVA I., ERLE G., FEDELE DA. (1997). Study on lymphocyte subpopulations in diabetic pregnant women and their newborns. *Ann Ist Super Sanita.* **33**: 429-432.

LAPOLLA A., SANZARI MC., ZNACANARO F., MASIN M., GUERRIERO A., PIVA I., TONIATO R., ERLE G., PLEBANI M., FEDELE D. (1999). Study on lymphocyte subpopulation in diabetic mothers at delivery and in their newborns. *Diabetes. Nutr Metab.* **12**: 394-399.

LAUTALA P., PUUKKA R., KNIP M., PERKKILA L., PUUKKA M. (1988). Postnatal decrease in insulin binding to erythrocytes in infants of diabetic mothers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **66**:696-701.

LEBOVITZ HE. (1984). Etiology and pathogenesis of diabetes mellitus. *Pediatr. Clin. North. Am.* **31** : 521-530.

LECERF JM. (1998). Les lipides alimentaires : definition, classification, nomenclature, mesure indirecte dans les tissus biologiques *.Act. Med. Int. Métabolismes- Hormones-Nutrition.* **2** : 6-7.

LECERF JM. (2000). Acides gras essentiels. *Encycl. Med. Chir. Edition Scientifique et Médicales Elsevier SAS, Paris Endocrinologie Nutrition.* **10-542-F-10.**

LEE K., AMANO K., YOON JW. (1988). Evidence for initial involvement of macrophages in development of insulinitis in NOD mice. *Diabetes.* **37**: 197-199.

LEE K., PAK C., AMANO K., YOON JW. (1988). Prevention of lymphocytic thyroiditis and insulinitis in diabetes prone BB rats by the deletion of macrophages. *Diabetes.* **31**: 400-402.

LEGER CL., CHRISTON R., VIRET J., DAVELOOSE D., MITJAVILA s., EVEN V., (1989). Nutrition and biomembranes: Additional information concerning the incidence of dietary polyunsaturated fatty acids on membrane organization and biological activity. *Biochimie.* **71**: 159-165.

LETY MA., COULAUD J., DARDENNE M., HOMO-DELARCHE F. (1992). Enhanced metabolism of arachidonic acid by macrophages from non-obese diabetic mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **64**: 188-196.

LI W., LOPIS J., WHITNEY M., ZLOKARNIK G., TSEIN RY. (1998). cell-permanent cages InsP3 ester shown that Ca<sup>2+</sup> spike frequency can optimize gene expression. *Nature*. **392**: 936-941.

LICHTENSTEIN AH., KENNEDY E., BARRIER P. (1998). Dietary fatty consumption and health. *Nutr. Rev.* **56**, 3- 19

LIGHT IJ., SUTHERLAND JM., LOGGIE JM. (1967). Impaired epinephrine release in hypoglycaemic infants of diabetic mothers. *N. Engl. J. Med.* **277**:394-398.

LO D., REILLY C., SCOTT B., LIBLAU R., MCDEVITT H., BURKLY L. (1993). Antigen-presenting cells in adoptively transferred spontaneous autoimmune diabetes. *Eur. J. Immunol.* **23**: 1693-1698.

LOCNISKAR M., NAUSS KM., NEWBERNE PM. (1983). The effect of quality of dietary fat on the immune system. *J. Nutr.* **113**: 951-961.

MANDRUP- POULSEN T., BENDTZEN K., NIELSEN JH., BENEDIXEN G., NERUP J. (1985). Cytokines cause functional and structural damage to isolated islet of Langerhans. *Allegy*. **40**: 424-429.

MARRACK P, KAPPLER JW. (1993). How the immune system recognizes the body. *Sci Am*; **269**(3): 80-83, 86-89.

MATSUE H., EDELBAUM D., HARTMANN A., MORITA A., BREGSTRESSER P., YAGITA H., OKUMURA K., TAKASHIMA A. (1999). Dendritic cells undergo rapid apoptosis in vitro during antigen -specific interaction with CD4<sup>+</sup> T cells .*T. Immunol.* **19**: 223-230.

MAYSER P., GRIMM H., GRIMMINGER F. (2002). N-3 fatty acids in psoriasis. *Br J Nutr*, **87 Suppl 1**, S77-82.

MC CANCE DR., PETTIT DJ., HANSON RL., JACOBSON LTH., BENNETT PH., KNOWLER WC. (1994) Glucose, insulin concentrations and obesity in childhood and adolescence as predictors of NIDDM. *Diabetologia*. **37**: 617-623.

MC CANCE RA., WIDDOWSON EM. (1974). The determinants of growth and form. *Proc. R. Soc. Lond. Biol.* **185**: 1-17.

MC CARTY MF. (1999). Interleukin-6 as a central mediator of cardiovascular risk associated with chronic inflammation, smoking, diabetes and visceral obesity: down regulation with essential fatty acids, ethanol and pentoxifylline. *Med. Hypotheses.* **52**: 465-477.

MERRIL JE., MOHLSTORM C., UITTENBOGAART C., KERMANI-ARAB V., ELISSON GW., MYERS LW. (1984). Response and production of interleukin-2 by peripheral blood and cerebrospinal fluid lymphocytes of patients with multiple sclerosis. *J Immunol.* **133**: 1931.

MERZOUK H., BOUCHENAK M., LOUKIDI B., MADANI S., PROST J., BELLEVILLE J. (2000). Fetal macrosomia related to maternal poorly controlled type 1 diabetes strongly impairs serum lipoprotein concentrations and composition. *J. Clin. Pathol.* **53** (12): 917- 923.

MERZOUK H., MADANI S., CHABANE SARI D., PROST J., BOUCHENAK M., BELLEVILLE J. (2000). Time course of changes in serum glucose, insulin, lipids and tissue lipase activities in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci (Lond)*. **98**(1): 21-30.

MERZOUK H., MADANI S., PROST J., LOUKIDI B., MEGHELLI-BOUCHENAK M., BELLEVILLE J. (1999). Changes in serum lipid and lipoprotein concentrations and compositions at birth and after 1 month of life in macrosomic infants of insulin-dependent diabetic mothers. *Eur J Pediatr.* **158**(9):750-756.

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

MERZOUK H., MADANI S., BOUALGA A., PROST J., BOUCHENAK M., BELLEVILLE J. (2001). Age-related changes in cholesterol metabolism in

macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes. *J. Lipid. Res.* **42** (7): 1152-1159.

MERZOUK H., MADANI S., HICHAMI A., PROST J., BELLEVILLE J., KHAN NA. (2002). Impaired lipoprotein metabolism in obese offspring of streptozotocin-induced diabetic rats. *Lipids.* **37**(8): 73-81

MILES EA., CALDER PC. (1998). Modulation of immune functions by dietary fatty acids. *Proc. Nut. Soc.* **57**:277-292.

MILNER RDG., ASHWORTH MA., BARSON AJ. (1972). Insulin release from human fetal pancreas in response to glucose, leucine and arginine. *J. Endocrinol.* **52**:494-505.

MOLLARD RC., KOVACS HR., FITZPATRICK-WONG SC., WEILER HA. (2005). Low levels of dietary arachidonic and docosahexaenoic acids improve bone mass in neonatal piglets, but higher levels provide no benefit. *J. Nutr.* **135** (3): 505-512.

MOLVIG J., POCIOTF., WORSAAE H., WOGENSEN LD., BAEK L., CHRISTENSEN P., MANDROUP-POULSON T., ANDERSON K., MASDEN P., DYERBEG J. (1991). Dietary supplementation with omega-3-polyunsaturated fatty acids decreases mononuclear cell proliferation and interleukin-1 beta content but not monokine secretion in healthy and insulin-dependent diabetic individuals. *Scand. J. Immunol.* **34**: 399-410.

MONTELONGO A., LASUNCION MA., PALLARDO LF., HERRERA E. (1992). Longitudinal study of plasma lipoproteins and hormones during pregnancy in normal and diabetic women. *Diabetes.* **41**:1651-1659.

NAGATA M., YOON JW. (1992). Studies on autoimmunity for initiation of beta cell destruction: IX. Electron microscopic evidence on a distinct difference in the destruction of beta cells between CD4+ and CD8+ T cell clones derived from lymphocytes infiltrating the islets of NOD mice. *Diabetes.* **39**: 998-1008.

NASSAR BA., HUANG Y.S., MANKU MS., DAS UN., MORSE N., HORROBIN DF. (1986). The influence of dietary manipulation with n-3 and n-6 fatty acids on liver and plasma phospholipid fatty acids in rats. *Lipids*. 21,652-656.

NIELSEN NH., HANSEN JP. (1980). Breast cancer in Greenland—selected epidemiological, clinical, and histological features. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol*, 98: 287-299.

NOSSAL G. (1993). La vie, la mort et le système immunitaire. Ed. *Pour la science N°193*. Université de Melbourne. P 30-32.

O'BRIEN BA., HARMON BV., CAMERON DP., ALLAN DJ. (1997). Apoptosis is the mode of B- cell death responsible for the development of IDDM in the nonobese diabetic (NOD) mouse. *Diabetes*. 46: 750-757.

OGATA ES., FRIENKEL N., METZGER BE., PHELPS RL., DEPP R., BOEHM JJ., DOOLEY SL. (1980). Perinatal islet function in gestational diabetes: Assessment by cord plasma C-peptide and amniotic fluid insulin. *Diabetes. Care*. 3:425-429.

OH W., Gelardi N L., Cha CJ. (1988). Maternal hyperglycaemia in pregnant rats: its effects on growth and carbohydrates metabolism in the offspring. *Metab. clin. Exp*. 37: 1146- 1151

OKITA M., YOSHIDA S., YAMAMOTO J., SUZUKI K., KANEYUKI T., KUBOTA M. SASAGAWA T. (1995) n-3 and n-6 fatty acid intake and serum phospholipid fatty acid composition in middle-aged women living in rural and urban areas in Okayama Prefecture. *J. Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo)*, 41, 313-323

OLEFSKY JM. (1977). Mechanism of decreased insulin responsiveness of large adipocytes. *Endocrinology*. 100: 1169-1177.

PANKEWYCZ OG., GUAN JX., BENEDICT JF. (1995). Cytokines as mediators of autoimmune diabetes and diabetic complications. *Endocrine. Rev*. 16: 164-176.

PEDERSEN J., OSLER M. (1961) Hyperglycemia as the cause of characteristic features on the fetus and newborn of diabetic mothers. *Dan. Med. Bull*. 8: 78-83.

PEDERSEN O., BECK-NIELSEN H., KLEBE JG. (1981). Insulin receptors in the pregnant diabetic and her newborn. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **53**: 1160-1169.

PERSSON B., GENTZ J. (1986). The pattern of blood lipids, glycerol and ketonbodies during the neonatal period, infancy and childhood. *Acta. Paediatr. Scand.* **55**: 352-362

PETERSEN SL., RUSSELL CA., BENDTZEN K., VINDELOV LL. (2002). Optimisation of the CT h4S bioassay for detection of human interleukin-4 secreted by mononuclear cells stimulated by phytohaemagglutinin or by human leukocyte antigen mismatched mixed lymphocyte culture. *Immunol Lett.* **84**: 29-39.

PETERSON EM., JOVANOVIC-PETERSON L., MILLS JL. (1992). The diabetes in early pregnancy study: Changes in cholesterol, triglycerides, body weight, and blood pressure. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **166**: 513-520.

PETERSON JL., PETERSON CM., REED GF., METZGER BE., MILLS JL., KNOPP RH., AARONS JH. (1991). Maternal post prandial glucose levels and infant birth weight: The diabetes in early pregnancy study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **164**:103-111.

PETERSON LD., VANDERKEUR M., DE VRIES RR., ROEP BO. (1999). Autoreactive and immunoregulatory T cell subsets in insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes.* **33**: 552- 555

PETTITT DJ., BAIRD HR., ALECK KA., BENNETT PH., KNOWLER WC. (1983). Excessive obesity in offspring of prima Indian women with diabetes during pregnancy. *N. Engl. J. Med.* **308**:242-245.

PETTITT DJ., BENNET PH., SAAD MF., CHARLES MA., NELSON RG., KNOWLER WC. (1991). Abnormal glucose tolerance during pregnancy in Prima Indian women; long term effects on offspring. *Diabetes.* **40** (suppl 2):126-130.

PICON L. (1967). Effect of insulin on growth and biochemical composition of the rat fetus. *Endocrinology.* **81**:1419-1426.

PLAGEMANN A., HARDER T., KOHLHOFF R., ROHDE W., DORNER G. (1997). Glucose tolerance and insulin secretion in children of mothers with pregestational IDDM or gestational diabetes. *Diabetologia*. **40**:1094-1100

POISSON JP. (1991). Métabolisme des acides gras essentiels. *Alimentation et Nutrition dans les pays en développement ; 4<sup>ème</sup> Journée Internationale du GERM*. PP 464-476.

PRIBYLOVA H., DVORAKOVA L. (1996). Long-term prognosis of infants of diabetic mothers. Relationship between metabolic disorders in newborns and adult offspring. *Acta Diabetol*. **33**, 30-34

PRICHARD BN., SMITH CC., LING KL., BETTERIDGE DJ. (1995). Fish oils and cardiovascular disease. *Bmj*. **310**: 819-820.

PROIETTO J., FILLIPIS A., NAKHLA C., CLARCK S. (1999). Nutrient induced insulin resistance. *Molecular and cellular Endocrinology*. **151**: 143-149.

PURDY LP., SILVERMAN BL., METZGER BE. (1996). Long-term follow-up of offspring of type I diabetic mothers: Status in adolescence. *Diabetes (Abs)*. **45** (suppl 2): 205.

PUTNEY JW JR. (1997) Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and capacitative calcium entry. *Cell Calcium*. **21**(3):257-261.

RABINOVITCH. (1999). Cytokines in the pathogenesis of type I diabetes. *Can J. Diabetes Care* . **23**: 40-51

RABINOVITCH. (1999). Dietary marine lipids modify autoimmune disease. *Academic Press Inc*. 247-259.

REAVEN GM. (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. **37**: 1595-1607.

REECE EA., HAGAY Z., HOBBS JC. (1991). Insulin-independent diabetes mellitus and immunogenetics: maternal and foetal consideration. *Obstet Gyneco Surv*. **46**: 255-263.



RENAUD S., DELORGERIL M., DELAYE J., GUIDOLLET J., JACQUARD F., MARTIN JL., TOUBOL P. (1995). Cretan mediterranean diet for prevention of coronary heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **61**: S1360- S1367.

RICHARDSON D., CZECH MP. (1978). Primary role of decreased fatty acid synthesis in insulin resistance of large rat adipocytes. *Am. J. Physiol.* **234**: 182-189.

RIDGE F., DI ROSA F., MATZINGER P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CDA+ T-helper cell and a T-killer cell. *Nature.* **393**: 474-478.

ROBERST TL., KATO H., GORDON T., KAGAN A., RHOADS G., LAND CE., WORTH RM., BELSKEY JL., DOCK DS., MYANASHI M., KAWAMOTO S. (1998). Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California. Coronary heart disease risk factors in Japan and Hawaii. *Am. J. Cardiol.* **39**: 224-250.

RODER JC., KLEIN M. (1979). Target-effector interaction in the natural killer cell system. IV. Modulation by cyclic nucleotides. *J. Immunol.* **123**: 2785-2789.

ROITT IM. (1991). Essential immunology. Blackwell scientific publicat. Ed. *Pour la science.* N°193. P.30-31.

ROLL U., SCHEESER J., STANDL E., ZIEGLER AG. (1994). Alterations of lymphocytes subsets in children of diabetic mothers. *Diabetologia.* **37**: 1132-1141.

ROSE DP., RAYBURN J., HATALA MA., CONNOLLY JM. (1994). Effect of dietary fish oil on fatty acids and eicosanoids in metastasing human breast cancer cells. *Nutr cancer.* **22** (2): 131-141.

ROSE N., MACKAY I. (1992). The auto immune diseases. Academic press. Ed. *Pour la science* N°193 P.38-39.

ROSSENEU M., VAN BIERVLIET JP., VINAMOINT N. (1983). Isolation and characterization of lipoprotein profiles in newborns by density gradient ultracentrifugation. *Pediatr. Res.* **17**: 788-794.

ROSSINI AA., GREINER DL., FREIDMAN HP., MORDES JP. (1993). Immunopathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes. rev.* 1: 43-75.

ROTHER H., FAUST A., SCHADE U., KLEEMAN R., BOSSE G., HIBINO T. (1994). Cyclophosphamide treatment of female non-obese diabetic mice causes enhanced expression of inducible nitric oxide synthase and interferon- gamma, but not for interleukin-4. *Diabetologia.* 37:1154-1158.

ROTONDO D., EARL CR., LAING KJ., KAIMAKAMIS D. (1994) Inhibition of cytokine-stimulated thymic lymphocyte proliferation by fatty acids: the role of eicosanoids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1223, 185-194.

SANCHEZ-MUNIZ FJ., BASTIDA S., VIEJO JM., TERPSTRA AH. (1999). Small supplements of N-3 fatty acids change serum low density lipoprotein composition by decreasing phospholipid and apolipoprotein B concentrations in young adult women. *Eur. J. Nutr.* 38: 20-27.

SANDERS TAB., SULLIVAN DR., REEVE J., SAMPSON GR. (1985). Triglyceride lowering effect of marine polyunsaturated in patients with hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis.* 5, 459-465

SANDLER S., BENDTZEN K., EIZIRIK DL., WELSH M. (1990). Interleukin-6 affects insulin secretion and glucose metabolism of rat pancreatic islets in vitro. *Endocrinol.* 126: 1288-1294.

SANDLER S., EIZIRIK DL., SVENSON C., STRANDELL E., WELSH M., WELSH N. (1991). Biochemical and molecular actions of interleukin-1 on pancreatic  $\beta$ -Cells. *Autoimmunity.* 10:241-253.

SCHWARTZ R., TERAMO KA. (2000). Effects of diabetic pregnancy on the foetus and newborn. *Seminars. Perinatol.*, 24, 120-135.

SEMP P., BEDOSSA P., RICHARD MF., VILLA MC., BACH JF., BOITARD C. (1991). Anti- alpha/beta T cell receptor monoclonal antibody provides an efficient therapy for autoimmune diabetes mellitus in NOD mice. *Eur. J. immunol.* 21: 1163-1169.

SERREZE D., LEITER E., CHRISTTIANSON G., GREINER D., ROOPENIAN D. (1994). Major histocompatibility complex class-I deficient NOD. *beta1m<sup>nu/nu</sup>* mice are diabetes and insulinitis resistant. *Diabetes* **43**: 500-504.

SERREZE DV., HAMAGUCHI K., LEITER EH. (1989). Immunostimulation circumvents diabetes on NOD/Lt mice. *J. Autoimmun.* **2**: 759-776.

SHAEFER EJ., FOSTER DM., ZECH LA., LINDGREN FT., BREWER HB., LEVY RI. (1983). The effects of estrogen administration on plasma lipoprotein metabolism in premenopausal females. *J. Clin. Endocr. Metab.* **57**: 262- 267.

SHAFRIR E., BARASH V. (1987). Placental function in maternal-fetal fat transport in diabetes. *Biol. Neonate.* **51**: 102-112.

SIMMONS D. (1994). Differences in umbilical cord insulin and birth weight in non-diabetic pregnancies of women from different ethnic groups in New Zealand. *Diabetologia.* **37**:930-936.

SINGH B., LAUZON J., VENKATRAMAN J., THOMSON ABR., RAJOTTE V., CLANDININ MT. (1988). Effect of high/low dietary linoleic acid levels on the function and fatty composition of T-lymphocytes of normal and diabetic rats. *Diabetes research.* **?**: 129-134

SIVERMAN BL., METZGER BE., CHO NH., LOEB CA. (1995). Impaired glucose tolerance in adolescent offspring of diabetic mothers. *Diabetes. care.* **18**: 611-617.

SMALL M., CAMERON A., LUNAN CB., MACCUISH AC. (1987). Macrosomia in pregnancy complicated by insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes. Care.* **10**: 594- 599.

SMIT MJ., TEMMERMAN AM., WOLTERS H., KUIPERS F., BEYNEN AC., VONK RJ. (1991). Dietary fish oil-induced changes in intrahepatic cholesterol transport and bile acid synthesis in rats. *J. Clin. Invest.* **88**: 943-51

SMITH KA. (1988). Interleukin- 2: inception, impact and implications. *Science.* **240** :1169-1179.

SOMOZA N., VARGAS F., ROURA-MIR C., VIVES -PI M., FERNANDEZ - FIGUERAS M.T., ARIZA A. (1994). Pancreas in recent onset insulin -dependent diabetes mellitus: Changes in HLA, adhesion molecules and auto- antigens restricted T receptor V $\beta$  usage, and cytokine profile. *J. Immunol.* **153**: 1360-1372.

SOYLAND E., NENSETER MS., BRAATHEN L., DREVON CA. (1993) Very long chain n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids inhibit proliferation of human T-lymphocytes in vitro. *Eur. J. Clin. Invest.* **23**: 112-121.

SPECTOR AA., GORDON JA., MOORE SA. (1988). Hydroxeicosatetreanoic acids (HETES). *Prog. Lipid.Res.* **27**: 271-323.

STAMPFER MJ., HU FB., MANSON JE., RIMM EB., WILLET WC. 2000. Primary prevention of coronary heart disease in women through diet and life style. *N .Engl. J. Med.* **343**: 16-22.

STANNER SA., BULMER K., ANDRES C., LANTSEVA OE., BORODINA V., POTEEN W., YUDKIN JS. (1997). Does malnutrition in utero determine diabetes and coronary heart disease in adulthood? Results from the Leningrad siege study, a cross sectional study. *Br. Med. J.* **315**: 1342-1348.

STENTZ FB., KITABCHI AE. (2003). Activated T lymphocytes in Type 2 diabetes: implications from in vitro studies. *Curr. Drug. Targets.* **6**: 493-503.

STEVENSON DK., HOPPER AD., COHEN RS., BUCALO LR., KRENER JA. (1982). Macrosomia: Causes and consequences. *J. Pediat.* **100**: 515-520.

STORLIEN LH., JENKINS AB., CHRISHOLM DJ., PASCOE WS., JHOURI S., KRAEGEN EW. (1991). Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. *Diabetes.* **40**:280-289

STORLIEN LH., KRAEGEN EW., CHISHOLM DJ., FORD GL., BRUCE DG., PASCOE WS. (1987). Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats. *Science.* **237**:885-8

STULING TM., BERGER M., RODEN M., STINGL H., RAEDERSTORFF D., WALHAUSL W. (2000). Elevated serum free fatty acid concentration inhibit T lymphocyte signalling. *J Faseb.* **14**:939-947.

STULING TM., BERGER M., SIGMUND T., RAEDERSTORFF D., STOCKINGER H., WALHAUSL W. (1998). Polyunsaturated fatty acids inhibit T cell signal transduction by modification of detergent-insoluble membrane domains. *J. Cell. Biology.* **143**:637-644.

SUMIDA C., VALLETTE G., NUNEZ EA. (1993). Interaction of unsaturated fatty acids with rat liver glucocorticoid receptors: studies to localize the site of interaction. *Acta. Endocrinol.* **129** (4):348-355.

SUSA JB., NEAVE C., SEHGAL P., ZELLER WP., SCHWARTZ R. (1984). Chronic hyperinsulinemia in the fetal rhesus monkey: Effects of physiologic hyperinsulinemia on fetal growth and composition. *Diabetes.* **33**:656-660.

SUSA JB., SCHWARTZ R. (1985). Effects of hyperinsulinemia in the primate fetus. *Diabetes.* **34**: 36-41.

TASKINEN MR., NIKKILA EA. (1977). Lipoprotein lipase activity in adipose tissue and in postheparin plasma in human obesity. *Acta Med. Scand.* **202**: 399-408.

TCHORZEWSKI H., GLOWACKA E., BANASIK M., LEWKOWICZ P., SZALAPSKA M., ZAWODNIAK M. (2001). Activated T lymphocytes from patients with high risk of type 1 diabetes mellitus have different ability to produce interferon  $\gamma$ , Interleukin-6 and interleukin-10 and undergo anti CD958 induced apoptosis after insulin stimulation. *Immunology letters.* 225-234.

THASTRUP O., TAKEMURA H., OHSHIKA H., YOKOSAWA N., OGUMA K. (1991). The thapsigargin-sensitive intracellular  $Ca^{2+}$  pool is more important in plasma membrane  $Ca^{2+}$  entry than the IP3-sensitive intracellular  $Ca^{2+}$  pool in neuronal cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* **180**(3): 1518-1526.

- THIVOLET C., BENDELAC A., BEDOSSA P., BACH J.F., CARNAUD C. (1991). CD8+T cell homing to the pancreas in the nonobese diabetic mouse is CD4+T cell-dependent. *J Immunol.* **146**:85-88.
- TISCH R., MC DEVITT H. (1996). Insulin- dependent diabetes mellitus *Cell.* **85**: 291-297.
- TOMKIN GH., OWENS D. (1994). Insulin and lipoprotein metabolism with special reference to the diabetic state. *Diabetes Metab. Rev.* **10**: 225-252.
- TRIBOULOT C., HICHAMI A., DENYS A., KHAN NA. (2001). Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids exert antihypertensive effects by modulating calcium signalling in T cells of rats. *American Society for Nutritional Sciences.* 2364-2369.
- TRICHOPOULOU A., LAGIOU P., KUPER H., TRICHOPOULOS D. (2000). Cancer and Mediterranean dietary traditions. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev.* **9**: 869-73.
- TSIEN RY., POZZAN T. (1989). Measurement of cytosolic free Ca<sup>2+</sup> with Quin-2. *Methods in Enzymol.* **172**: 230-262.
- UNUAUE ER. (1984). Antigen- presenting function of the macrophage. *Ann. Rev. Immunol.* **2**: 395-428.
- UNUAUE ER., ALLEN PM. (1987). The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science.* **236**:551-557.
- VILEISIS RA., OH W. (1983) Enhanced fatty acid synthesis in hyperinsulinemic rat fetuses. *J. Nutr.* **113**: 246-252.
- VOHR BR., LIPSITT LP., OH W. (1980). Somatic growth of children of diabetic mothers with reference to birth size. *J. Pediatr.* **97**:196-199.
- VOLKER D., FITZGERALD P., MAJOR G., GARG M. (2000). Efficacy of fish oil concentrate in the treatment of rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **27**: 2343-6.

VOSS A., REINHART M., SANKARAPPA S., SPRECHER H. (1991). The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. *J. Biol. Chem.* 266(30): 19995-20000.

WEIGENT DA., BLALOCK JE. (1989). Structural and functional relationship between the immune and neuroendocrine systems. *Bull. Inst. Past.* 87: 61-92.

WEINSTEIN I., SOLER-ARGILAGA C., WERNER HV., HEIMBERG M. (1979). Effects of ethynylloestradiol on metabolism of ( $^{1-14}\text{C}$ )-oleate by perfused livers and hepatocytes from female rats. *Biochem. J.* 180: 265-266.

WESLEY A. (1998). Immunonutrition: The role of n-3 fatty acids. *Science (Washington D.C.)* 14: 627-633.

WICKER LS., LEITER EH., TODD JA., RENJILIAN RJ., PETERSON E., FISHER PA. (1994).  $\beta$ 2-microglobuline – deficient NOD mice do not develop insulinitis or diabetes. *Diabetes.* 43: 500-504.

WILLETT WC., STAMPFER MJ., COLDITZ GA., ROSNER BA., SPEIZER FE (1990). Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N. Engl. J. Med.* 323: 1664-1672.

WOGENSEN L., LEE M., SARVETNIK N. (1994). Production of interleukin-10 by islet cells accelerates immune-mediated destruction of  $\beta$  cells in nonobese diabetic mice. *J. Exp. Med.* 179: 1379-1384.

WOLF RE., BRELSFORD WG. (1988). Soluble Interleukin -2 receptors in systemic lupus erythematosus. *Arthritis. Rheum.* 31: 729.

WONG S., REARDON M., NESTEL P. (1985) Reduced triglyceride formation from long-chain polyenoic fatty acids in rat hepatocytes. *Metabolism.* 34 :900-905

YAGI H., MATSUMOTO M., KUNIMOTO K., KAWAGUCHI J., MAKINO S., HARADA M. (1992). Analysis of the roles of CD4+ and CD8+ T cells in autoimmune diabetes of

NOD mice using transfer to NOD athymic nude mice. *Eur. J. Immunol.* **22**: 2387-2393.

YAQOOB P., CALDER PC. (1993). The effects of fatty acids on lymphocyte functions. *Int. J. Biochem.* **25**, 1705-1714.

YAQOOB P., CALDER PC. (1995). Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cell. Immunol.* **163**: 120-128.

YAQOOB P., NEWSHOLME EA., CALDER PC. (1995). Influence of cell culture conditions on diet induced changes in lymphocyte fatty acid composition. *Biochem Biophys Acta.* **1255(3)**: 333-340.

YOON J., YOON C., LIM H., HUANG Q., KANG Y., PYUN K., HIRASAWA K., SHEWIN R., JUN H. (1999). Control of autoimmune diabetes in NOD mice by GAD expression or suppression in beta cells. *Science.* **284**: 1 183-1 187.

YOON JW. (1995). A new look at viruses in type I diabetes (Invited Review). *Diabetes Metab Rev.* **11**: 83-107.

YOON JW. (1996). The role of viruses in the pathogenesis of IDDM. In: Taylor SL. ed. *Diabetes mellitus: A Fundamental and Clinical Text.* Philadelphia: JB Lippincott. 338-348.

YOON JW., JUN HS., SANTAMARIA P. (1997). Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of  $\beta$  cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells. *Autoimmunity.* Vol. **27**: 109-122.

ZEYDA M., STAFFLER G., HOREJSI V., WALDHAUSL W., STULING TM. (2002). LAT displacement from lipid rafts as a molecular mechanism for the inhibition of T cell signalling by polyunsaturated fatty acids. *J Biological Chemistry.* **32**: 28418-28423.



ZIEGLER AG., ERHARD J., LAMPETER EF., NAGELKERKEN LM., STANDL E.  
(1992). Involvement of dendritic cells in early insulinitis of BB rats. *J. Autoimmun.* **5**:  
571-579.



Incuber la plaque 1h à 37°C

7. Faire 3 lavages (à la pissette) de 3 à 5 min.
8. Incuber avec le second anticorps (anti IgG de cobaye marqué à la peroxydase) 100 µl d'anti-IgG dilué 1/2000 dans Ts dans tous les puits sauf lignes D et H.

Incuber la plaque 45 min à 37°C à l'abri de la lumière.

9. Faire 3 lavages (à la pissette) de 3 à 5 min.
10. Révélation enzymatique, ajouter 100 µl d'OPD dans tous les puits, sauf lignes D et H, attendre 15 min à l'obscurité.
11. Arrêt de la réaction par 50 µl d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 M/l
12. Lecture de la plaque avec un filtre à 492 nm, ou bien transférer 100 µl dans une micro cuve, ajouter 900 µl d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.6 M/L et lire au spectromètre à 492 nm. Utiliser la colonne 1 pour faire le 0 de lecture.

### Solutions

#### Tampon d'homogénéisation (Th)

NaCl	150 mM	PM=58.44	8.766 g/L
CaCl <sub>2</sub>	1 mM	PM=147.44 (2H <sub>2</sub> O)	1.474 g/L
TrisHCL	10mM	PM=121.14	12.114 g/L
pH 7.5	qsp 1L		

#### Tampon d'incubation (Ti)

HEPES	30 mM	PM=260.3	7.809 g/L
NaCl	80 mM	PM=58.44	4.675 g/L
OVA ou BSA			2 g/L
MgCl <sub>2</sub>	2mM	PM=95.21 (anhydre)	0.190 g/L
Triton X 100			
N-acétyl-D-glucosamine	60 mM	PM=221.2	13.27 g/L
pH 7.6	qsp 1L		

#### Tampon carbonate (Tc)

NaHCO<sub>3</sub> 10 H<sub>2</sub>O 0.1 M pH 9.6

28.6 g/l ajuster pH avec NaOH 10N

#### Tampon de saturation (Ts)

Tween 20 0.1 %

OVA ou BSA 1% dans PBS

PBS = NaCl 0.15 M (8.77 g/l) dans tampon phosphate 0.01 M pH 7.4

Tampon phosphate 0.1 = PO<sub>4</sub>K<sub>2</sub>H 17.4 g/l (4volumes) et PO<sub>4</sub>KH<sub>2</sub> 13.6 g/l (1volume)

#### Solution de lavage

Tween 20 0.1 % dans PBS

Solution d'orthophénylènediamine OPD

OPD		0.4 g/l
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30V = 10.2 g/l)		0.68 g/l
Acide citrique 3.4 mM	PM=192.1	0.653 g/l
Tampon phosphate 6.6 mM	pH 5.2	
Pour 100 ml de solution, pH 5.0		
Acide citrique	0.73 g	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1.77 g	
Amener à 100 ml		
Extemporément, ajouter		
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 V	0.2 ml	
OPD	0.04 g	

## ***Extraction des lipides Totaux par la technique de FOLCH***

Description de la technique pour 1 g de tissu frais

Introduire 1g (pesée exacte) de tissu frais (découper aux ciseaux pour réduire en petits fragments) dans un tube à centrifuger de 50 ml.

Ajouter 13.3 ml de  $\text{CHCl}_3$  RP/Méthanol 1/1 V/V.

Mixer 5 à 10 secondes à grande vitesse à l'homogénéiseur (ULTRATURAX)

Ajouter 6.7 ml de  $\text{CHCl}_3$  pur (qui rincent aussi la tige de l'appareil).

Mélanger au vibreur et laisser en contact 1 à 2 heures pour dénaturer les protéines.

Ajouter 4.2 ml de KCl 0.37 M.

Homogénéiser et centrifuger à 3500 rpm pendant 5 minutes.

Il se forme 3 couches :

Une phase inférieure chloroformique enrichie en méthanol et eau ( $\text{CHCl}_3$ /méthanol/eau (86/14/1 V/V/V). Elle représente 58.5 % (14.8 ml) du volume total.

Une couche de protéines qui forme selon les échantillons un disque solide ou facilement dissociable.

Une phase supérieure hydroalcoolique; eau méthanol chloroforme 47/48/3 V/V/V qui représente 41.5 % (10,5 ml) du volume total.

Éliminer la phase supérieure par aspiration.

Ajouter 10 ml de phase supérieure (top phase eau/méthanol/ $\text{CHCl}_3$  47/48/3 V/V/V) pour éliminer l'eau et les produits hydrophiles.

Homogénéiser et centrifuger dans les mêmes conditions que précédemment.

Éliminer la phase supérieure et recommencer une 2<sup>ème</sup> fois.

L'extrait chloroformique (phase inférieure) est conservé.

**NB.** Une variation de  $\pm 40\%$  du poids de l'échantillon modifie de 0.5 % le volume final de la phase chloroformique.

## Détermination de l'urée

### Principe

Urée  $\xrightarrow{\text{uréase}}$  carbonate d'ammonium

En présence de phénol, le carbonate d'ammonium est oxydé par l'hypochlorite de Na : Réaction de Berthelot qui donne une coloration bleue. Par addition de nitroprussiate de Na, l'intensité de la réaction est fortement augmentée.

### Réactifs

1. Suspension d'urée 3.5 KU/L
2. Solution étalon d'urée 400 mg/l (6.66 mM)
3. Réactif au phénol 150 mM phénol + 0.47 mM nitroprussiate de Na
4. Réactif à l'hypochlorite 13 mM NaCl + 130 mM NaOH

### Mode opératoire

Dans 3 tubes à essais, pipeter :

	<i>Echantillon</i>	<i>Etalon</i>	<i>Essai à blanc</i>
Uréase	0.2	0.2	0.2
Etalon		0.02	
Sérum ou urine dilués 1/100	0.02		
Mélanger couvrir les tubes et attendre 30 minutes à température ambiante ou 15 minutes à 37°C			
Réactif 3	5	5	5
Réactif 4	5	5	5

Mélanger et laisser reposer 30 minutes à température ambiante ou 15 minutes à 37°C

Lire la DO à 620 nm des échantillons et de l'étalon par rapport à l'essai à blanc.

### Calcul

$$C = DO_{\text{éch}} \times \frac{400}{DO_E} \quad \text{en mg/l} \quad \text{ou} \quad C = DO_{\text{éch}} \times \frac{6.66}{DO_E} \quad \text{en mM/l}$$

## Dosage de l'azote total (méthode Nessler)

### Minéralisation

Peser 10 mg (environ, mais exactement) de fèces

Prélever 0.1 ml d'urine diluée 1/100

Introduire les prélèvements dans des matras (3 pts/éch.)

Ajouter 0.3 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> RP

Chauffer sur la rampe jusqu'à l'apparition de fumées blanches (procéder de la même manière que pour les minéralisations de phosphore, laisser fumer 2 h, refroidir

Ajouter dans chaque matras 1.8 ml NaOH 20 % + 7.9 ml d'eau.

Laisser refroidir 1 h à 1h30

### Réactifs

#### Réactifs de Nessler

5g KI + 7g HgI<sub>2</sub> sont broyés dans un mortier en Agathe puis dissous dans 5 ml d'eau.

2.4 g de gomme arabique est broyé au mortier puis dissous dans 1 peu d'eau.

On laisse reposer 1 nuit, puis on filtre, sur papier KI et HgI<sub>2</sub> et sur verre fritté la gomme arabique. On mélange les 2 solutions et on complète à 1.5 l.

### Etalonnage

On place au dessiccateur SO<sub>4</sub> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Faire le vide pendant 8 jours, 132 mg correspondent à 28 mg d'azote, 47.1 mg à 10 mg d'N<sub>2</sub>.

Peser 47.1 mg de sulfate d'ammonium parfaitement sec et dissoudre dans 100 ml d'eau (solution à 10 µg d'azote/ml).

Sol 10 µg d'N <sub>2</sub>	0.2	0.5	0.7	1	2	3	4	5
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
NaOH 20%	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
H <sub>2</sub> O qsp 10ml	7.7	7.4	7.2	6.9	5.9	4.9	3.9	2.9
Concentration µg d'N <sub>2</sub> /ml	2	5	7	10	20	30	40	50

### Coloration

Ne pas oublier de préparer un essai à blanc (0.3 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 1.8 ml NaOH 20% qsp 10 ml H<sub>2</sub>O)

Dans chaque matras ajouter

3 ml de réactif de Nessler

1.2 ml de NaOH 20 %

5.8 ml d'eau

Lire après 10 minutes à 430 nm (5 à 10 µg) 500 (10 à 50 µg).

Ne colorer qu'un seul échantillon, si la coloration est trop forte, prélever 1 ml de l'échantillon total en ajoutant 0.3 ml d'acide, 1.8 de soude qsp 10 ml avec d'eau attendre 1h30 puis faire la coloration.

## RESUME

Le but de ce travail est d'étudier l'effet in vivo d'un régime enrichi en ester d'acide eicosapentaénoïque (EPA) et d'acide docosapentaénoïque (DHA) sur le métabolisme des lipides, la prolifération cellulaire, la sécrétion d'interleukine (IL<sub>2</sub>), la composition en acide gras des phospholipides membranaires et l'homéostasie calcique des splénocytes T des nouveaux nés obèses de mère diabétiques. Tous ces paramètres sont déterminés chez deux populations de nouveaux nés obèses (J30 et J90) nés de mères diabétiques et sont comparés dans chaque cas à celles obtenues chez des nouveaux nés témoins de mères normales.

L'utilisation d'un modèle animal, le nouveau né obèse de ratte rendue diabétique par la STZ a permis de mieux cerner les conséquences de l'obésité pour les rats après un mois de vie post natale et la durée de ces effets à long terme.

A J12 et J21 de la gestation et un mois après gestation, les mères diabétiques sous régime ISIO présente des teneurs sériques élevés en triglycérides (TG), cholestérol total (CT) et (IL<sub>2</sub>), tandis que celle les tests de transformation lymphoblastiques (TTL) révèlent une réduction de la prolifération induite par la concavaline A (Con-A) des splénocytes T de rattes diabétiques nourris par le régime ISIO. et une modification de l'homéostasie calcique intra cellulaire.

On note chez les mères diabétiques nourries par le régime EPAX au cours et après la gestation, une diminution significative des teneurs sériques en TG, CT et IL<sub>2</sub>, tandis que les TTL sont plus élevés comparées aux valeurs des mères diabétiques nourries par le régime ISIO. De plus la composition en acide gras de phospholipides membranaires des splénocytes T est modifiée avec une augmentation du pourcentage du C18: 2n-6, d'EPA et de DHA et une diminution de C20: 4n-6. Le régime EPAX diminue significativement l'homéostasie calcique intracellulaire T chez les mères diabétiques au cours et après la gestation.

Les nouveaux- nés obèses de mères ISIO diabétiques montrent à la naissance, un hyperinsulinisme, une hyperglycémie, une hyperlipidémie associée à une augmentation des teneurs sériques en TG et CT, ce qui en faveur d'une stimulation de la lipogenèse in utero. Ces rats ont une croissance accélérée et un excès de tissu adipeux, qui entraîne une obésité jusqu'à 3 mois de vie. La persistance de l'obésité n'est pas liée à l'hyperphagie mais à une meilleure utilisation des nutriments et à une augmentation du stockage des lipides. Un mois après la naissance les rats obèses nourris par le régime ISIO notent une diminution de la prolifération cellulaire induite par la Con A et une augmentation de la sécrétion d'IL-2. L'homéostasie calcique intracellulaire est significativement plus élevée chez les rats obèses nourris par le régime ISIO comparés à leurs témoins.

Les teneurs en lipides, en IL<sub>2</sub>, les TTL, les pourcentages en acides gras des phospholipides membranaires des splénocytes T ainsi que l'homéostasie calcique intracellulaire chez les rats obèses nourris par le régime EPAX à l'âge de 1 mois et 3 mois sont similaires à ceux de leurs mères nourris par le même régime.

En conclusion l'obésité foetale est associée à des altérations du métabolisme des lipides et de certains paramètres immunologiques, qui peuvent prédisposer à certaines maladies métaboliques et immunologiques à l'âge adulte (diabète, obésité, athérosclérose). Nos résultats mettent aussi en évidence les effets immunosuppresseurs des acides gras polyinsaturés de la famille n - 3 exogènes, et par conséquent l'importance de leur ingestion au cours d'un diabète gestationnel ou comme prévention contre ce type de maladies

Mots clés : AGPI- Diabète- Gestation- Obésité- Lipides- Splénocyte T- [Ca<sup>2+</sup>]