

Mag - Bio - 85 / 02

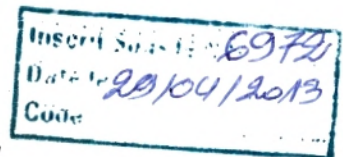
MINISTERE DE LA RECHERCHE ET L'ENSEIGNEMENT
SUPERIEUR

UNIVERSITE DE TLEMCEM ABOUBAKR BELKAID
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
MEMOIRE DE MAGISTER

En vue de l'obtention du diplôme de magister
en Biologie Moléculaire et Cellulaire

Présenté par

Mr. BENAMMAR CHAHID EL HOCINE



THEME

Détermination du statut antioxydant chez les patients diabétiques
de la région de Tlemcen

Soutenu le devant la commission d'examen

Président : Mr KHELLIL. A

Rapporteur : Mme MERZOUK. H

Examineurs : Mr CHABANE SARI .D

Mr BENMANSOUR .A

Mme BENYELLES .L

Professeur

Maître de conférence

Professeur

Maître de conférence

Chargé de cours



**MINISTERE DE LA RECHERCHE ET L'ENSEIGNEMENT
SUPERIEUR**

**UNIVERSITE DE TLEMCEM ABOUBAKR BELKAID
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
MEMOIRE DE MAGISTER**

En vue de l'obtention du diplôme de magister
en Biologie Moléculaire et Cellulaire

Présenté par

Mr. BENAMMAR CHAHID EL HOCINE

THEME

Détermination du statut antioxydant chez les patients diabétiques
de la région de Tlemcen

Soutenu le devant la commission d'examen

Président : Mr KHELLIL. A

Professeur

Rapporteur : Mme MERZOUK. H

Maître de conférence

Examineurs : Mr CHABANE SARI .D

Professeur

Mr BENMANSOUR .A

Maître de conférence

Mme BENYELLES .L

Chargé de cours

Au nom de Dieu celui qui fait miséricordes le miséricordieux

« IL NE VOUS A ETE DONNE QUE PEU DE SCIENCES »

Sourate el issraa -85-

Dédicaces

Avec l'aide de Dieu le tout puissant j'ai pu achever ce modeste travail que je dédie à :

Ma chère maman qui nous a quitté il y a quelques années que dieu ait pitié de son âme, a mon cher papa, pour leur sacrifice, et leur amour, qu'ils m'ont donné, pour leur dévouement, leur soutien, et leur longue bienveillance qu'ils m'ont prodigué sans cesse.

Ma très chère femme Faiza qui m'a aidé et soutenu dans les moments les plus difficiles, qu'elle trouve ici toute ma gratitude et mon amour.

Mes très chers enfants Benali et Zoulikha que Dieu les protège.

Toute ma famille ainsi que tous mes amis.

Remerciements

Mes remerciements sont adressés à :

Monsieur, **KHELLIL.A**, Professeur à la faculté des sciences, département de biologie (Université de Tlemcen), de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Qu'il soit assuré de ma sincère reconnaissance.

Madame, **MERZOUK.H**, Maître de conférence à la faculté des sciences, département de biologie (Université de tlemcen) qui a guidé judicieusement ces recherches, elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance pour ces conseils bienveillants, son infatigable dévouement , ces encouragements et son soutien moral.

Monsieur , **CHABANE SARI.D**, Professeur à la faculté des sciences, département de biologie (Université de Tlemcen), de l'intérêt qui a bien voulu porter à ce travail en acceptant de le juger et faire partie de ce jury .

Monsieur, **BENMANSOUR.A**, Maître de conférence à la faculté des sciences, département de biologie (Université de Tlemcen), qui a bien voulu s'intéresser à ce travail et le juger. Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

Madame, **BENYELLES.L**, Chargé de cours à la faculté des sciences, département de biologie (Université de Tlemcen) pour l'honneur qu'elle m'a fait d'accepter de prendre connaissance et de juger ce travail.

Monsieur, **KHAN.N**, Professeur à la faculté des sciences de Dijon (France) et monsieur **HICHAMI. A** , Maître de conférence à la faculté des sciences de Dijon pour leur disponibilité et leur aide technique.

Au personnels du service de la banque de sang au centre Hospitalo-universitaire de Tlemcen, ainsi qu'au personnel de la clinique de SIDI CHAKER service diabétologie (Tlemcen) pour leur collaboration et leur disponibilité, ainsi que tous le personnel du département de biologie (Tlemcen).

Liste des figures

Fig 01 : Pathologies humaines dans lesquelles le stress oxydant est impliqué.

Fig 02 : Description des espèces oxygénées activées.

Fig 03 : Moyens de protection antioxydants permettant de contrôler la production d'EOA..

Fig 04 : Effet de synergie des antioxydants.

Fig 05 : Balance antioxydante.

Fig 06 : teneurs sériques en vitamines chez les diabétiques de type I et chez les témoins.

Fig 07 : Activité des enzymes antioxydantes chez les diabétiques de type I et chez les témoins.

Fig 08 : Teneurs sériques en vitamines chez les diabétiques de type II et chez les témoins.

Fig 09 :Activité des enzymes antioxydantes chez les diabétiques de type II et chez les témoins.

Fig 10 : Courbe cinétique de la perte de la fluorescence de l'APC.

Fig 11 : ORAC chez les diabétiques de type I et de type II et chez les témoins .

Liste des tableaux

Tableau I : Caractéristiques de la population étudiée.

Tableau II : Teneurs sériques en lipides chez les diabétiques et les témoins.

ANNEXES

Tableau III : Teneurs sériques en vitamine A, E et C chez les diabétiques et chez les témoins.

Tableau IV : Activité des enzymes antioxydantes chez les diabétiques et chez les témoins.

Tableau V : Perte de fluorescence de l'APC en fonction du temps.

Tableau VI : Capacité d'absorption du radical oxygéné chez les diabétiques de type I et II et chez les témoins.

Liste des abréviations

- ADA** : American diabetes association.
- ADN**: Acide Desoxyribonucléique.
- APC** : Allophycocyanine.
- ARDS** : Syndrome de déficience respiratoire acquis.
- ATP** : Adenosine triphosphate.
- CML** : Carboxymethyllysine.
- DID** : Diabète Insulino- Dépendent.
- DNID** : Diabète Non- Insulino Dépendant.
- DTC** : Dinitrophenylhydrazine-Thiourée réduit.
- EDTA** : Ethylène Diamine Tetraacétique Acide.
- EOA** : Espèces Oxygénées Activées.
- FAD** : Protéine flavine.
- FL** : Fructolysine.
- GPX** : Glutathion peroxydase.
- GSH** : Glutathion réduit.
- GSSG** : Glutathion oxydé.
- HPLC** : Chromatographie liquide à haute performance.
- LDL**: Lipoprotéines de faible densité.
- MDA** : Malonique Dialdéhyde.
- MPO** : Myeloperoxydase.
- NADPH** : Nicotinamide Adénine Nucléotide Phosphate réduit.
- NDDG** : National diabetes groupe.
- OMS**: Organisation mondiale de la santé.
- ORAC**: Capacité d'absorption du radical oxygéné.
- SOD** : Superoxyde dismutase.
- SUVIMAX** : Supplémentation en vitamines et minéraux antioxydants.
- UI**:Unité internationale.
- UV** : Ultraviolets.

SOMMAIRE

Introduction.....	1
Revue bibliographique.	
Diabète et stress oxydatif.	
I-) Diabète sucré.....	4
I-1) Définition du diabète	4
I-2) Classification du diabète	4
I-3) Diabète de type I.....	4
I-4) Diabète de type II.....	4
II -) Stress oxydatif.....	5
II-1) Définitions et Mécanismes.....	5
II-2) Le paradoxe de l’oxygène	8
III-) Mécanisme de défense contre les réactions radicalaires	12
III-1) La détoxification active suite à l’induction d’un stress oxydatif	12
III-1-1) Enzymes antioxydantes	12
III-1-1-1) La superoxyde dismutase.....	12
III-1-1-2) La catalase.....	12
III-1-1-3) La glutathion peroxydase.....	13
III-1-1-4) La glutathion réductase	13
III-2) La détoxification passive	14
III-2-1) Les vitamines.....	14
III-2-1-1) L’alpha-Tocophérol ou vitamine E.....	14
III-2-1-2) L’acide ascorbique ou vitamine C.....	15
III-2-1-3) Axérophtol ou rétionol ou vitamine A.....	15
IV) Antioxydants et prévention de maladies	16
V) Balance antioxydante.....	18
VI) stress oxydatif au cours du diabète	19
Matériel et méthodes	.
I) Population étudiée	21
I-1) Patients diabétiques.....	21
I-1) Sujets témoins.....	21
II) Préparation des échantillons.....	21
III) Dosage des paramètres biochimiques	23

III-1) Dosage du glucose.....	23
III-2) Dosage du cholestérol total.....	23
III-3) Dosage des triglycérides.....	23
III-4) Dosage des vitamines A et E.....	23
III-5) Dosage de la vitamine C.....	24
III-6) Dosage de la glutathion peroxydase.....	24
III-7) Dosage de la superoxyde dismutase.....	25
III-8) Dosage de la catalase.....	25
III-9) Dosage de la glutathion réductase.....	25
IV) Détermination du pouvoir antioxydant total (ORAC ; capacité d'absorption du radical oxygéné).....	26
V) Analyse statistique.....	26
Résultats et interprétations	
I) Teneurs sériques en lipides.....	27
II) Statut antioxydant chez les diabétiques insulino dépendants (de type I).....	27
II-1) Teneurs en vitamines A, E et C.....	27
II-2) Activités des enzymes antioxydantes	27
III) Statut antioxydant chez les diabétiques non insulino dépendants (de type II).....	31
III-1) Teneurs en vitamines A, E et C.....	31
III-2) Activités des enzymes antioxydantes	31
IV) Pouvoir antioxydant total (ORAC).....	34
IV-1) Mise au point méthodologique.....	34
IV-2) ORAC chez les diabétiques et chez les témoins.....	34
IV-2-1) ORAC chez les diabétiques de type I.....	34
IV-2-2) ORAC chez les diabétiques de type II	34
Discussion	37
Conclusion.....	43
Références bibliographiques.....	45
Annexes.....	51

Introduction

Le diabète sucré est une maladie chronique dont le début est fréquemment mal connu (A.D.A., 1998 ; VELHO et coll., 1996).

Il s'agit d'une maladie métabolique largement répandue. Sa prévalence est croissante dans le monde, c'est le cas au Japon et en Nouvelle Zélande, alors que le taux paraît stable aux Etats-Unis et en Europe. Elle touche actuellement près de 4% de la population (PERLUMETER et coll., 1995).

Le taux d'incidence annuel en Algérie est estimé de 2 à 4% avec divers degrés d'anomalies du métabolisme (FUJIMOTO., 1996 ; KING et coll., 1993). Le diabète est défini, selon l'organisation mondiale de la santé (O.M.S), par la présence d'une hyperglycémie chronique à jeun supérieure ou égale à 1,26g/l (7mmol/l) et ou égale à 2g/l (11,1mmol/l) et cela 2 heures après l'ingestion de 75g de glucose, due à une insuffisance de la sécrétion et/ou de l'action de l'insuline et pouvant entraîner à long terme des complications métaboliques (American Diabètes Association. , 1997).

Selon l'O.M.S , le diabète sucré se caractérise par une élévation permanente de la teneur en glucose du sang (hyperglycémie), parfois accompagnée par des symptômes tels qu'une soif intense, des mictions fréquentes, une perte de poids, et une torpeur qui peut aller jusqu'au coma et à la mort en l'absence de traitement (O.M.S., 1985).

Plus souvent, les symptômes révélateurs sont beaucoup moins nets. Les teneurs élevées du glucose dans le sang et les autres anomalies biochimiques résultent d'une insuffisance de production ou d'action de l'insuline, hormone qui contrôle le métabolisme du glucose, de protéines et de lipides.

A la lumière de progrès dans le domaine de biologie moléculaire, l'organisation mondiale de la santé (O.M.S) et American Diabètes Association (A.D.A) ont proposé une classification du diabète distinguant à la fois l'étiologie et la pathologie du diabète de type I et de type II (DENYS , 1999).

On distingue le diabète de type I appelé aussi diabète insulino-dépendant (DID) ou diabète juvénile, lié à une destruction des îlots de Langerhans qui conduit à une insulino-pénie. Cette destruction est auto-immune et survient chez les sujets prédisposés génétiquement . Le diabète insulino-dépendant (DID) représente 25% de la totalité des diabètes sucrés. Dans ce cas l'insulinothérapie est indispensable à la vie (DEL COURT et coll., 1994 ; TISCH et coll., 1996).

Le diabète de type II appelé aussi diabète de la maturité , diabète gras est caractérisé par une insuffisance de la capacité pancréatique à faire face à un état d'insulino-résistance (SLAMA et coll.,1990).Le diabète de type I et de type II est associé à de nombreuses modifications du métabolisme des glucides, des protéines et des lipides (GINSBERG, 1991).De plus les complications à long terme sont représentées par les lésions progressives de la rétine et des reins, des nerfs périphériques et d'une athérosclérose grave (O.M.S ;1985).

C'est dire l'intérêt scientifique porté à cette maladie chronique. Dans notre pays, l'intérêt porté à cette maladie devient grandissant et il est tout autant lié au progrès des sciences médicales et à l'amélioration de la couverture médicale de la population marquée par une meilleure connaissance de cette maladie, des techniques de dépistage plus simplifiées et un meilleur déploiement du potentiel médico-sanitaire.

Actuellement, en plus des anomalies métaboliques,le stress oxydatif est reconnu comme un important facteur impliqué dans les complications dégénératives du diabète. Le métabolisme cellulaire normal produit en permanence des espèces oxygénées réactives. Par exemple, au cours de la respiration, nécessaire à l'entretien de la vie de notre organisme, chacune de nos cellules réduit l'oxygène en eau. Parfois, une petite partie de cet oxygène échappe à la transformation complète, ce qui aboutit à la production en permanence d'une espèce d'oxygène très réactive : l'anion superoxyde (caractéristique des radicaux libres). Il se déclenche ainsi une réaction d'oxydation en chaîne, à partir des diverses réactions chimiques de notre organisme, générant des radicaux libres, aboutissant à des microlésions des membranes cellulaires ou des structures comme l'ADN. (FONTAINE, 2002).

Ces mécanismes d'oxydations sont essentiels pour le fonctionnement cellulaire, mais un dérèglement peut provoquer un stress oxydatif c'est-à-dire l'apparition de radicaux libres très agressifs pour l'organisme et responsables de nombreuses pathologies . Certaines agressions comme l'irradiation, ou les substances toxiques (alcool, médicament, tabac, pollution, radiation UV..ect) peuvent entraîner ou produire des radicaux libres (DEMPLE et coll.,1991).

Il a été démontré par plusieurs auteurs que le stress oxydatif est particulièrement important au cours du diabète (IHARA et coll.,1999 ;LAIGHT et coll.,2000). Ceci peut aggraver les complications associées à cette pathologie. Normalement, l'organisme possède des moyens de défense contre les radicaux libres . Ce système antioxydant est constitué par les vitamines A, E et C, les enzymes érythrocytaires antioxydantes et d'autres molécules organiques comme la transferrine, ferritine, céruloplasmine, l'albumine .

Lorsque ce système antioxydant est dépassé, le stress oxydatif apparaît (DEMPLE et coll.,1991 ;WILL et coll. ,1996).

Le diabète aussi bien de type I que de type II est caractérisé par une augmentation de l'activité des radicaux libres et une réduction des défenses antioxydantes (LAIGHT et coll.,2000).

Dans ce travail, le statut antioxydant des diabétiques de la région de Tlemcen est déterminé par dosage des vitamines A, E, et C et des enzymes érythrocytaires antioxydantes (dismutase, catalase, glutathion peroxydase et réductase). De plus, le pouvoir antioxydant total (ORAC) représentant l'ensemble des mécanismes impliqués dans la défense de l'organisme contre les radicaux libres est aussi analysé chez cette population diabétique.

Pour cela, cette étude est réalisée sur :

- Une population de patients diabétiques insulino dépendants (DID) et des patients diabétiques non insulino dépendants (DNID) avec ou sans complications.

- Une population de sujets sains témoins volontaires.

Ce travail représente donc une approche permettant de voir si le diabète sucré dans la région de Tlemcen est lié à des modifications des mécanismes de défense antioxydants de L'organisme.

Revue Bibliographique

Diabète et stress oxydatif

I-) Diabète sucré

I-1-) Définition du diabète sucré

Le diabète sucré est une maladie chronique affectant le métabolisme énergétique. Il est dû à une insuffisance ou absence de la sécrétion de l'insuline par les îlots de langerhans. Il en résulte des troubles non seulement du métabolisme glucidique mais aussi du métabolisme lipidique et protéique.

Le diabète se définit par une hyperglycémie chronique supérieure ou égale à 1,26g/l (7mmol/l) à deux reprises (A. D. A,1997).

Les symptômes de cette maladie sont souvent caractéristiques et il se traduisent principalement par :

- Polyphagie, polyurie, polydipsie (SLAMA et coll., 1990).

I-2) Classification du diabète :

La classification du diabète traditionnelle a été fondée en 1979 par le National Diabètes DATA Group (NDDG) et American Diabètes Association (ADA). Cette classification repose essentiellement sur des données cliniques et des critères thérapeutiques, en individualisant deux entités :

- Diabète insulino-dépendant (DID) ou type I.
- Diabète non- insulino-dépendant (DNID) ou type II.

I-3) Diabète de type I

Ce diabète est également appelé diabète juvénile, caractérisé par la présence des stigmates d'immunité témoin de la destruction des cellules β (Bêta) des îlots de langerhans qui conduit à une insulino-pénie absolue et l'hyperglycémie apparaît lorsqu'il ne reste plus que 10 à 20% de cellules β fonctionnelles. Cette destruction auto-immune survient chez les sujets génétiquement prédisposés et on connaît maintenant le génotype DR qui confère le risque accru d'apparition du diabète de type I.

I-4) Diabète de type II

Appelé aussi diabète de la maturité, diabète gras ; il s'agit d'une affection dix fois plus fréquente que la précédente.

Le diabète de type II est associé à des perturbations de l'insulinosensibilité (insulino-résistance). La sensibilité à l'insuline et la sécrétion insulino-que sont influencées par de multiples facteurs génétiques en grande majorité méconnus et le diabète de type II associe

certainement une accumulation des altérations génétiques. L'importance de l'environnement (sédentarité, obésité et alimentation) dépend probablement aussi du type et du nombre de gènes impliqués chez les individus (GRANNER et coll.,1992 ;O'RAHILLY et coll.,1994).Tous ces éléments expliquent la grande hétérogénéité du diabète de type II .Pour certains auteurs, l'insulinorésistance semble être le facteur initial prédominant alors que des troubles de l'insulinosécrétion n'apparaîtront qu'ultérieurement dans l'histoire de la maladie (LILLIO et coll.,1993 ;FERREIRA et coll.,1998 ;POLONSKY et coll.,1996).

II) Stress oxydatif

II-1) Définition et mécanismes

Notre organisme produit en permanence des EOA (espèces oxygénées activées) dont la production est contrôlée par les antioxydants. Dans certaines situations pathologiques, plusieurs mécanismes biochimiques peuvent s'activer (libération de fer de ses protéines de transport, oxydation de l'hémoglobine, altération du transport des électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale, activation des neutrophiles et des cellules endothéliales,.....) et produire des EOA en excès qui vont dès lors submerger très rapidement toutes nos défenses antioxydantes.

Les cellules des êtres aérobies, en état d'oxydation normal, ont une concentration basale en radicaux libres de l'oxygène. Le contrôle rigoureux de la formation et de l'élimination de ces derniers préserve les cellules des effets nuisibles des radicaux libres .

On appelle stress oxydatif, une augmentation de radicaux libres de l'oxygène qui provoque des dommages cellulaires irréversibles, tels que la peroxydation des lipides ainsi que la dénaturation oxydative des acides aminés et de bases azotées (GUTTERIDGE,1993).

Le stress oxydatif correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire (MOREL et coll .,1999) induite soit par une production excessive de radicaux libres , soit par une diminution de la capacité de défense antioxydante. Les effets des radicaux libres sont proportionnels à l'intensité et à la durée de leur production.

Une production transitoire et modérée de radicaux libres correspond à un mécanisme de défense de la cellule lui permettant, par exemple de détruire des cellules cancéreuses ou des microorganismes pathogènes (MOREL et coll. ,1999).

Lorsque cette production est récurrente ou chronique mais reste modérée dans son intensité, la balance entre production de radicaux libres et système de détoxification de la cellule est perturbée de manière continue, et on parle alors de stress oxydatif .

Si la production de radicaux libres est suffisamment importante pour altérer de manière irréversible des processus cellulaires vitaux, elle déclenche l'apoptose et la mort cellulaire. Lorsque les radicaux libres sont générés en quantités massives, ils entraînent la nécrose cellulaire (MOREL et coll.,1999).

De nombreux facteurs, tels que des perturbations métaboliques, l'inflammation, des agents physiques, des cytokines, la présence d'oxydants exogènes, peuvent conduire à la formation de radicaux libres (MOREL et coll.,1999) .

Les radicaux libres réagissent avec des substrats oxydables (dont le glucose) et produisent des radicaux carbonyles. Ces derniers ont de multiples effets intracellulaires , dont la glycation de protéines, l'altération de la structure de l'ADN, la génération de produits de peroxydation des lipides, et la modulation de la transcription de nombreux gènes (MOREL et coll. ,1999).

Le stress oxydatif est largement accepté comme étant un composant critique de plusieurs, peut-être de la plupart des voies pathologiques . Comme le montre la figure 1, le stress oxydant est impliqué dans le développement de plus de 200 pathologies (maladies cardiovasculaires, dégénératives et inflammatoires , cancer, diabète ,sida ,....).

Le stress oxydatif est également une réalité clinique qui se rencontre lors de chirurgies cardio-vasculaires, de transplantation d'organes ou de détresse respiratoire (SLATER et Coll.,1995).



Fig n° 1 : Pathologie humaines dans lesquelles le stress oxydant est impliqué
(CERIELLO et coll., 1998)

La vie moderne nous confronte à la pollution, l'absorption d'alcool ou de médicaments, l'exposition prolongée au soleil et au tabagisme qui sont autant de situations provoquant aussi dans notre organisme une surproduction d'EOA, ce qui conduit à un affaiblissement de nos défenses antioxydantes (vitamines, oligo-éléments) mais aussi à l'apparition de dégâts cellulaires non désirables. Un exercice physique intense mal pratiqué ou mal géré et aussi une situation de stress oxydant .

La situation se complique d'autant plus que l'alimentation actuelle n'est plus suffisamment saine et équilibrée et qu'elle nous apporte de moins en moins d'antioxydants naturels nécessaires pour contrôler les effets nocifs de l'oxygène. (MIRANDA et coll., 2000 ; PRATICO et coll.,2000; TEMPLE, 2000).

Le diabète aussi bien de type I que de type II est caractérisé par une augmentation des radicaux libres et une diminution du système antioxydant (LAIGHT et coll.,2000).Le diabète

est associé à une augmentation du risque de maladies cardiovasculaire et cérébraux , ce qui est en partie expliqué par l'association avec l'hypertension et les dyslipidémies.

Si la théorie reliant le stress oxydatif à la maladie est correcte et si le stress oxydatif est augmenté dans le diabète alors on est en droit de s'attendre à une augmentation du risque de cancer chez les patients diabétiques.

Jusqu'à récemment, étant donné la survie relativement courte des patients diabétiques, les banques de données n'étaient pas assez larges pour explorer cette question (CZYZYK et coll., 2000).

II-2) Le paradoxe de l'oxygène

La chaîne respiratoire mitochondriale joue un rôle capital dans la cellule en étant responsable de la transformation de l'oxygène en deux molécules d'eau. Cette réaction de réduction directe impliquant la présence de quatre électrons est rendu possible grâce à un système complexe de protéines et d'enzymes (cytochromes) localisé dans la membrane interne de la mitochondrie.

Les conséquences de cette activité mitochondriale seront doubles et paradoxales .D'une part, la mitochondrie fournira à la cellule une source d'énergie importante puisque 36 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) à haut potentiel énergétique seront générées lors de la réduction de l'oxygène. Par contre, environ 0.4 à 4% de l'oxygène ne seront pas correctement convertis en eau suite à des fuites électroniques résultant d'imperfections de la chaîne respiratoire mitochondriale . Par réduction monoélectronique, l'oxygène donnera naissance à des espèces oxygénées activées (EOA) parmi lesquelles figurent des radicaux libres comme l'anion superoxyde ou le radical hydroxyle (OH).En chimie, un radical libre est un atome ou une molécule dont la structure chimique est caractérisée par la présence d'un électron libre rendant cette espèce chimique beaucoup plus réactive que l'atome ou la molécule dont il (elle) est issu(e) .D'autres entités non radicalaires de l'oxygène peuvent être produites comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'oxygène singulet (O_2).

La formation des EOA requiert la présence de métaux de transition comme le fer ou le cuivre qui agissent comme des catalyseurs incontournables dans toute la chimie des radicaux libres (figure 2) (SOHAL et coll., 1993).

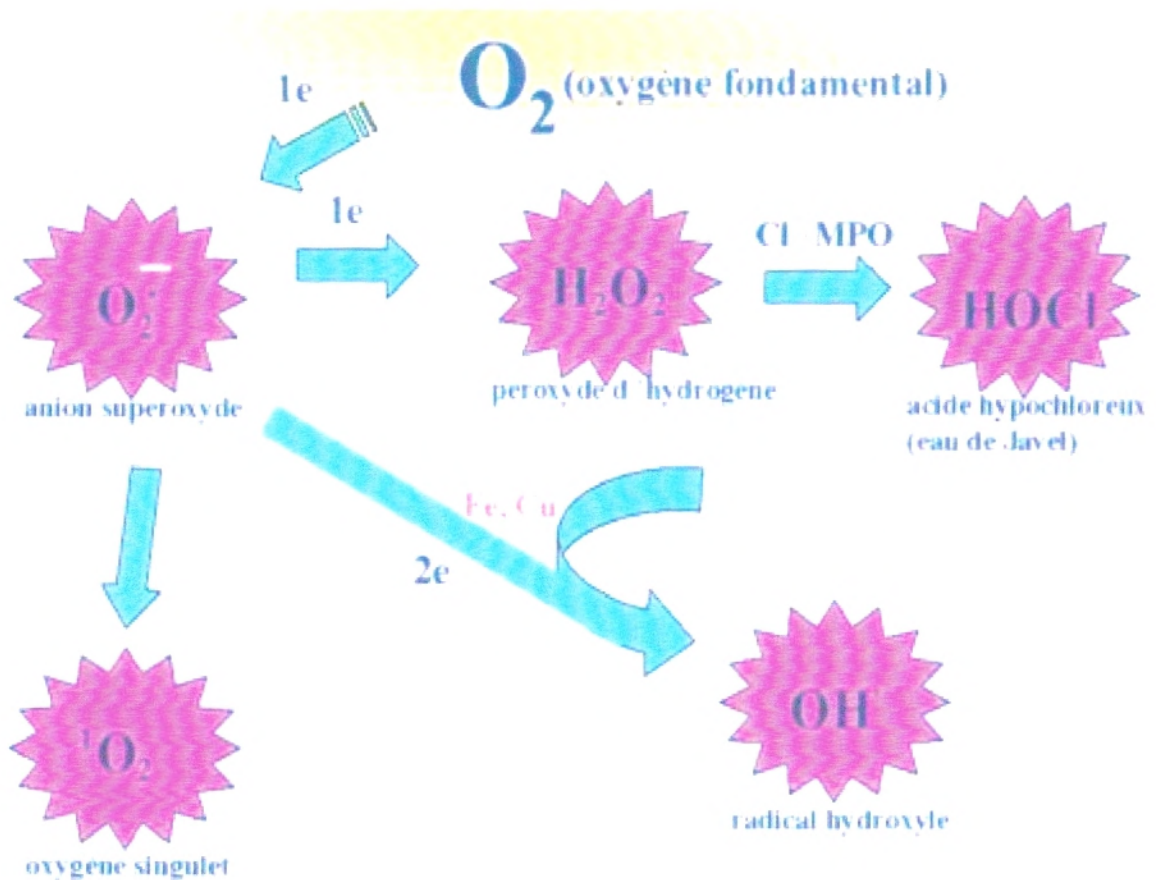


Fig n°2 : Description des espèces oxygénées activées

(SOHAL et coll.,1993)

De par leur caractère instable ou oxydant, les EOA sont susceptibles de provoquer des dégâts cellulaires importants :

- en provoquant des cassures et des mutations au sein de l'acide désoxyribonucléique (ADN),
- en inactivant des protéines et des enzymes,
- en induisant des processus de peroxydation lipidique au sein des acides gras poly insaturés des lipoprotéines ou de la membrane cellulaire.

Les EOA peuvent aussi agir comme des messagers secondaires au niveau moléculaire :

- en régulant le phénomène d'apoptose qui est un suicide programmé des cellules évoluant vers un état cancéreux.

- en activant des facteurs de transcription (NFKB ,p38-MAP kinase,..) eux - mêmes responsables de l'activation de gènes codant pour l'expression de cytokines pro inflammatoires ou de protéines d'adhésion.

Si la cellule peut continuer à fonctionner en dépit de la formation des EOA , c'est qu'il existe un équilibre très délicat entre la production d'énergie et la génération de molécules hautement oxydantes générées par la mitochondrie. La production physiologique d'EAO est contrôlée par des moyens de protection composés :

- d'enzymes (superoxyde dismutase Cu-Zn et Mn, catalase, glutathion peroxydase, couple thiorédoxine- thiorédoxine réductase),
- de protéines transporteuses du fer et du cuivre (transferrine, ferritine, céruloplasmine),
- de molécules antioxydantes de petite taille (glutathion , acide urique bilirubine, vitamines A, C, E, ubiquinone , caroténoïdes),
- d'oligo-éléments (cuivre, zinc, sélénium) indispensables pour l'activité des enzymes antioxydantes.

Un système de défense secondaire composé d'enzymes protéolytiques dont le rôle consiste à empêcher l'accumulation dans la cellule de protéines ou d'ADN oxydés et à dégrader leurs fragments toxiques, complète la panoplie des moyens de protection contre les EOA (Fig n° 3).

La notion de régulation, et non d'inhibition totale, est importante car l'avènement de la biologie moléculaire et de la génétique ont permis de montrer que les EOA, tout comme les antioxydants, jouent des rôles clés dans la régulation de l'apoptose (suicide programmé de cellules évoluant vers un état cancéreux), dans l'expression de certains facteurs de transcription ou comme modulateurs de l'expression de gènes de structure codant pour les enzymes antioxydantes.

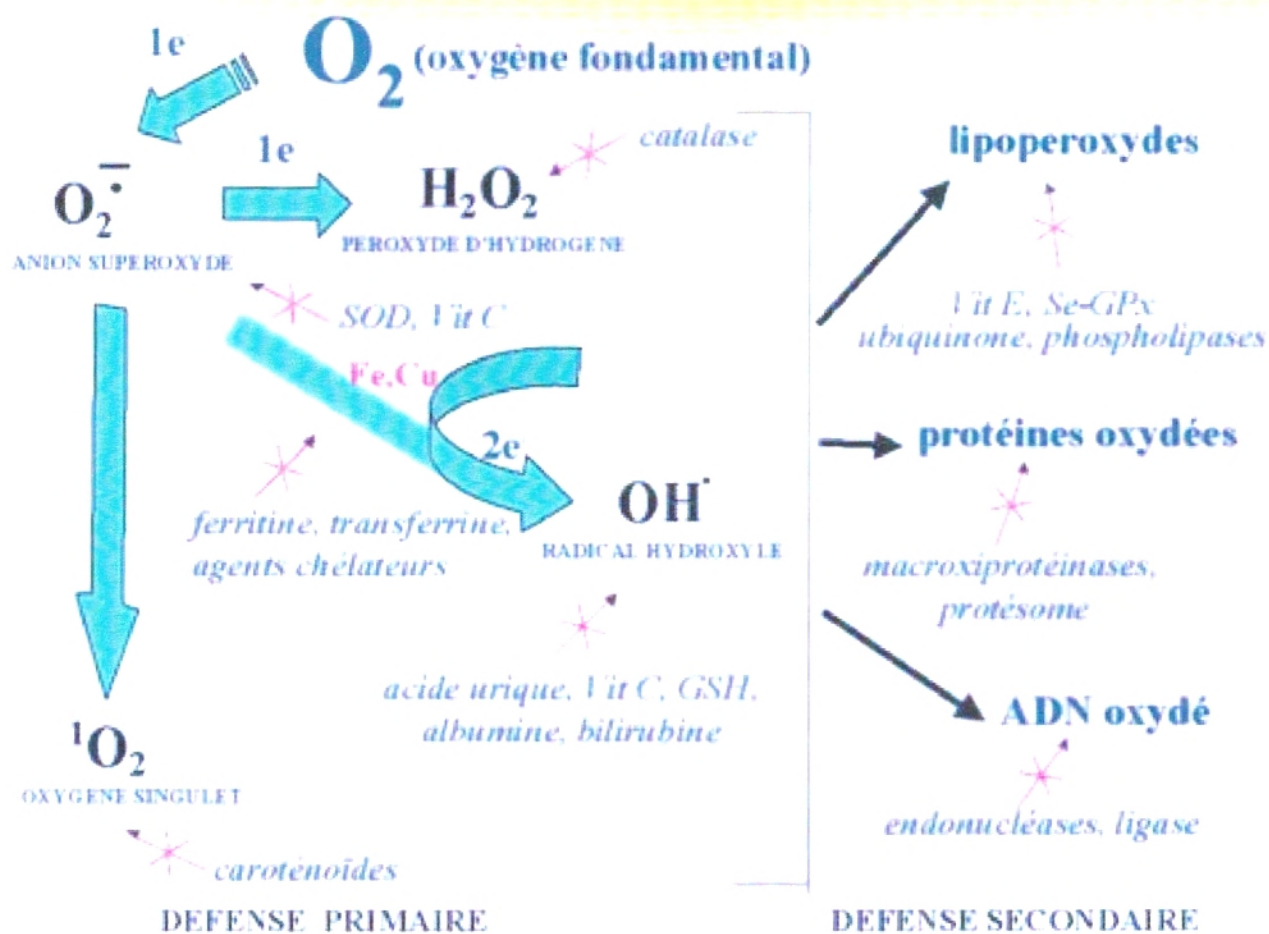


Fig n°3 : Moyens de protection antioxydants permettant de contrôler la production d'EAO (LE GUEN et coll.,1999)

III) Mécanisme de défense contre les réactions radicalaires

III-1) La détoxification active suite à l'induction d'un stress oxydatif

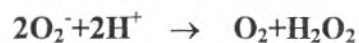
III-1-1) Enzymes antioxydantes

Cette ligne de défense se constitue des enzymes superoxyde dismutase et catalase, ainsi que des enzymes à activité glutathion peroxydasique, qui permettent la transformation de l'anion superoxyde et des peroxydes formés en excès en produits non toxiques. La disponibilité du glutathion réduit étant primordiale pour la réduction des peroxydes par les enzymes à activité glutathion-peroxydasique, les molécules de glutathion disulphide issus de l'activité de ces dernières peuvent être réduits à nouveau par la glutathion-réductase, qui utilise du NADPH à l'aide de la glucose-6- phosphate déshydrogénase.

La catalase et la glutathion – peroxydase sélénium-dépendante ont la même constante d'affinité pour la dégradation du peroxyde d'hydrogène. C'est le site de formation de ce dernier ainsi que la disponibilité en glutathion réduit, en NADPH et les activités de la glutathion- réductase et de la glucose 6 – phosphate déshydrogénase qui déterminent la part éliminée par chacune de ces deux enzymes antioxydantes (WASSERMAN.,1997).

III-1-1-1) La superoxyde dismutase

Une fois induite par l'anion superoxyde , la superoxyde dismutase réalise la réaction :



Dans les cellules des mammifères, lors d'un stress oxydatif, la majorité des anions super oxydes sont ainsi transformés en peroxydes d'hydrogène par les superoxyde dismutases à cuivre et zinc (Cu, Zn) ou à manganèse (Mn) selon qu'ils se trouvent respectivement dans le cytosol ou dans mitochondries. C'est le cuivre dans le premier cas et le manganèse dans le second qui est impliqué dans la catalyse. Le milieu extracellulaire est aussi pourvu d'une superoxyde-dismutase de forme Cu Zn (KUBISCH. ,1997)

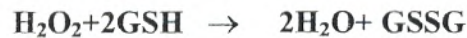
III-1-1-2) La catalase

C'est une peroxydase hémique qui se trouve principalement dans les peroxysomes des hématies, des hépatocytes et des cellules rénales, ainsi que dans les microperoxysomes dans les autres tissus. Elle est induite par les agents inducteurs de la prolifération des peroxysomes. Comme chez toutes les peroxydases hémiques, le substrat oxydant de cette enzyme est le peroxyde d'hydrogène. La particularité de la catalase est que ce dernier soit aussi le substrat à oxyder. La réaction catalysée par cette enzyme est donc la suivante :



III-1-1-3) La glutathion-peroxydase

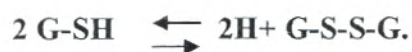
L'activité glutathion- peroxydasique permet l'élimination des peroxydes d'hydrogène et des peroxydes organiques présents dans le cytosol ou dans les mitochondries des cellules, en oxydant le glutathion (GSH) en bisulfure (GSSG). La glutathion-peroxydase sélénium-dépendante est une enzyme existant sous la forme hydrosoluble et sous la forme lipophile dans les cellules de mammifères. Le site actif de cette enzyme comporte une séléno-cystéine qui est au centre de la catalyse décrite comme suit :



La forme hydrosoluble est localisée dans le cytosol ainsi que dans la matrice mitochondriale. Elle est hautement spécifique du glutathion réduit mais elle est peu spécifique au peroxyde, pouvant aussi bien éliminer le peroxyde d'hydrogène que hydroperoxydes organiques. La forme lipophile, quant à elle, se trouve dans les membranes mitochondriales, les membranes nucléaires et dans celles du réticulum endoplasmique. Elle est spécifique aux phospholipides (GRANKVIST., 1981).

III-1-1-4) La glutathion réductase

Le glutathion sous deux formes, l'une réduite G-SH, l'autre oxydée G-S-S-G. Les deux formes coexistent dans les cellules selon une réaction équilibrée d'oxydo-réduction .



Le maintien de la proportion du glutathion réduit dans les limites suffisantes est vital pour la survie de l'hématie. Le Glutathion réduit empêche certains processus d'oxydation de la membrane, probablement par intervention de radicaux libres oxygénés, parfois aussi par l'eau oxygénée formée dans certaines réactions (bien que cette dernière soit en principe détruite par l'enzyme catalase, abondante dans le globule rouge).

Il existe un système enzymatique particulier pour réduire en permanence le glutathion : c'est la glutathion -réductase, dont le coenzyme est le NADP. La réduction de ce NADP est elle même assurée par les réactions de la voie des pentoses phosphate (CORROCHER et coll., 1980).

III-2) La détoxification passive

III-2-1) Les vitamines

Un certain nombre de substances s'opposent à la propagation des réactions radicalaires, très souvent en formant à partir d'un radical très réactif un autre radical beaucoup moins réactif. On les appelle antioxydants, ils sont liposolubles ou hydrosolubles.

Ce sont des substances dont l'organisme ne peut en général faire la synthèse, nécessaires à l'organisme et à sa croissance agissant à doses minimales, dépourvues de valeur calorique intrinsèque et qui doivent être apportées par le régime alimentaire .

Les vitamines ont le plus souvent un rôle de cofacteur dans les systèmes enzymatiques et membranaires. Les besoins en vitamines sont impératifs en période de croissance (HERCBERG et coll.,1998) .

III-2-1-1) l'alpha- tocophérol ou vitamine E :

C'est une molécule liposoluble qui se localise surtout dans la membrane externe des mitochondries et dans celles du réticulum endoplasmique. Elle est présente dans tous les organes, à l'exception du cerveau. C'est dans le foie, le cœur, les reins, les poumons, la rate, les muscles squelettiques et le tissu adipeux que son activité est la plus forte. Une molécule d'alpha- tocophérol (T-OH) est capable d'éliminer deux molécules de radicaux libres de la façon suivante :



L'alpha- tocophérol agit exclusivement dans un environnement lipophile, tel que la membrane biologique. Son activité antioxydante comprend la propagation des radicaux peroxydes et alcoyles des acides gras membranaires, permettant ainsi la terminaison du mécanisme de peroxydation des lipides .

Les radicaux alpha- tocophérols qui ne se sont pas associés à un radical libre sont majoritairement catabolisés en tocophéryl – quinones par la cellule ; certains, cependant, arrivent à être réduits à nouveau en alpha- tocophérol par l'acide l-ascorbique ou par le glutathion (PAOLISSO et coll., 1993).

Les besoins sont de 5-15mg par jour d'acétate d'alpha-tocophérol .

Les besoins augmentent avec la richesse du régime en lipides et surtout en acides gras polyinsaturés.

Les apports proviennent des germes de céréales , légumes verts ,foie ,œufs , beurre.
(CHRISTEN et coll. , 2000).

III-2-1-2) l'acide l-ascorbique ou vitamine C

C'est une molécule hydrosoluble ayant à la fois un rôle prooxydant et antioxydant. Son activité antioxydante est comparable à celle de l'alpha-tocophérol au niveau des compartiments hydrophiles de la cellule. Il est capable de réduire l'anion superoxyde ainsi que les radicaux hydroxyles, perhydroxyles et peroxyles. L'acide l-ascorbique est le principal antioxydant de la ligne de défense dans le cerveau, où l'alpha-tocophérol est absent. Dans les autres tissus, il soutient l'activité de ce dernier en réduisant à nouveau le radical alpha-tocophéryl en alpha-tocophérol : c'est aussi le réducteur privilégié du radical cystéinyl du glutathion.

L'acide l-ascorbique à une activité prooxydante quand il transforme la proline en hydroxy-proline, puisque cela génère des espèces réactives de l'oxygène. De plus, dans la ferritine, il permet la conversion de l'ion ferrique en ion ferreux, qui est la forme prooxydante du fer dans les conditions physiologiques. L'acide l-ascorbique provoque également la libération, et par conséquent, la biodisponibilité dans le plasma du fer et du cuivre retenus dans les protéines sanguines de stockage (transferrine) sous une forme inactive.

Les besoins sont de 10 à 75 mg par jour (WILL et coll.,1996).

III 2-1-3) Axérophtol ou rétinol ou vitamine A .

La vitamine A a un effet antioxydant. C'est une molécule liposoluble présente dans les membranes biologiques. Sa structure chimique hautement insaturée le fait réagir adéquatement avec les radicaux peroxyles, créant ainsi des produits non radicalaires, ce qui a pour effet d'arrêter la chaîne de réaction radicalaire.

Les besoins augmentent avec la teneur en lipides du régime et surtout en acides gras saturés .

La vitamine A est absorbée avec les lipides dans des repas puis est estérifiée par le foie où elle se concentre. Elle circule dans le sang liée à une protéine porteuse. C'est le composé photosensible du pourpre rétinien (Rhodopsine).

Elle intervient dans la synthèse des stéroïdes sexuels.

Les apports proviennent du foie, beurre cru, lait, œufs.

Les besoins sont de 750-1200 Ug par jour.



La provitamine existe dans les caroténoïdes de nombreux légumes (CHRISTEN et coll.,2000).

IV) Antioxydants et prévention de maladies

Un grand nombre d'études épidémiologiques indiquent qu'une alimentation équilibrée en légumes et fruits riches en antioxydants est associée avec une réduction du risque de développer des accidents cardiovasculaires ou différents types de cancer. Sur la base de ces données, une attention de plus en plus grande est accordée aux vitamines antioxydantes et les oligo-éléments considérés comme des facteurs nutritionnels potentiels (meilleure alimentation, apport complémentaire) capables de prévenir l'apparition de ces maladies .

Actuellement, plusieurs études de prévention primaire et secondaire analysent les effets d'un apport journalier exogène en vitamines C, E ou sélénium sur la réduction de l'apparition de l'infarctus du myocarde ou la mort par accident cardiovasculaire. Les résultats sont parfois discordants. Des données encourageantes estimées dans le monde médical, ont été toutefois observées. A titre d'exemple, le groupe de STEPHENS et coll, ont présenté les conclusions de la " Cambridge Heart AntiOxydant Study(CHAOS) "(2000).

Cette étude de prévention secondaire (durée : 520 jours) portait sur 2000 patients âgés de plus de 55 ans ayant subi une angioplastie et recevant chaque jour soit un placebo , soit une capsule contenant entre 266mg (400UI)ou 533 mg (800UI) de vitamine E. Par rapport au groupe placebo (capsule d'huile de soja), les infarctus du myocarde non fatal sont significativement diminués de 75% dans le groupe traité par vitamine E. Des études en imagerie artérielle sont actuellement en cours et confirment que la vitamine E peut réduire la progression de lésions au niveau de l'artère carotidienne.(GAZIS et coll.,1997)

Une des grandes questions à résoudre sera de déterminer la dose en antioxydants à atteindre pour obtenir des effets positifs en terme de prévention. Il faut bien garder à l'esprit que les antioxydants primaires (vitamines A, C, E) ou secondaires (sélénium) agissent en synergie (figure 4) .

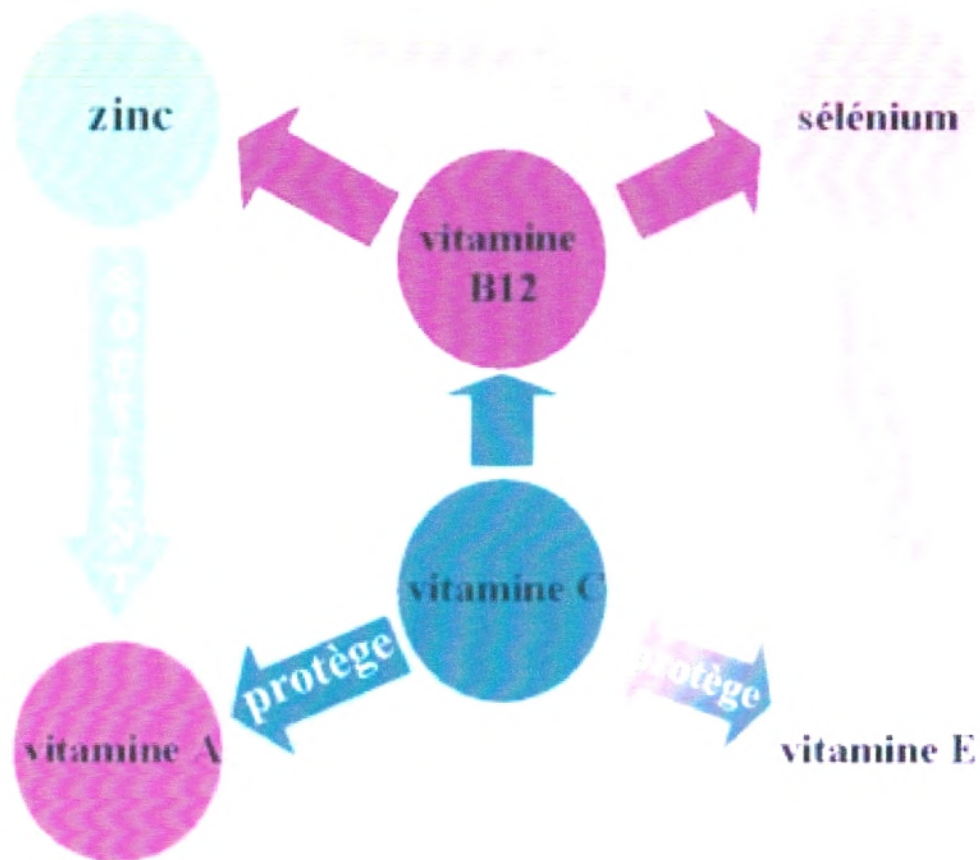


Fig n° 4 : Effet de synergie des antioxydants(SIES ,1997)

Dés lors, modifier cet équilibre par des apports trop élevés en l'un ou l'autre élément pourrait entraîner des effets contraires à ceux espérés. De plus, tous les antioxydants, et particulièrement les vitamines C et E, peuvent devenir en réagissant avec les EOA des entités radicalaires à caractère prooxydant. Un article récent a mis en évidence le rôle complexe de la vitamine E qui, en absence d'autres co-antioxydants, était capable d'exercer un effet proathérogène via la formation du radical tocophéryl au cours de la phase précoce de l'oxydation des lipoprotéines. (BOYLE et coll., 2000).

Bien qu'aucune étude clinique n'a pu déterminer à ce jour une dose-réponse pour quelque antioxydant que ce soit, la prise d'un " cocktail " d'antioxydants correspondant aux apports journaliers recommandés pendant de longues durées semble préférable à celle d'un seul antioxydant à de trop fortes doses. Dans cette optique, le monde scientifique attend avec impatience les résultats de l'étude française SUVIMAX ("Supplémentation en Vitamines et Minéraux Antioxydants"). Cette étude portant sur 15.000 personnes, est ambitieuse puisqu'elle se propose d'évaluer les effets d'une prise journalière d'un mélange

d'antioxydants à des doses physiologiques (30mg de vitamine E, 120 mg de vitamine C, 6mg de B-carotène, 100 mg de sélénium et 20mg de zinc) sur la prévention des maladies cardiovasculaires et de cancer. Les résultats préliminaires de cette étude seront dévoilés en juin de cette année 2003.

V) Balance antioxydante

Dans l'ensemble de nos tissus sains, les défenses antioxydantes sont capables de faire face et de détruire les radicaux libres produits en excès. On dit que la balance antioxydante / prooxydante est en équilibre. Si ce n' est pas le cas par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l' excès de ces radicaux est appelé stress oxydant (HALIWELL ,1994) (Figure 5).

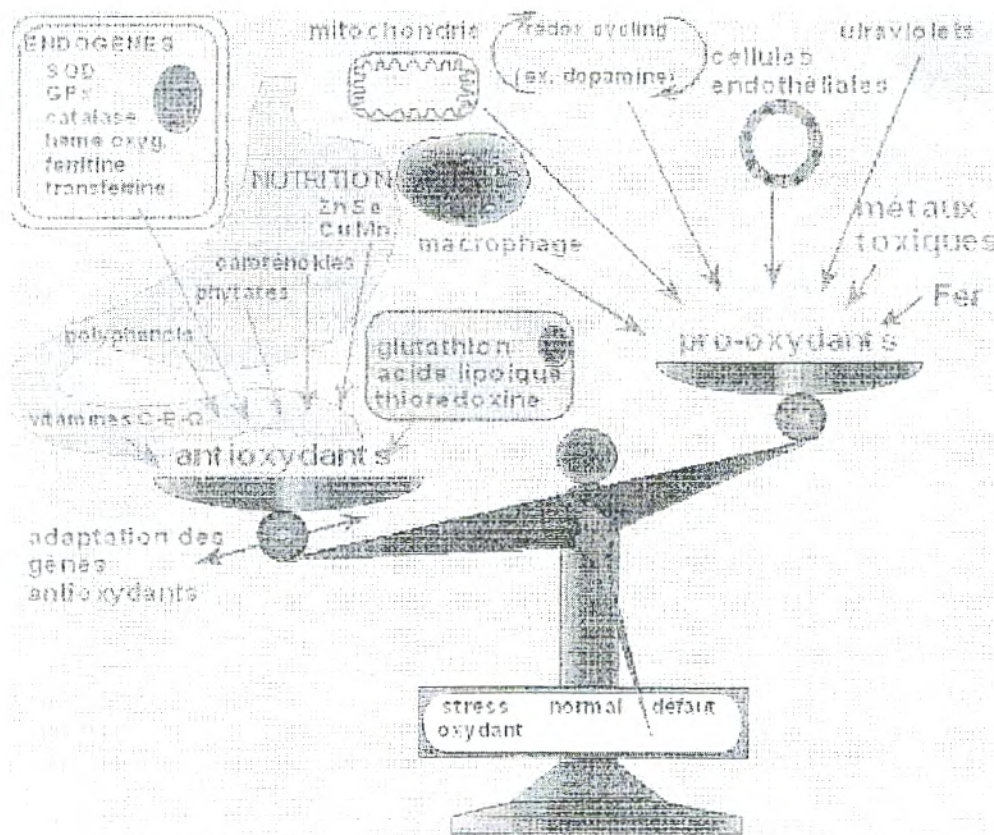


Fig n°5 :Balance antioxydante .(HALIWELL,1994)

Le bon fonctionnement de l'organisme dépend de l'équilibre de la balance entre la quantité de radicaux libres produits par des mécanismes internes ou externes, et la capacité de

destruction de systèmes antioxydants qu'ils soient apportés par l'alimentation ou produits par les cellules (HALIWELL, 1994)

VI) Stress oxydatif au cours du diabète

De nombreux travaux rapportent une augmentation du stress oxydatif au cours du diabète, tenant à la fois à l'augmentation de la production de radicaux oxygènes (H_2O_2) pouvant s'accroître d'un facteur 2 à 3 et à la diminution des capacités de leur dégradation, par la baisse des activités glutathion peroxydase et glutathion réductase, et par la baisse des formes réduites de vitamine C et E (LAIGHT et coll.,2000). Outre l'effet de la voie des polyols qui consomme le NADPH, la déplétion en vitamine C peut être expliquée par la forte similitude structurale entre glucose et acide ascorbique, ou par la déplétion en myoinositol qui perturbe la réabsorption tubulaire Na^+ -dépendante de l'acide ascorbique (YUEDK et coll.,1989). De plus, la présence d'une microangiopathie s'associe à une oxydation de l'acide ascorbique en déhydroascorbate accrue (SINCLINR et coll.,1991). Cependant BAYNES (1991) a observé que le taux de conversion entre la fructoselysine (FL) produit d'Amadori, et son dérivé d'oxydation, la carboxyméthyllysine (CML), déterminé dans l'urine, était réduit au cours du diabète, résultat interprété comme une réduction du stress oxydatif, l'accroissement des taux absolus de FL et de CML étant liés à une augmentation des substrats oxydables (KNECHT et coll. ,1991).

De nombreuses études montrent une augmentations des marqueurs de stress oxydatif dans le diabète de type II (LEINOMEN et coll.,1997; CERIELLO et coll.,1998; THORNALLEY et coll. , 1996), ainsi qu'une diminution des mécanismes de défenses vis avis des radicaux libres (OPARA et coll., 1999; REHMAN et coll. , 1999; YOSHIDAK et coll., 1995) associé à une diminution du taux d'acide urique et d'acide ascorbique circulant (MAXWELL et coll. , 1997; WILL et coll. , 1996). On observe également une diminution de la superoxyde dismutase et de la catalase chez des patients ne présentant qu'une intolérance au glucose, chez qui une diminution de l'acide ascorbique et du glutathion réduit est également déjà présente (VIJAYALINGAM et coll. ,1996). PAOLISSO et coll. (1994) ont observé qu'il existait une corrélation positive entre les radicaux libres plasmatiques et l'insulinémie à jeun et une corrélation négative avec l'utilisation du glucose, en particulier son utilisation non oxydative, dont la diminution est un élément essentiel de la physiopathologie du diabète de type II.

Ces auteurs ont aussi montré des effets similaires avec la vitamine C sur la sensibilité à l'insuline, observant de plus une amélioration des lipides circulants sous l'effet du traitement, les radicaux libres circulants étaient diminués (PAOLISSO et coll.,1995). Les patients

diabétiques de type II ont un taux de glutathion réduit dans les érythrocytes diminué et la perfusion de glutathion réduit augmente l'utilisation du glucose au cours d'un champ euglycémique hyperinsulinémique (DE MATTIA et coll.,1998) .

Curieusement, face d'une part à ces études montrant un effet sur l'amélioration de la sensibilité à l'insuline d'un traitement par les antioxydants et d'autre part aux nombreuses évidences impliquant les radicaux libres dans la destruction des îlots dans le diabète de type I, il n'y a à notre connaissance aucune étude clinique montrant un effet d'un traitement par les antioxydants sur l'amélioration de l'insulinosécrétion dans le diabète de type II.

Matériel et Méthodes

I) Population étudiée

I-1) Patients diabétiques

Cette étude a été réalisée sur une population de patients diabétiques sans complications et des patients diabétiques avec complications rénale, hypertension artérielle et artériopathie. Ces sujets diabétiques ont été recrutés au sein du centre des diabétiques situé à Sidi-Chaker appartenant au centre hospitalo-universitaire de Tlemcen. Les caractéristiques de cette population sont représentées dans le **TABLEAU I**.

I-2) Sujets témoins :

Cette population est constituée de sujets sains recrutés au niveau du service des donneurs de sang au sein du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen. Ces sujets sont exempts de toute maladie métabolique. Les caractéristiques de la population témoin sont présentées dans le **TABLEAU I**.

II) Préparation des échantillons

Les prélèvements de sang se font au niveau de la veine du pli du coude, après 12 heures de jeun. Le sang est recueilli dans les tubes contenant un antioxydant EDTA ou dans les tubes secs.

Les échantillons de sang sont centrifugés à 4000tr/mn pendant 15min. Le plasma ou le sérum est ensuite conservé en vue des différents dosages.

Le sérum est utilisé pour le dosage du glucose et des lipides ; le plasma pour les vitamines et l'ORAC .

Après récupération du plasma, les globules rouges restants sont lavés avec l'eau physiologique trois fois de suite. Après cela, les globules rouges sont lysés par addition d'H₂O glacée et laissés 15min à 4°C. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 4000 tr /min pendant 15min.

Le surnageant (ou le lysat) est après récupéré dans les tubes secs, et sert au dosage des activités des enzymes antioxydantes.

Tableau N° 1 : Caractéristiques de la population étudiée

	Témoins		Sujets diabétiques							
	Témoins 1 20-40 ans	Témoins 2 40-60 ans	Type 1				Type 2			
			D.SC	D.A	D.HTA	D.IR	D.SC	D.A	D.HTA	D.IR
Nombre	20	20	12	12	13	12	12	12	12	14
M/F rapport	10/10	10/10	6/6	6/6	6/7	6/6	6/6	6/6	6/6	7/7
Age (ans)	30,0±1,0	54,0±1,0	30,0±1,0	28,0±2,0	29,0±1,0	30,0±1,0	54,0±2,0	55,0±1,0	56,0±1,3	56,0±1,2
IMC (kg/m²)	21,2±1,8	25,3±1,3	22,2±1,5	22,6±1,8	22,5±1,6	20,1±1,7	26,8±1,9	24,4±2,0	24,8±2,4	24,9±2,0
Durée du diabète (ans)			8,2±0,5	10,0±1,0	9,1±1,0	12,0±1,0	5,2±0,8	8,5±0,9	12,0±1,4	12,7±1,2
Glucose sérique (mmol/L)	4,9±0,1	5,2±0,2	9,0±0,8*	12,7±1*	10±0,8*	10,8±1*	9,6±0,6*	10,8±0,5*	9,0±0,8*	9,4±0,7*
Tension Systolique (mm/Hg)	127±3	132±4	128±3	130±3	176±4*	128±2	130±3	132±3	180±5*	136±2
Tension diastolique (mm/Hg)	81±2	87±3	84±2	86±2	98±3*	84±2	88±1	85±3	96±3*	88±2

IMC = Index de masse corporelle = Poids/Taille² (Kg/m²).

D.SC = Diabète sans complication.

D.A = Diabète avec artériopathie.

D.HTA = Diabète avec Hypertension artérielle.

D.IR : Diabète avec insuffisance rénale.

Chaque valeur représente le nombre ou la moyenne ± ES.

* Diabétiques comparés aux témoins, P<0,05.

III) Dosage des paramètres biochimiques

III-1) Dosage du glucose

Le dosage de la glycémie se fait immédiatement après le prélèvement sanguin et ceci sur du sérum par une méthode enzymatique colorimétrique « glucose-oxydase- peroxydase ».

III-2) Dosage du cholestérol total

Le dosage du cholestérol total se fait par une méthode enzymatique colorimétrique. Les esters de cholestérol sont hydrolysés par la cholestérol ester hydrolase en cholestérol libre et acide gras. Le cholestérol libre produit et celui préexistant est oxydé par une cholestérol oxydase en Δ^4 -cholestérone et peroxyde d'hydrogène.

Ce dernier en présence de peroxyde oxyde le chromogène en un composé coloré rouge. La concentration en quinonéimine colorée mesurée à 505 nm est directement proportionnelle à la quantité de cholestérol contenu dans l'échantillon sérique.

III-3) Dosage des triglycérides

Le dosage des triglycérides se fait par une méthode colorimétrique enzymatique. Les triglycérides sont déterminés après hydrolyse enzymatique en présence d'une lipase.

L'indicateur est la quinonéimine formée à partir de peroxydase d'hydrogène, 4-amino – antipyrine et 4-chlorophénol sous l'action de la peroxydase. La concentration en triglycérides est déterminée à une longueur d'onde de 546nm.

III-4) Dosage des vitamines A et E .

Les vitamines E (α tocophérol) et A (rétinol) plasmatiques sont analysées par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse selon la méthode de (ZAMAN et coll.,1993). Cette méthode permet une analyse quantitative basée sur le fait que l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration des vitamines A ou E présente dans le plasma, par comparaison au pic de l'étalon interne, Tocol (LARA SPIRAL, Couternon, France), introduit dans l'échantillon avant l'injection dans le chromatographe.

La phase stationnaire inverse est composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 18 atomes de carbone (colonne C18 ; 200 mm x 4,6 mm ; LARA SPIRAL). La phase mobile est constituée par le mélange méthanol / eau (98/2,V/V),délivrée à un débit constant , 1 ml / min grâce à une pompe (WATERS 501 HPLC POMP) .

Après précipitation des protéines par l'éthanol et addition de l'étalon interne (5 μ g de tocol pour 200 μ l de plasma), les vitamines A et E sont extraites du plasma par l'hexane .

Par la suite, l'hexane est évaporé sous vide . Le résidu est repris dans le méthanol. Les dosages des vitamines A et E sont réalisés par HPLC équipée d'un détecteur à absorption U.V qui permet de détecter le pic correspondant à la vitamine E à 292 nm et celui de la vitamine A à 325 nm.

III-5) Dosage de la vitamine C .

Les concentrations en vitamine C plasmatiques sont déterminées selon la méthode (ROE et coll., 1943) utilisant le réactif Dinitrophenylhydrazine -Thiourée - Cuivre (DTC) et une gamme étalon d'acide ascorbique .

Après précipitation des protéines plasmatiques par l'acide trichloroacétique (10%) et centrifugation, le surnageant est incubé en présence du réactif de coloration (DTC) pendant 3 heures à 37°C. La réaction est stoppée par addition d'acide sulfurique, et la lecture de l'absorbance est réalisée à 520 nm. L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la concentration en vitamine C présente dans l'échantillon. La concentration est déterminée à partir de la courbe étalon obtenue grâce à une solution d'acide ascorbique .

III-6) Dosage de la glutathion peroxydase .

La mesure de l'activité enzymatique se fait selon la méthode de PAGLIA et coll.(1967) modifiée par LAWRENCE et coll.(1976).

On mesure la capacité d'un surnageant à catalyser l'oxydation du glutathion réduit par H_2O_2 . Pour cela, on utilise le recyclage du glutathion par la glutathion réductase (GSSR) : l'oxydation du NADPH qui lui est couplée est utilisée pour suivre la réaction : la vitesse de formation du GSH est donc mesurée en suivant la diminution d'absorbance à 340 nm qui a lieu lorsque le NADPH est converti en $NADP^+$.

Le milieu réactionnel est composé d'une tampon phosphate de potassium 50mM (PH 7,0) renfermant de l'EDTA 1Mm , de l'azide de sodium Na_3N_3 1mM, du NADPH 0,2mM, une unité de glutathion réductase, du glutathion réduit 1mM, du cumène hydroperoxyde 1,5mM ou de l'eau oxygénée 0,25mM. Ainsi 100 μ l d'échantillon sont ajoutés à ce milieu réactionnel .L'ensemble est préincubé à 25°C pendant 5 minutes .La réaction commence par addition de 100 μ l d'une solution de substrat. Une unité de glutathion peroxydase est égale à 1 micromole de NADPH oxydée par minute et par mg de protéine.

III-7) Dosage de la superoxyde dismutase (SOD)

L'activité de cette enzyme est mesurée selon la méthode de PAOLETTI et coll.(1986) et PAOLETTI et coll.(1990). Cette technique de dosage est basée sur la réaction chimique qui génère l'ion superoxyde (O_2^-) à partir de l'oxygène moléculaire en présence d'EDTA, $MnCl_2$ et mercaptoéthanol.

L'oxydation du NADH est liée à la disponibilité des ions superoxyde dans le milieu. Dès que la SOD est ajoutée dans le milieu réactionnel, elle provoque l'inhibition de l'oxydation du NADH.

Le milieu réactionnel contient un tampon triethanolamine -diethanolamine 100mM (PH 7,4), du NADH 7,5mM, EDTA/ $MnCl_2$ 100mM et du mercaptoéthanol 10mM. Une unité de SOD est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber de 50% la vitesse d'oxydation du NADH dans le contrôle.

III-8) Dosage de la catalase

L'activité de cette enzyme est déterminée selon LÜCK (1965). L'absorption d'une solution de H_2O_2 est mesurée à 240nm. En présence de la catalase, la décomposition du peroxyde d'hydrogène conduit à une diminution de cette absorption en fonction du temps; l'activité de l'enzyme peut être calculée à partir de cette diminution. Ainsi 100 μ l de surnageant lysat sont additionnés de 3,0ml de tampon phosphate 66,6 mM (PH7,0) contenant du peroxyde d'hydrogène 14mM. La décomposition du peroxyde d'hydrogène est mesurée au spectrophotomètre à 240nm. Une unité d'activité enzymatique est calculée à partir du facteur K . $K = (2.303/\Delta t)(\log A_1/A_2)$.

Δt correspond au temps de la réaction mesurée en minutes ou $t_2 - t_1$; A_1 est l'absorbance mesurée au temps t_1 , A_2 est lié au temps t_2 . L'activité spécifique est finalement exprimée selon le rapport : K/mg de protéines.

III -9) Dosage de la glutathion réductase.

La réduction du glutathion oxydé par l'enzyme glutathion réductase est couplé à l'oxydation du NADPH. Dans le milieu réactionnel contenant du tampon phosphate (0.12 mol/L, PH 7.2 +EDTA 1mol/L), du glutathion oxydé et du NADPH, l'activité de la glutathion réductase (dans l'échantillon) est déterminée en suivant l'oxydation du NADPH et donc par conséquent la disparition du NADPH du milieu réactionnel, selon la technique de GOLDBERG et coll.(1992).

Par action de la glutathion réductase et NADPH, le glutathion oxydé GSSG est réduit en GSH. La lecture se fait à 340 nm en utilisant le lecteur de microplaques.

On observe ainsi une diminution de la densité optique à 340 nm en fonction du temps. L'activité enzymatique est exprimée en unité (1U représente 1mmol NADPH oxydé par minute).

IV) Détermination du pouvoir antioxydant total (ORAC ;capacité d'absorption du radical oxygéné).

La capacité d'absorption des radicaux oxygénés du plasma (ORAC) est déterminé par une méthode physico-chimique simple selon CAO et coll (1993). Le principe de cette méthode est l'utilisation d'une sonde fluorescente l'APC (allophycocyanine , fluorescente), protéine présente dans les cyanobactéries et les algues rouges. Cette protéine perd sa fluorescence lorsqu'elle est agressé par des radicaux libres. L'ORAC est alors la capacité du plasma à neutraliser les radicaux libres, donc à freiner la perte de fluorescence de l'APC . Dans cette méthode, les radicaux hydroxyles sont générés par Cu^{2+} et H_2O_2 .

Le milieu réactionnel contient 37,5 nM d'APC , $9 \cdot 10^{-6}$ M Cu^{2+} et 0,3% H_2O_2 dans un tampon phosphate 0,075M , PH=7. Ce milieu correspond au blanc de la réaction. 20 μ l de plasma où de trolox (analogue de la vitamine E ,1 μ M) sont ajoutés au milieu réactionnel qui correspond, dans ce cas, à l'essai ou au standard, respectivement .

La fluorescence de l'APC à l'émission 651nm et à l'excitation 598nm, est mesurée toutes les 5 minutes à 37°C jusqu'à disparition totale de la fluorescence(en général 1 heure).

La mesure de la fluorescence se fait grâce à un fluorimètre (SFM₂₅ Kontran Instrument).

L'ORAC de chaque échantillon est calculé en mesurant la surface nette de protection sous la courbe cinétique de la perte de fluorescence de l'APC, Ainsi :

$$\text{ORAC} = (S \text{ échantillon} - S \text{ blanc}) / (S \text{ trolox} - S \text{ blanc})$$

Où S=Aire sous la courbe cinétique de la perte de fluorescence de l'APC.

V) Analyse statistique

Chaque valeur représente la moyenne \pm erreur standard. La comparaison entre les témoins et les diabétiques de type I et de type II est effectuée par le test « t » de student après analyse de variance (logiciel STATISTICA).

NB : tout le protocole expérimental est réalisé au laboratoire UPRES-LIPIDES de l'université de BOURGOGNE, FRANCE, sous la direction du Professeur KHAN.NA.

Résultats et Interprétation

I) Teneurs sériques en lipides (Tableau II)

Les teneurs sériques en cholestérol total sont significativement augmentées chez les diabétiques avec insuffisance rénale comparées aux témoins, quelque soit le type de diabète sucré.

Les teneurs sériques en triglycérides sont significativement augmentées chez les diabétiques de type I avec hypertension artérielle et insuffisance rénale comparées aux valeurs témoins .

De plus les teneurs en triglycérides sont significativement augmentées chez les diabétiques de type II quelque soit les complications associées .

II) Statut antioxydant chez les diabétiques insulinodépendant (de type I)

II-1) Teneurs en vitamines A, E et C

Les teneurs sériques en vitamines A et E chez les diabétiques de type I sont significativement diminuées comparés aux valeurs des témoins. Cependant les teneurs en vitamine C ne sont significativement réduites que chez les types I avec hypertension et insuffisance rénale (Figure n°6, TABLEAU III en annexes).

II-2) Activités des enzymes antioxydantes

Les activités de l'enzyme superoxyde dismutase chez les diabétiques avec artériopathie et avec hypertension artérielle sont significativement diminuées comparées à l'activité de cet enzyme chez les témoins ; alors que cette activité chez les diabétiques sans complications et avec insuffisance rénale est plus faible que celle des témoins mais de façon non significative.

Les activités de l'enzyme glutathion peroxydase chez les diabétiques sans complications, chez les diabétiques avec hypertension artérielle et avec artériopathie sont significativement plus faibles comparées à celles obtenues chez les témoins. Pour la glutathion réductase, son activité chez diabétiques sans complications et avec complications est significativement diminuée comparée aux valeurs des témoins.

Concernant la catalase, son activité est réduite chez les diabétiques, mais de façon significative seulement chez les diabétiques avec artériopathie comparés aux témoins (Figure n°7, TABLEAU IV en annexes).

Tableau N° 2 : Teneurs sériques en lipides chez les diabétiques et les témoins.

	<i>Témoins</i>		<i>Sujets diabétiques</i>							
	<i>Témoins 1</i>	<i>Témoins 2</i>	<i>Type1</i>				<i>Type2</i>			
	<i>20-40 ans</i>	<i>40-60 ans</i>	<i>D.SC</i>	<i>D.A</i>	<i>D.HTA</i>	<i>D.IR</i>	<i>D.SC</i>	<i>D.A</i>	<i>D.HTA</i>	<i>D.IR</i>
Cholestérol Total (mmol/L)	5,7±0,4	5,4±0,5	5,4±0,6	5,5±0,4	6,0±0,6	7,2±0,3*	5,8±0,5	6,1±0,6	6,1±0,4	6,69±0,3
Triglycérides (mmol/L)	1,3±0,2	1,0±0,3	1,3±0,2	1,4±0,2	2,0±0,4*	2,3±0,3*	1,9±0,3*	2,6±0,4*	2,8±0,4*	2,4±0,3*

D.SC = Diabète sans complications.

D.A= Diabète avec artériopathie.

D.HTA = Diabète avec Hypertension artérielle.

D.IR : Diabète avec insuffisance rénale.

Chaque valeur représente la moyenne ± ES, la comparaison des moyennes est effectuée par le test " t" de student.

Pour les diabétiques comparés aux témoins, * P<0,05.

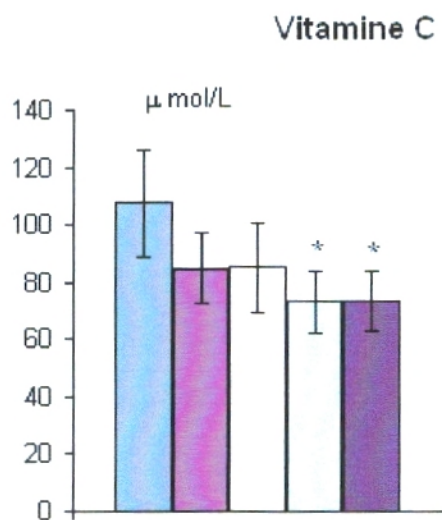
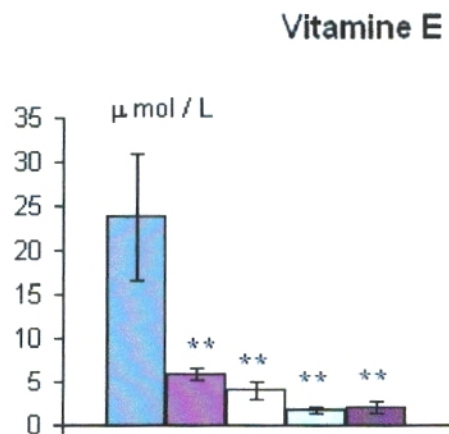
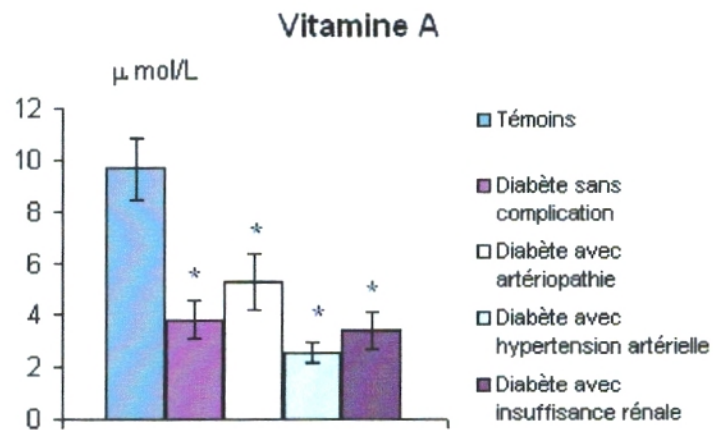
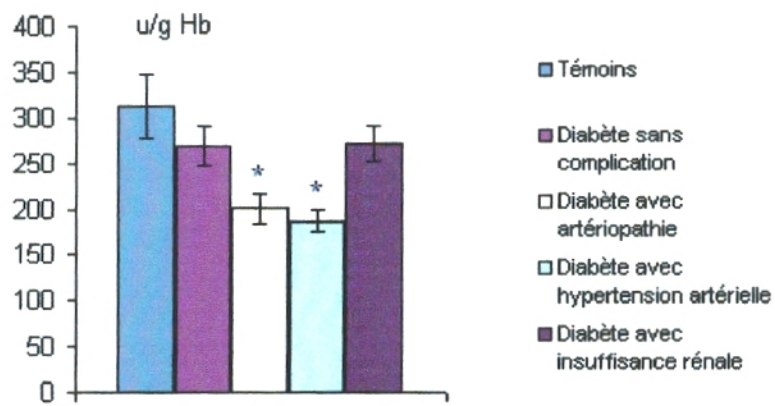
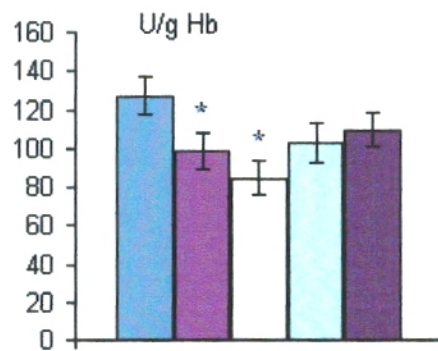


Fig n°6 : Teneurs sériques en vitamines chez les diabétiques de type I et chez les témoins
 Chaque valeur représente la moyenne ± ES, la comparaison des moyennes est effectuée par le test " t" de student. Pour les diabétiques comparés aux témoins, * P<0,05.

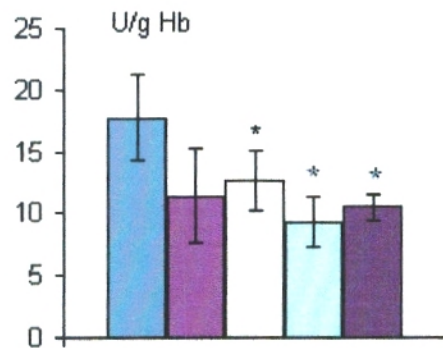
Superoxyde dismutase



Glutathion peroxydase



Glutathion Réductase



Catalase

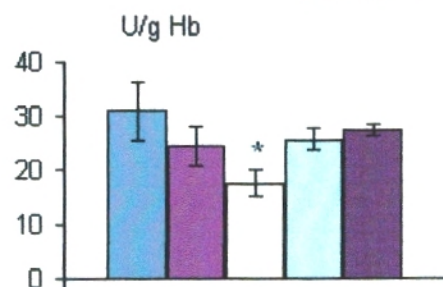


Fig n°7 : Activités des enzymes antioxydantes chez les diabétiques de type I et chez les témoins

III) Statut antioxydant chez les diabétiques non insulinodépendants

(de type II)

III-1) Teneurs en vitamines A, E et C

Les teneurs en vitamines A et E chez les diabétiques de type II sont significativement diminuées comparées aux valeurs des témoins et ceci quelque soit les complications associées. Cependant les teneurs en vitamine C sont semblables à celles des témoins .

(Figure n° 8 ,TABLEAU III en annexes) .

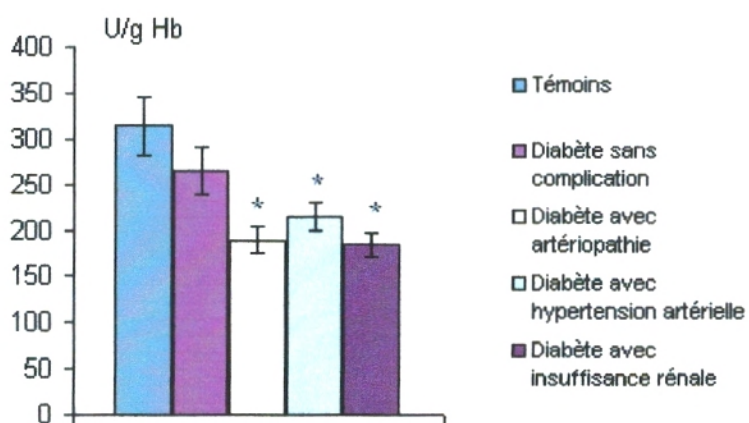
III-2)Activités des enzymes antioxydantes

Les activités de l'enzyme superoxyde dismutase chez les diabétiques avec complications sont significativement diminués comparées aux valeurs témoins alors que cette activité chez les diabétiques sans complications est semblable à celle des témoins. L'activité de la glutathion peroxydase chez les diabétiques avec artériopathie et hypertension artérielle est significativement plus faible que celle des témoins ;les autres variations sont non significatives .

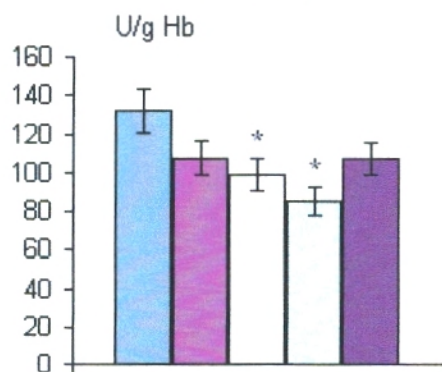
L'activité de la glutathion réductase chez les diabétiques avec artériopathie et avec hypertension artérielle est significativement diminuée comparée aux valeurs témoins, alors que cette activité chez les diabétiques sans complications et avec insuffisance rénale reste semblable à celle des témoins .

Les activités de la catalase chez les diabétiques sans et avec complications sont significativement diminués comparée aux valeurs témoins (Figure n°9,TABLEAU IV en annexes).

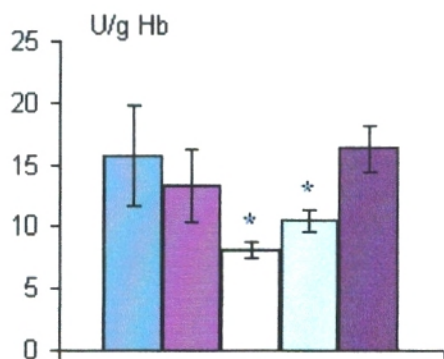
Superoxyde dismutase



Glutathion peroxydase



Glutathion Réductase



Catalase

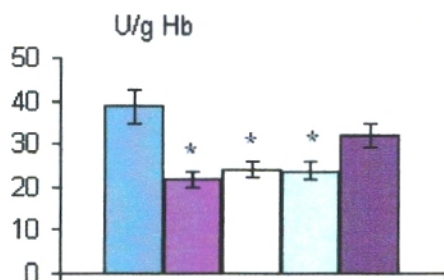
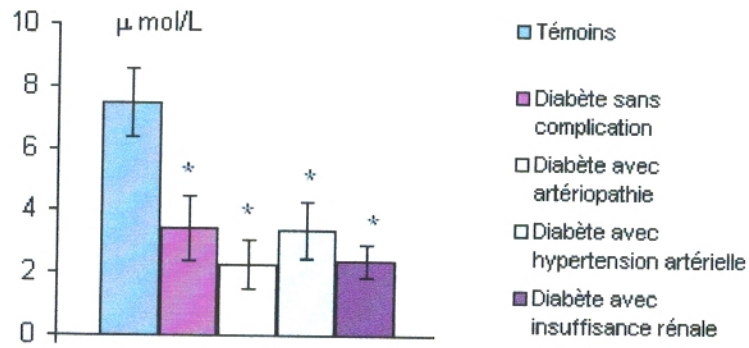
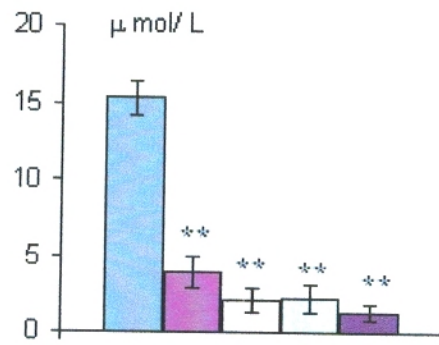


Fig n°9 :Activités des enzymes antioxydantes chez les diabétiques de type II et chez les témoins

Vitamine A



Vitamine E



Vitamine C

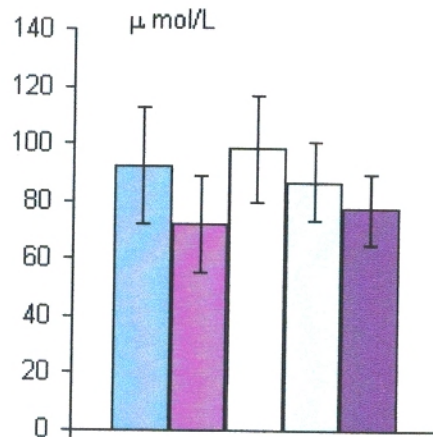


Fig n°8 : Teneurs sériques en vitamines chez les diabétiques de type II et chez les témoins
Chaque valeur représente la moyenne \pm ES, la comparaison des moyennes est effectuée par le test " t" de student. Pour les diabétiques comparés aux témoins, * $P < 0,05$.

IV) Pouvoir antioxydant total (ORAC)

IV-1) Mise au point méthodologique

La méthode choisie est basée sur l'utilisation d'une sonde fluorescente : allophycocyanine (APC) sensible au stress oxydatif généré par H_2O_2 et Cu^{2+} (générateur de radicaux libres).

L'utilisation du trolox ; analogue hydrosoluble de la vitamine E sert à protéger la sonde qui est mise en présence de H_2O_2 et Cu^{2+} . Ceci se traduit par une perte rapide de la fluorescence (blanc). Si la sonde est mise avec H_2O_2 et Cu^{2+} , et en plus le trolox, il y a une certaine protection. (fig n° 10, Tableau V en annexes).

Ainsi, la perte de fluorescence est moins rapide au cours du temps. Il y a donc un décalage de la courbe en fonction du temps (30min à 60 min). La présence du sérum d'un sujet témoins dans le milieu d'incubation induit aussi la protection de la sonde, car dans le sérum, il y a plusieurs antioxydants comme vitamines A, E et C, albumine, bilirubine, enzymesect .

La courbe obtenue en présence du sérum témoin se rapproche de celle du trolox. En présence d'un sérum d'un sujet diabétique, la protection de la sonde est moins importante que celle du témoin. Nous remarquons qu'en présence d'un sérum témoin, la perte de 50% de la fluorescence de l'APC se fait après environ 40min, alors qu'en présence d'un sérum diabétique, la perte de 50% de fluorescence est notée après 15 à 20 min. Ceci traduit un pouvoir antioxydant total chez les diabétiques plus faible que chez les témoins.

IV -2) ORAC chez les diabétiques et chez les témoins

IV-1-1) ORAC chez diabétiques de type I

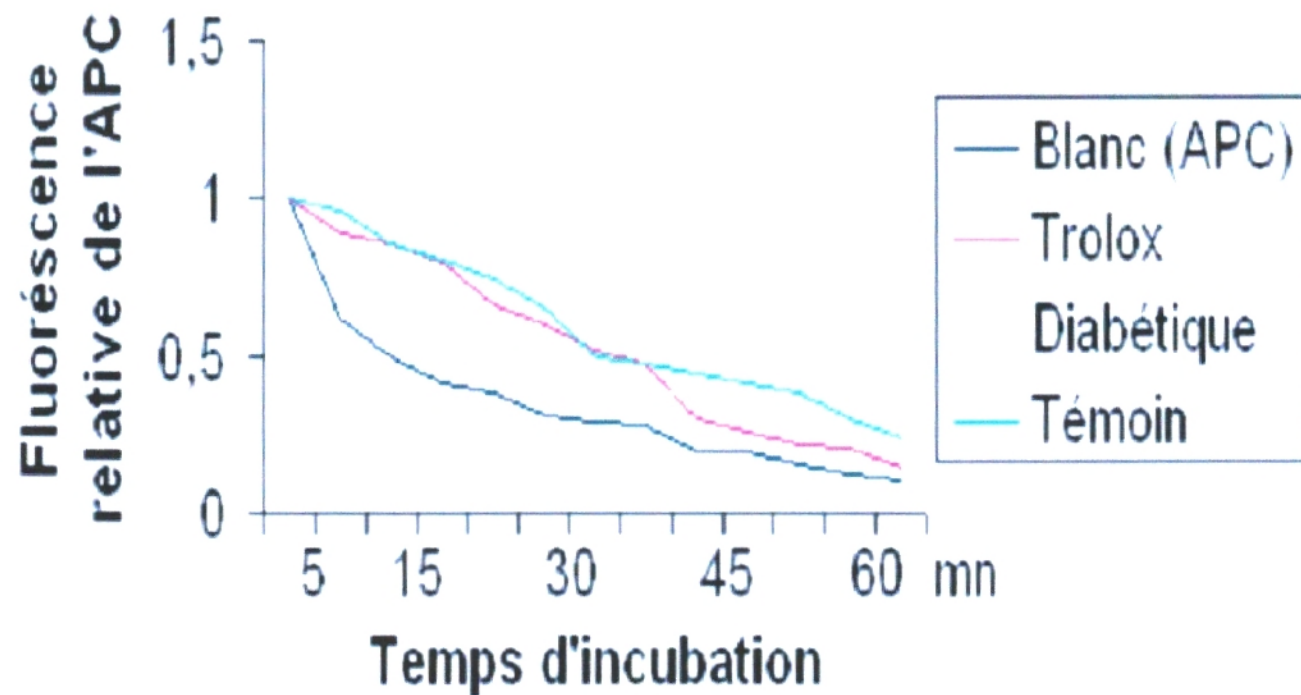
L'ORAC est significativement diminué chez les diabétiques de type I quelque soit les complications associées comparé aux valeurs des témoins (Fig n°11, TABLEAU VI en annexes).

IV-1-2) ORAC chez les diabétiques de type II

L'ORAC est significativement diminuée chez les diabétiques de type II quelque soit les complications associées comparé aux valeurs témoins (Fig n° 11 , TABLEAU VI en annexes)

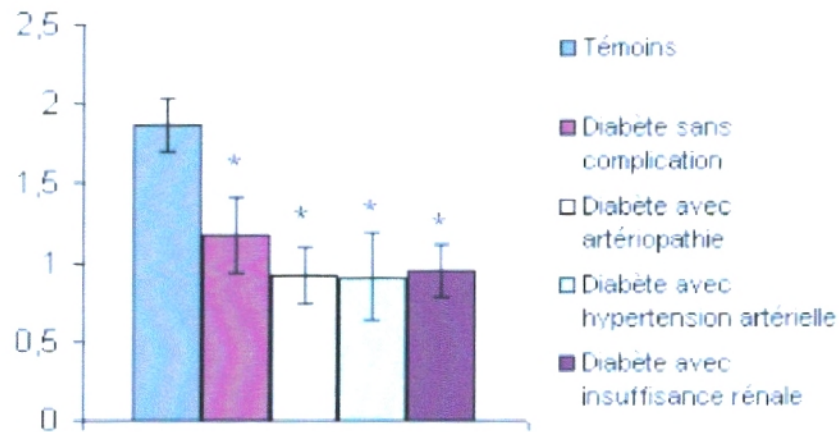
Discussion

Fig n° 10 : Courbe cinétique de la perte de la fluorescence de l'APC



Diabète de type I

Unité Trolox



Diabète de type II

Unité Trolox

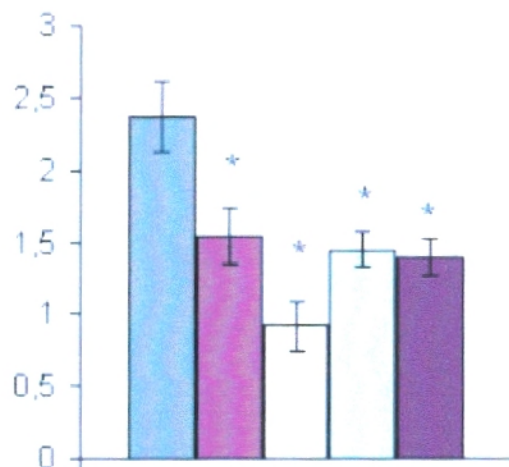


Fig. n° 11 :ORAC chez les diabétiques de type I et de type II

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES, la comparaison des moyennes est effectuée par le test " t" de student. Pour les diabétiques comparés aux témoins, * $P < 0,05$.

L'augmentation du stress oxydatif au cours du diabète peut résulter d'une production accrue de radicaux libres et / ou d'un déficit en antioxydants. Dans cette étude le statut antioxydant (enzymes, vitamines) est déterminé chez des patients diabétiques de type I et de type II afin de voir l'impact du diabète sur ce statut antioxydant de l'organisme. De plus, la sélection des diabétiques avec différentes complications (HTA, MCV, insuffisance rénale) permet d'évaluer l'aggravation du stress oxydatif par les complications associés au diabète .

Les teneurs en vitamines A, E et C ainsi que l'activité des différents enzymes comme la catalase, superoxyde dismutase, glutathion peroxydase et réductase sont donc étudiées chez les diabétiques de type I et de type II sans complications, ainsi que chez les diabétiques avec différentes complications (insuffisance rénale, hypertension artérielle, artériopathie) et sont comparées à leurs témoins respectifs.

Nos résultats montrent que le pouvoir antioxydant total (ORAC) chez les diabétiques est plus faible que celui des témoins. Plusieurs auteurs montrent que l'ORAC est un bon indice du stress oxydatif chez les diabétiques (Courderot -Masuyer et coll., 2000). L'évidence récente indiquant des dommages oxydants accrus chez les diabétiques de type I et de type II associés à des déficits en enzymes et vitamines antioxydantes est donc bien reflétée par la réduction de l'ORAC.

Dans l'étude réalisée par (Vijayalingam et coll., 1996), les patients diabétiques montrent une activité antioxydante sérique totale considérablement plus faible que celle des témoins , en accord avec nos résultats .

Les antioxydants peuvent agir à deux niveaux : en prévenant la formation de radicaux libres oxygénés (antioxydants primaires) ou en épurant les radicaux libres oxygénés (antioxydants secondaires).

En complément de cette double ligne de défense, l'organisme est en outre capable de réparer ou d'éliminer les molécules endommagées par l'attaque radicalaire (BUETTNER et coll., 1996). Le diabète aussi bien de type I que de type II est caractérisé par une augmentation de l'activité des radicaux libres et une réduction des défenses antioxydantes (LAIGHT et coll., 2000).

L'oxygène, les défenses antioxydantes, et le statut redox cellulaire devraient maintenant être considérés comme les joueurs centraux dans le diabète et le syndrome métabolique (WEST., 2000).

Des concentrations élevées en glucose extra ou intracellulaires induisent un stress oxydant défini comme un déséquilibre entre pro-oxydant et antioxydants.

Plusieurs mécanismes semblent impliqués dans la genèse de ce stress oxydant, comme il est démontré dans le diabète expérimental chez l'animal (WITTMAN et coll.,1996) et dans les diabètes de type I et de type II chez les patients: autoxydation du glucose, glycation des protéines, formation des produits de glycation avancés, et voies des polyols (CERIELLO et coll., 1998).

Inversement , le stress oxydant peut être à l'origine du diabète de type I en particulier par un mécanisme d'apoptose des cellules bêta pancréatiques , ou d' insulino-résistance dans le diabète de type II (DE FRANZO et coll.,1999).

L'équilibre glycémique joue un rôle très important dans la balance prooxydant/antioxydant. Le diabète qu'il soit DID ou DNID est susceptible de provoquer des complications à moyen et long terme. L'apparition de ces complications est fonction de l'équilibre et du contrôle du diabète.

Lorsqu'il n'est pas traité, le DID évolue invariablement vers un coma-acido-cétosique et la mort. Mais malgré le traitement à base d'insuline, les complications restent très fréquentes et nombreuses tels que les macroangiopathies touchant les artères responsables de l'hypertension artérielle, accidents cardiovasculaires, et insuffisance rénale.

Nos résultats montrent que les valeurs les plus faibles de l'ORAC sont retrouvées chez les diabétiques avec complications. Ceci est en faveur du rôle du stress oxydatif dans le développement des complications au cours du diabète (BAYNES et coll.,1999).

L'ORAC reflète la balance oxydant /antioxydant globale de l'organisme. Mais pour mieux apprécier la défense antioxydante, nous avons dosé les vitamines sériques et les activités des enzymes érythrocytaires antioxydantes.

Dans notre travail, les teneurs en vitamines A et E ainsi que les activités des enzymes antioxydantes sont diminuées chez les diabétiques sans ou avec complications associées en les comparant aux valeurs trouvées chez les témoins.

Même si les mécanismes de défense mis en jeu sont différents, le dispositif mis en jeu permet d'assurer une protection anti-radicalaire sur l'ensemble de l'espace cellulaire. Tous les acteurs de cette lutte ne sont pas seulement complémentaires, ils sont synergiques. On oppose parfois la protection enzymatique, capable de métaboliser un grand nombre de radicaux libres, à la protection des scavengers (GODIN et coll.,1998) qui seraient systématiquement consommés pour chaque molécule radicalaire détruite.

En fait, dans une certaine mesure, les scavengers peuvent être recyclés. Par exemple, le radical vitamine E peut être réduit par la vitamine C, elle-même secondairement réduite par

un processus enzymatique.

Les premières études concernant le rôle du stress oxydatif dans les lésions bêta ont eu pour cadre la physiopathologie de la destruction insulaire. Les cellules bêta sont particulièrement vulnérables au stress oxydatif en raison d'une part de leur pauvreté en Cu /Zn superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase (GRANKVIST et coll.,1981 ; LENSEN et coll.,1996), d'autre part de leur faible contenu en glutathion réduit (AMMON et coll., 1983).

Des cellules insulino-sécrétrices , surexprimant la glutathion peroxydase, la catalase ou la Cu /Zn superoxyde dismutase sont protégées contre l'effet délétère d'agents oxydants. La surexpression de la catalase dans les îlots humains les protège contre le stress oxydatif. Ces études montrent l'intérêt d'étude des défenses antioxydantes au cours du diabète (TIEDGE et coll., 1999; KRALIK et coll., 1998).

Dans la littérature, les résultats concernant les vitamines chez les diabétiques sont très variables selon les auteurs. (MAKIMATTILA et coll.,1999) rapportent que les teneurs en vitamine C et E chez les diabétiques de type II sont similaires à celles des témoins ,par contre les concentrations en vitamine A sont faibles. Par contre, SUNDARM et coll.(1996) montrent des teneurs faibles en vitamines C et E chez les patients diabétiques .

Dans notre étude, les faibles teneurs en vitamines A et E peuvent être en faveur de leur utilisation accrue, suggérant des besoins importants afin de réduire le stress oxydatif chez les diabétiques.

D'un autre côté, les faibles concentrations en vitamines A et E peuvent refléter une consommation réduite de ces vitamines, d'où diminution du système de défense antioxydant chez les patients diabétiques quelque soit les complications associées. Il apparaît clairement qu'une supplémentation en vitamines A et E chez les diabétiques peut être très bénéfique. En effet, plusieurs auteurs se sont intéressés aux effets d'une supplémentation alimentaire en vitamines GOKKUSU et coll .(2001) indiquent que l'administration de la vitamine E réduit la glycémie chez les DNID, et améliore la sensibilité des tissus à l'insuline.

PAOLISSO et coll (1993) ont trouvé qu'un traitement par la vitamine E augmente l'utilisation globale du glucose et en particulier son utilisation non oxydative.

Dans le diabète insulino-dépendant, la vitamine E traite les rétinopathies et normalise la fonction rénale à des doses de 1800 UI par jour (120 fois d'AQR; AQR: apports quotidiens recommandés (JAIN et coll.,1996).

BIERRENBAM et coll (1985) ont aussi mis en évidence que des patients souffrant de

diabète ont des niveaux anormalement élevés de radicaux libres et de faibles taux de vitamines E par rapport à des sujets en bonne santé .

La supplémentation en vitamine E réduit le stress oxydatif chez les hommes diabétiques. Les dommages induits par la peroxydation lipidique sont significativement diminués après une supplémentation de 1000 UI de vitamine E chez les diabétiques de type I (VITASSERY et coll., 1983).

Des études statistiques de l'université de Harvard ont montré ,d'une part que les personnes prenant des compléments de vitamine E quotidiennement avaient un risque cardiovasculaire de 25 à 33 % inférieur à la moyenne de la population Américaine ,et d'autre part que les personnes âgées de plus de 65 ans soumis à la supplémentation en vitamine E ont un risque de mortalité globale réduit de 27%, le risque de mortalité cardiaque de 41% et les décès par cancers de 22 % (BROWN et coll., 2000).

Dans les travaux concernant les rétinopathies et les insuffisances rénales liées au diabète réalisés par BURSELL et coll. (1999), les patients sélectionnés diabétiques ont reçu 1800 UI de vitamines E naturelle pendant 4 mois. Leurs résultats font apparaître que la circulation sanguine rétinienne s'est améliorée jusqu'au niveau de celle de sujets non diabétiques témoins, et que la fonction rénale était redevenue normale.

L'insulinorésistance, une incapacité à utiliser correctement l'insuline pour brûler le glucose, précède le diabète de l'adulte et est caractéristique du diabète déclaré. Des niveaux élevés de glucose restent alors dans le sang ou ils génèrent des radicaux libres. Des chercheurs ont étudié 36 sujets non diabétiques en bonne santé et ont mesuré leurs taux sériques de glucose, d'insuline, des produits de l'oxydation lipidique et d'antioxydants.

Les résultats ont montré que des taux élevés en glucose et en produits de l'oxydation des lipides étaient fortement associés à une tension élevée, une complication courante chez les diabétiques. Par ailleurs, des taux élevés de glucose étaient associés à de faibles taux en vitamine E, de bêta -carotène et de lutéine (ROBERTSON et coll .,2000).

De nombreuses études dans différents modèles d'animaux avec un diabète de type II confortent l'hypothèse selon laquelle le stress oxydatif est impliqué dans les mécanismes de la glucotoxicité.

La corrélation entre stress oxydatif et hyperglycémie est bien connue dans le domaine des complications secondaires du diabète (BAYNES, 1991). Plus récemment, il a été proposé que le stress oxydatif représente un mécanisme par lequel l'hyperglycémie chronique aggrave le dysfonctionnement de la cellule bêta dans le diabète de type II (hypothèse de la

glucotoxicité) (ROBERTSON et coll., 2000).

Nos résultats montrent que les activités des enzymes antioxydantes sont réduites chez les diabétiques. Plusieurs études ont été réalisées sur les enzymes antioxydantes. Une diminution de la superoxyde dismutase et de la catalase est observée chez les patients présentant une intolérance au glucose, chez qui une diminution de l'acide ascorbique et du glutathion réduit est également déjà présente (VIJAYALINGAR et coll., 1996).

Très récemment, l'équipe de JOEL PINCEMAIL.(2001) à l'université de Liège (Belgique) a comparé le statut antioxydant d'un groupe de 20 jeunes femmes âgées de 18 à 30 ans et d'un groupe d'un nombre égal de femmes dont la moyenne d'âge était de 55 ans. Les chercheurs ont relevé que les activités des deux enzymes-clés, SOD et GPX sont plus réduites dans le deuxième groupe de 6,7% et 12 % respectivement.

Chez des patients atteint d'inflammation chronique (arthrose polyarthrite rhumatoïde.....) une régression de 22% de l'activité de la SOD et 42 % de l'activité de la glutathion -peroxydase est constatée. Les altérations de l'activité enzymatique sont souvent associés à des carences en vitamine C et E (MORAZZONI et coll .,1996).

Nos résultats montrent que la SOD est réduite chez les diabétiques de type II, quelque soit la complication associée. Les activités de la glutathion réductase et peroxydase sont cependant réduites chez les diabétiques de type I, mais non chez les diabétiques de type II.

La catalase est par contre faible chez tous les diabétiques avec ou sans complications. Nos résultats sont en accord avec ceux de (RAMAZAN et coll., 2000) qui décrivent une diminution de l'activité SOD érythrocytaire chez les diabétiques de type II. KEDZIORA et coll.(1998) notent une réduction des activités SOD et catalase chez les diabétiques de type II comparés aux témoins. RUIZ et coll.(1999) indiquent une faible activité de glutathion peroxydase chez les diabétiques de type I alors que la SOD reste normale, en accord avec nos résultats.

Les altérations des activités des enzymes érythrocytaires sont liées au contrôle glycémique au cours du diabète. Il a été démontré que la glycation de ces enzymes provoque une diminution de l'activité enzymatique, notamment pour la SOD (BONNEFONT - ROUSSELOT et coll.,2000). L'activité de la peroxydase est réduite d'une façon importante lorsque le diabète est associé à des complications (UZEL et coll., 1987). De plus, KEDZIORA et coll (1998) indiquent que les activités de SOD et catalase sont très basses lorsque le diabète est compliqué d'une néphropathie.

L'activité catalase reflète généralement le contrôle glycémique lors du diabète. Il a été

bien démontré que la catalase est réduite lorsque le diabète est mal contrôlé (KEDZORIA et coll.,1998; SOZMAN et coll.,1999). Il apparaît clairement que l'activité des enzymes antioxydantes est liée au contrôle métabolique au cours du diabète. Ainsi, un mauvais contrôle entraîne une réduction des activités antioxydantes, soit du système de défense, ce qui aggrave le stress oxydatif au cours du diabète.

Conclusion

Dans ce travail, le pouvoir antioxydant est déterminé chez les patients diabétiques afin d'évaluer le stress oxydatif au cours du diabète.

Les résultats obtenus indiquent que les teneurs en vitamines A et E chez les patients diabétiques avec ou sans complications sont significativement diminuées comparées aux valeurs témoins. De plus, les activités des enzymes antioxydantes comme la catalase superoxyde dismutase, glutathion peroxydase et réductase sont significativement réduites chez ces patients diabétiques. Il apparaît clairement que la balance oxydant / antioxydant est altérée au cours du diabète.

Tous les être vivants ont été contraints de relever cet extraordinaire challenge : se protéger de l'oxygène, un élément dont ils ont un besoin crucial pour vivre. C'est ainsi que nous produisons tous des enzymes antioxydantes comme la catalase, superoxyde dismutase ou encore la glutathion peroxydase. Elles ont pour mission de neutraliser les radicaux libres avant qu'ils n'infligent des dégâts trop importants aux tissus. Nous puisons aussi dans l'alimentation d'autres antioxydants comme les vitamines C, E et les caroténoïdes. Malheureusement, ce système de protection reste insuffisant, surtout dans le cas de certaines maladies métaboliques, comme dans le diabète sucré.

La médecine cellulaire moderne fournit une avancée dans la compréhension des causes, de la prévention et de la thérapie complémentaire du diabète chez l'adulte. Le début de la maladie est fréquemment provoqué ou aggravé par une carence en certaines vitamines et autres nutriments essentiels dans les cellules β du pancréas, du foie, des parois vasculaires et d'autres organes.

Sur la base d'un diabète héréditaire, une carence en vitamines et autres nutriments essentiels peut déclencher un métabolisme diabétique et le début de la maladie de l'adulte.

Ainsi les résultats trouvés au sein de notre étude sur les teneurs faibles des vitamines A et E, aussi l'activité diminuées des enzymes antioxydantes chez les diabétiques nous oblige à conclure que la consommation régulière des vitamines en revanche, peut prévenir l'apparition de la maladie chez l'adulte ainsi que ses complications.

Il y'a maintenant suffisamment de preuves pour conclure que des interventions pour corriger le stress oxydatif ont des effets biologiques positifs. Cependant, les effets des suppléments antioxydants sur des processus pathologiques sont vraiment relativement minimes bien que toute une vie d'exposition pourrait avoir un bénéfice cumulatif.

Il est utile de rechercher des effets sur la santé à plus long terme. Enlever ou éviter des sources ajoutées de radicaux libres (ex :fumer, ou mauvais contrôle du diabète) auront probablement plus de chances de réussir que des tentatives pour corriger le stress oxydatif.

Le diabète est donc associé à des altérations du système de défense antioxydant qui peuvent aggraver les complications associées à cette maladie.

Tout déséquilibre (en rapport avec une augmentation de la production radicalaire ou une diminution de défense) est susceptible d'entraîner des dégâts cellulaires qui pourraient être à l'origine de certaines pathologies et qui dans tous les cas aggravent la pathologie préexistante. Une prise en charge du statut antioxydant du diabétique est nécessaire pour l'évaluation favorable de cette pathologie.

Références Bibliographiques

- 1) **AMERICAN-DIABETESASSOCIATION (ADA)**,(1998). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes.Diabetes care 21:5-19.
- 2) **AMERICAN DIABETES ASSOCIATION**,(1997). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care .20:1183-1197.
- 3) **AMMON.HP; HAGELE.R.YOUSSIF.N.**,(1983).A possible role of intracellular and membrane thiols of rat pancreatic islets in calcium uptake and insulin release. Endocrinology.112:720-726.
- 4) **BAYNES .JW.**,(1991). Role of oxidative stress in developement of complications in diabetes.Diabetes care .40:405-412.
- 5) **BAYNES.JW;THORPE.SR.**,(1999). Role of oxidative stress in diabetic complications.Diabetes. 48:1-9.
- 6) **BIERENBAUM. ML; NOONAN. FJ; STIER. A;WATSON. PB.**,(1985).The effet of supplementation vitamin on serum parameters in diabetic patients postcoronary and normal subjects. Nutr resp int 31:1171-1180.
- 7) **BOYLE.SP; DOBSON.VL ; DUTHLE.SJ .**,(2000). Bioavailability and efficiency of rutin as an antioxidant :A human supplementation study.Eur J CLIN Nutr.54:774-782
- 8) **BONNEFONT-ROUSSELOT.D; LEGRAND.A.**,(2000). Biomarkers of oxidative stress :an analytical approach .Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab.Care. 3:373-384.
- 9) **BROWN. K.M ;MORRICE .P.C .**,(2000). Dose reponse to vitamin E supplementation.Am j clin nutr.157: 226-232.
- 10) **BUETTNER.GR; JURKIEWIZ.BA.**,(1996). Catalytic metals, ascorbate and free radicals:conbinaisons to avoid. Radiat. Res. 145:532-541.
- 11) **BURSELL.S.E; CLERMOND.AC; ALLELLO.LP.**,(1999). High dose vitamin supplementation normalizes retinal blood floww and creatinine clearance in patients with type I diabetes. Diabetes care. 22:1245-1251.
- 12) **CAO .G ; ALESIO .HM; CUTLER. RG**,(1993). Oxygen radical absorbance capacity assay for antioxidants, free RAD-BIOL .14:303-311.
- 13) **CERIOLO.A; BORTOLOTTI .N; CRESCENTINI .**,(1998).Antioxidant defences are reduced during the oral glugose tolerance test in normal and non insulin-dependent dibetic subjects. Eur j clin invest .28:329-333.
- 14) **CERIOLO.A; GIUGLANO.D.**,(1998). Oxidative stress and diabetic complications. In international .Text book of diabetes ;1453-1468.
- 15) **CHRISTEN.WG; GAZIANO.JM; HENNEKEMS.CH.**,(2000). Design of physicians' Health Study II-A randomized trail of Beta -carotene , vitamin C and E , and multivitamins, in prevention of cancer, cardiovascular disease and eye disease, and review of results of completed trials . Ann Epidemiol .10:125-134.
- 16) **COURDEROT-MASUYER.C ; DALLOZ.F ; MAUPOIL.V.**,(2000). Antioxidant and oxydative stress. Nutrition Res. 13:535-540.
- 17) **CORROCHER. R; CASARIL. M; GUIDI. C.**,(1980). Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities of normal and pathological human liver: relationship with age. Scand. J. Gastroent .15:781-786.
- 18) **CZYZYK.A ; SZCZEPANIK.Z.**,(2000). Diabetes mellitus and cancer. Eur. j .Inter med.11:245-252.

- 19) **DE FRONZO .RA.**,(1999).Pathogenesis of type I diabetes : metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes .*Diabetes rev .5:177-269.*
- 20) **DE MATTIA.G ; BRAVI.MC ; LAURETIO.**,(1998). Influence of reduced glutathion infusion on glucose metabolism in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus . *Metabolism.47: 993-997.*
- 21) **DELCOURT C ; PAPOZ.L.** ,(1994). Le diabète et ses complications dans la population française .Edition inserm. 250:1-2, 18-22.
- 22) **DEMPLE .B ; CUEVAS CF .** ,(1991) .The control of oxidative stress responses , oxidative stress and insulin action in non-dependant (type II) diabetic patients. *Metabolism Cell. 67: 837-839.*
- 23) **DENYS .S.**,(1999). Nouvelle classification du diabète . *Propos biopharma .107 : 29-30.*
- 24) **FERREIRA.S; GIMEMO.SGA; FRANCO.LJ; LUNES M.**,(1998).Insulin deficiency or resistance as the initiating factor of glucose in tolerance in japanes migrants. 34 annual meeting of European association for the study of diabetes, Barcelona. *Diabetologia . 41:194-758.*
- 25) **FONTAINE .E.**,(2002). Production et élimination des radicaux libres oxygénés. *J. diabétologie .16 :1-4.*
- 26) **FUJIMOTO WY. ,** (1996). Over review of non insulin dépendant diabetes mellitus (NIDDM) in different population groups diabetes. 13 : 57-62.
- 27) **GAZIS .A; PAGE .S .** ,(1997). Vitamin E and cardiovascular protection in diabetes : antioxidants may offer particular advantage in this high risk group. *BMJ. 314:1845-1851 .*
- 28) **GINSBERG.H.A.**, (1991). Lipoprotein physiology in non diabetic and diabetic states relation ship to atherogenesis . *Diabetes care. 14: 839-855.*
- 29) **GODIN .DV; GARNETT. ME; WOHAIEB .SA.** ,(1998). Antioxidants enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. *Mol cell biochem . 84:223-231.*
- 30) **GOKKUSO.C; PALANDUZ.S; ADENOGLU.E; TAMER.S.**,(2001). Oxidant and antioxidant systems in NIDDM Patients:influence of vitamin E supplementation. *Endocri. Res.27:377-386.*
- 31) **GOLDBERG.DM; SPOONER.RJ.**,(1992). Glutathione reductase. In:methods of enzymatic analysis.3rd ed .Bergmeyer. 258-265.
- 32) **GRANKVIST.K ; MARKLUND.SL ; TALJEDAL.IB .** ,(1981).CuZn–Superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues . *Biochem J.199 : 393-398 .*
- 33) **GRANNER. D.K; O'BRIEN, R.M .** ,(1992) . Molecular physiology and genetics of NIDDM. Importance of metabolic staging .*Diabetes care.15 : 369-375 .*
- 34) **GUETTERIDGE.JM.**,(1993). Free radicals in disease processes : a compilation of cause and consequences. *Free radic Res Commun. 19: 141-158 .*
- 35) **HALIWELL.B .**,(1994). Free radicals, antioxidants, and human disease : curiosity, cause or consequence ? *Lancet .344:721-724.*
- 36) **HERCBERG.S ; PREZIOSI.P ;BRIANCON.S.**,(1998). A primary prevention trial using nutritional doses of antioxidant vitamins and minerals in cardiovascular diseases

- and cancers in a general population :The SU.VI.MAX study, design, methods, and participant characteristics. *Control clin trials* 19:336-351.
- 37) **IHARA.Y; YAMADA.Y ; TOYOKUNI S.,**(2000). Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic control .*Diabetes.*48:927-932.
 - 38) **JAIN. SK ; MC VIE. R ; JAMILLO. JJ ; PALMER. M ;SMITH. J.,**(1996). Effect of modest vitamin E supplementation on blood glycated hemoglobin and triglyceride levels and red cell indices in type I diabetic patients .*J Am coll nutr.*15:458-461.
 - 39) **JOEL.P.,**(2001) . Antioxydant et diabète .*Rev nut .*66 :135-145.
 - 40) **KEDZIORA K ;ORNATOWSKA.KZ ;PAWLAK.W.,**(1998). Lipid peroxidation and activities enzymes in erythrocytes of patients with non-insulin dependent diabetes with or without diabetic Nephropathy.*Dial.Transplant.*13:2829-2832.
 - 41) **KINGS.H; REWERS .M; WHO.A;HOC.D.,**(1993). Global estimates for prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance .*Diabetes care.* 16:157-177.
 - 42) **KNECHT.KJ; DUNN.JA; THORPE.SR.,**(1991). Effect of diabetes and aging on carbomethyllysine levels in human urine. *Diabetes.* 40:190-196.
 - 43) **KRALIK.PM; XU.B; EPSTEIN.PN.,**(1998). Catalase transfusion decreases hydrogen peroxide toxicity in a pancreatic beta cell line .*Endoc. Res.* 24:79-87.
 - 44) **KUBISCH.HM ; WANG.J; BRAY.TM; PHILIP.JP.,** (1997). Targeted over expression of Cu/Zn superoxide dismutase protects pancreatic beta cells against oxidative stress. *Diabetes.* 46:1560-1566.
 - 45) **LAIGHT.DW; CARRIER.MJ; ANGGARDE.E.,**(2000). Antioxidants diabetes and endothelial function . *Cardiovasc Res.*47:457-464.
 - 46) **LAWRENCE.R ; BURK.S .,** (1976). Determination of glutathione peroxidase in circulating blood cells. *Molecul. Physiol.* 4:313-322.
 - 47) **LEINOMEN.J ; LEHTIMAKIT ;TOYOKUNIS.,**(1997). New biomarkers evidence of oxidative D N A damage in patients with non insulin-dependent diabetes mellitus. *FEBS lett .* 417:150-152.
 - 48) **LENSEN.S; TIEDGE.M.,**(1996). Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissuesfree radical.*Bio med.* 20:463-466.
 - 49) **LE GUEN.CA; JONES.AF.,**(1999). Role of reactive oxygen species and antioxidant .*Ann clin biochem.*29:185-194.
 - 50) **LILLIO.JO.S; MOTTA.DR; SPRAUL.M.,**(1993). Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursor of NIDDM.*N.EJL.J.Med.* 329:1988-1992.
 - 51) **LUCK.J,** (1965). Cell metaboslim .*Manual and biochemical method.*47: 1-108
 - 52) **MAKIMATTILA.S; LIU.ML; SCHLENSKA.A; SYVANNE.M;SUMMANEN.P; TASKINEN.MP; YKI-JARVIMEN.H.,**(1999). Impaired endothelium-dependent vasodilatation in type II diabetes.*Diabetes care.*22:973-981.
 - 53) **MAXWELL.SR ; THOMASON.H ; SANDLER.D .,**(1997). Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin – dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus .*Clin invest .* 27:484-490 .
 - 54) **MIRANDA.S ; OPAZO.C; LARRONDOL.F.,** (2000). The role of oxidative stress in the toxicity inducued by amyloid b- peptide in alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* 62:633-648.

- 55) **MORAZZONI .E;BUMBARDELLI.E.P;** (1996).Hemoglobin catabolism. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme breakdown. *J.Biol.Chem.*229; 189-197.
- 56) **MOREL.Y ; BAROUKI.R .,**(1999). Repression of gene expression by oxidative stress . *Biochem J.*342 :481-496 .
- 57) **O'RAHILLY.S; HATTERLEYA; VAAGA; GRAY.H.,**(1994). Insulin resistance as the major cause of impaired glucose tolerance : a self fulfilling prophecy ? *lancet.* 344:585-589.
- 58) **OPARA .EC ; ABDELRAHMANE ; SOLIMAN.S.,**(1999). Depletion of total antioxidant capacity in type II diabetes. *Metabolisme.* 48:1414-1417 .
- 59) **PAGLIA .D.E;VALENTINE.W.,** (1967) .Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Meth.enzy.*105 : 121-126.
- 60) **PAOLETTI; MOCALI.,** (1990).Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase.*Clin chem.* 37:1935-1945.
- 61) **PAOLISSO.G ; BALBLV; VOLPE.C.,**(1995). Metabolic benefits deriving from chronic vitamin C supplementation in aged non-insulin dependent diabetes .*JAM coll nutr.* 14:387-392.
- 62) **PAOLISSO.G ; D'AMORE.A ; VOLPE.C.,**(1994). Evidence for a relationship between oxidative stress and insulin action in non insulin-dependent (type II) diabetic patients. *Metabolism* .43:1426-1429.
- 63) **PAOLISSO.G ; D'AMORE.A; GIUGLIANO.D .,**(1993). Pharmacologic doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insulino-dependant diabetic patients .*Am J clin Nutr* .57:650-656.
- 64) **PERLUMETER.L ; COLLIN.G.**(1995). Diabète et maladies métaboliques. 2^{em} édition Massan .Paris. 17-112.
- 65) **PAOLETTI; AEBI.H.,** (1986). Studies on CuZn superoxide dismutase in human diseases: a review.In *oxyradicals and their scavengers systems.* *Rew.j.biochem.* 47: 469-474.
- 66) **POLONSKY.KS; STURIS. J; BELL. GI.,**(1996).NIDDM.A genetically programmed failure of beta cell to compensate for insulin resistance .*N.ENJ. Med.*334:777-783.
- 67) **PRATICO.SD; DELANTYN.,**(2000). Oxidative injury in diseases of the central nervous system : Focus on alzheimer disease. *Am.J. Med.*109:577-585.
- 68) **RAMAZAN-SEKEROGLU.M;SAHIN.H;DULGER.H;ALGUN.E.,**(2000). The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathion peroxidase and serum lipid peroxidation in patients with type II diabetes mellitus. *Clin Biochem.*33:669-674.
- 69) **REHMAN.A ; NOUROO.Z; ZADEHJ ;MOLLER.W .,**(1999). Increased oxidative damage to cell D N A bases in patients with type II diabetes mellitus. *FEBES lett.* 448:120-122 .
- 70) **ROBERTSON .RP; HARMON. JS; TAMAKA .Y.,** (2000). Glucose toxicity of beta-cell:cellular and molecular mechanisms :diabetes mellitus . A fundamental and clinical test.2nd edition,philadelphia.125-132.
- 71) **ROE.S;STAHL.W.,**(1943). Dosage of vitamin C. *Biochem.*153:1127-1133 .

- 72) **RUIZ.C; ALGRIA.A; BARBERA.R; FARRE.R; LEGARDE.M.J.**,(1999). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in patients with type I diabetes mellitus. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.*59:99-105.
- 73) **SIES.H.**,(1997) . Antioxidant defense :vitamin E and C and carotenoides .*Diabetes.* 46:14-18
- 74) **SINCLAIR.AJ; GRAY.L; LUNEC.J.**,(1991). Disturbed handing of ascorbic acid in diabetic patients with and without microangiopathy during high dose of ascorbate supplementation .*J Clin Invest .*40:171-175.
- 75) **SLAMA G; ASSAN R; FRECHET P.**, (1990) . *Traité de diabétologie.* Paris, Pardel .867-883 .
- 76) **SLATER.A ; STEFAN.C ; NOBELI ; ORRNIUS .**,(1995). Signaling mechanism and oxidative stress in apoptosis . *Toxicology letter.* 82: 149-153 .
- 77) **SOHAL.RS ; KV.HH; AGARWAL.S.**,(1993). Biochemical correlates of longevity in two closely related rodent species .*Biochemi . Biophys .Res .*196:7-11.
- 78) **SOZMEN.B; DELEM.Y;GIRGIN.FF .**,(1999). Catalase and paraoxonase activities in hypertensive type II DR: correlation with glycemic control. *clin.biochem.* 32: 423-428.
- 79) **SUNDARM.RK; BHASKAR.A; MOHAN .R; SHANM SUNDAM.KR.**,(1996).
Antioxidant status and lipid peroxidation in typeII diabetes mellitus with and without complications. *Clin.sci.* 90:255-260.
- 80) **TEMPLE NJ.**,(2000). Antioxidants and diseases:more questions than answers .*Nutrition Res.* 20 : 449-459 .
- 81) **THORNALLEY.PJ ;MCLELLAN.AC ;LOTW .**,(1996). Negative association between erythrocyte reduced glutathione concentration and diabetic complications. *Clin sci .*91:575-582 .
- 82) **TIEDGE.M; LENSEN.S; MUNDAY.R**,(1999). Protection against the co-operative toxicity of nitric oxide and oxygen free radicals by overexpression of antioxidant enzymes in bioengineered insulin-producing RINm 5F cells.*Diabetologia.* 42:849-855.
- 83) **TISH. R., MEDEIT .H.**, (1996) Insulin dependant diabetes mellitus. *Diabetes.*85 :291-297.
- 84) **UZEL.N; SIVAS.A; UYSAL.M; OZ.H.**,(1987). Erythrocyte lipid peroxidation and glutathione peroxidase activities in patients with diabetes mellitus. *Horm. Metab. Res. Care* 3:373-384.
- 85) **VITASSERY. GT; MORLEY. JE; KUSKOSKI .MA.**,(1983).Vitamine E in plasma and platelets of human diabetic patients and control subjects. *Am j clin nutr .*37:641-644.
- 86) **VELHO.G; FROGUEL.P.**,(1996). Modygenes, Modygand and NIDDM. *Diabetes. Meta.* 23:7-17.
- 87) **VIJAYALINGAM.S ; PARTHIBAN.A.**,(1996). Abnormal antioxidant status in impaired glucose tolerance and insulin-dependent diabetes Mellitus.*Diabet Med.* 13: 715-719.
- 88) **WASSERMAN.WW; FAHLWE.**,(1997). Functional antioxidant responsive element. *Proc Natl Acad Sci USA .*94:5361-5366.

- 89) **WEST.,**(2000). Role of oxygen and expression of antioxidants in diabetes:J int med. 309-314.
- 90) **WILL .JC ; BYERS .T .,** (1996). Does diabetes mellitus increase the requirement for vitamin A,C and E. New Rev .54:193-202 .
- 91) **WITTMAN .I; NAGY.J.,**(1996). Are insulin resistance and atherosclerosis the consequences of oxidative stress .Diabetologia.39:1003-1004.
- 92) **YOSHIDA.K ; HIMOKAWA.J ; TAGARI.S.,**(1995). Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus : regulation of glutathione synthesis and efflux . Diabetologia .38:201-210 .
- 93) **YUZ .DUK; MCLENNAN.S ; FISHER.E.**(1989).Ascorbic acid metabolism and polyol pathway in diabetes.Diabetes.28:257-261.
- 94) **ZAMAN.Z ; FIELDEN.P ; FROST.PG.,**(1993). Simultaneous determination of vitamin A and E and carotenoids in plasma by reversed phase HPLC in elderly and younger subjects . clin. Chem.187 : 2229-2234.

Annexes

Tableau n°III :Teneurs sériques en vitamines A,E,C chez les diabétiques et chez les témoins

		<i>Témoins</i>	<i>Diabète sans complication</i>	<i>Diabète avec artériopathie</i>	<i>Diabète avec hypertension artérielle</i>	<i>Diabète avec insuffisance rénale</i>
Vitamine A (μ mol/L)	Type 1	9,67 \pm 1,2	3,83 \pm 0,7*	5,27 \pm 1,1*	2,58 \pm 0,4*	3,4 \pm 0,7*
	Type 2	7,47 \pm 1,1	3,45 \pm 1,02*	2,28 \pm 0,8*	3,38 \pm 0,9*	2,4 \pm 0,5*
Vitamine E (μ mol/L)	Type 1	23,8 \pm 7,2	5,82 \pm 0,7**	4,01 \pm 1,1**	1,72 \pm 0,4**	2,05 \pm 0,7**
	Type 2	15,28 \pm 1,1	3,89 \pm 1,02**	2,09 \pm 0,8**	2,25 \pm 0,9**	1,33 \pm 0,5**
Vitamine C (μ mol/L)	Type 1	107,5 \pm 18,8	84,97 \pm 12,5	85,23 \pm 15,6	73,24 \pm 11,1*	73,56 \pm 10,5*
	Type 2	92,38 \pm 20,2	72,14 \pm 17,1	98,63 \pm 18,5	87 \pm 13,5	77,5 \pm 12,2

Tableau n°IV :Activité des enzymes antioxydantes chez les diabétiques et chez les témoins

		Témoins	Diabète sans complication	Diabète avec artériopathie	Diabète avec hypertension artérielle	Diabète avec insuffisance rénale
Superoxyde Dismutase	<i>Type 1</i>	312,43±35,2	269,03±22,1	200,57±16,2*	186,47±12,5*	270,61±19,1
	<i>Type 2</i>	314,24±32	264,3±25,9	188,97±14,3*	214,08±15,5*	184,59±13,1*
Glutathion Péroxydase	<i>Type 1</i>	127,2±10	98,55±9,6*	84,67±8,6*	102,87±9,9*	109,5±8,9
	<i>Type 2</i>	131,8±11,2	107,45±8,6	98,73±8,8*	85,33±7,5*	107±7,9
Glutathion Réductase	<i>Type 1</i>	17,75±3,5	11,41±3,8	12,62±2,4	9,32±1,98*	10,5±1,1*
	<i>Type 2</i>	15,71±4,1	13,31±2,9	8,04±0,65*	10,5±0,85*	16,36±1,9
Catalase	<i>Type 1</i>	30,96±5,5	24,48±3,8	17,43±2,4*	25,69±1,98	27,39±1,1
	<i>Type 2</i>	38,73±3,8	21,55±1,87*	24,05±1,9*	23,68±2,1*	32,01±2,9*

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes est effectuée par le test "t" de student. Pour les diabétiques comparés aux témoins,*P< 0 ,05.

Tableau n°V: Perte de fluorescence de l'APC en fonction du temps

<i>Temps (min)</i>	<i>Blanc (APC)</i>	<i>Trolox</i>	<i>Diabétique</i>	<i>Témoin</i>
	1,00	1,00	1,00	1,00
05	0,62	0,89	0,98	0,96
10	0,50	0,86	0,86	0,86
15	0,41	0,80	0,53	0,81
20	0,38	0,66	0,47	0,75
25	0,31	0,60	0,46	0,65
30	0,29	0,52	0,44	0,50
35	0,28	0,48	0,40	0,48
40	0,20	0,30	0,36	0,44
45	0,20	0,26	0,34	0,41
50	0,16	0,22	0,30	0,38
55	0,12	0,21	0,28	0,30

Tableau n°VI : ORAC chez les diabétiques de type I et de type II et chez les témoins

	Diabète de type I	Diabète de type II
Témoins	2,37 ± 0,24	1,87 ± 0,17
Diabète sans complication	1,54 ± 0,20*	1,17 ± 0,24*
Diabète avec artériopathie	0,92 ± 0,17*	0,92 ± 0,18*
Diabète avec hypertension artérielle	1,45 ± 0,12*	0,91 ± 0,28*
Diabète avec insuffisance rénale	1,40 ± 0,13*	0,95 ± 0,16*

ORAC : capacité d'absorption du radical oxygène

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes est effectuée par le test "t" de student. Pour les diabétiques comparés aux témoins, *P < 0,05.

الخلاصة:

يهدف هذا العمل إلى تحديد النظام المضاد للتأكسد للمصابين بداء السكري بمنطقة تلمسان باستخدام التقدير الفيتاميني لكل من فيتامين A و فيتامين E و فيتامين C و إنزيمات الكريات الحمراء المضادة للتأكسد. إضافة إلى القدرة المضادة للتأكسد الكلي (ORAC) الممثلة لمختلف الآليات المدمجة في الدفاع ضد الجذور الفعالة و الحرة و التي تمّ تقديرها عند هذه الفئة من السكان.

تبيّن من خلال النتائج المتحصّل عليها أن الفعالية الكلية و المضادة للتأكسد (ORAC) عند المصابين بداء السكري تتاقصت مقارنة مع الشواهد.

كما أن كميات الفيتامينات المقدّرة و التي منها فيتامينات A ، E تتاقصت بشكل ملحوظ عند المصابين بداء السكري من الفئة I، II و مهما كانت المضاعفات المصاحبة للمريض .

و أن كميات فيتامين C تتاقصت كذلك فقط عند DID مع HTA مع القصور الكلوي.

إن نشاط الإنزيمات المضادة للتأكسد مثل Superoxide Dismutase , Catalase

Peroxidase & Reductase , Glutathione تتاقصت بشكل ملفت عند المصابين بداء السكري

مقارنة مع الشواهد غير المصابة بغضّ النظر عن نوع الداء السكري و كذا المضاعفات المصاحبة.

نستخلص من ذلك كله أن داء السكري تصاحبه مضاعفات و تغيرات على مستوى الجهاز الدفاعي

المضاد للتأكسد و التي من شأنها تعميق المضاعفات الناجمة عن داء السكري.

Résumé

Le but de ce travail, est de déterminer le statut antioxydant des diabétiques dans la région de TLEMCEN par dosage des vitamines sériques A,E et C et des enzymes érythrocytaires antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase et réductase) .

De plus, le pouvoir antioxydant total (ORAC) représentant l'ensemble des mécanismes impliqués dans la défense contre les radicaux libres est aussi analysé chez cette population.

Nos résultats montrent que le pouvoir antioxydant total (ORAC) chez les diabétiques est diminué comparé à celui des témoins.

Les teneurs sériques en vitamines A et E sont significativement diminués chez les diabétiques de type I et II quelque soit les complications associés.

Les teneurs en vitamine C sont seulement réduites chez les DID avec HTA et insuffisance rénale.

Les activités des enzymes antioxydantes tel que catalase, superoxyde dismutase, glutathion peroxydase et réductase sont significativement diminués chez les diabétiques comparés aux valeurs témoins , quelque soit le type du diabète et les complications associés.

En conclusion, le diabète sucré est donc associé à des altérations du système de défense antioxydant qui peuvent aggraver les complications du diabète.