Le stress oxydant au cours du diabète de type 2. Application à la détermination de l'excrétion urinaire de 8-isoprostane chez le patient diabétique

Laure Couaillet

▶ **To cite this version:**

Laure Couaillet. Le stress oxydant au cours du diabète de type 2. Application à la détermination de l'excrétion urinaire de 8-isoprostane chez le patient diabétique. Sciences pharmaceutiques. 2015. dumas-01234601

HAL Id: dumas-01234601

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01234601

Submitted on 27 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE ROUEN

UFR DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 2015 N°

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 29 Octobre 2015

par

Couaillet Laure

Né(e) le 14 Octobre 1984 à Bois Guillaume

Le stress oxydant au cours du diabète de type 2. Application à la détermination de l'excrétion urinaire de 8-isoprostane chez le patient diabétique.

Président du jury : *Dubus Isabelle, Professeur en biochimie*

Membres du jury : *Ziegler Frédéric, Maitre de conférence en biochimie*

Ozenne Geneviève, Diabétologue

Mabilais Caroline, Docteur en Pharmacie

REMERCIEMENTS

Je remercie le Docteur Geneviève OZENNE pour m'avoir accueillie au sein du service d'endocrino-diabétologie.

Je remercie également le Professeur KUHN, chef de ce service, qui m'a permis de réaliser une étude clinique chez des patients du service et je lui sais gréée d'avoir financé l'achat des réactifs nécessaires à l'étude.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude envers M. Frédéric ZIEGLER pour avoir dirigé ce travail et pour m'avoir ouvert les portes du laboratoire de biologie de l'hôpital de Rouen.

Je remercie en outre les membres du jury :
- Docteur Isabelle Dubus, Professeur en biochimie et présidente du jury
- Docteur Frédéric Ziegler, Maitre de conférence en biochimie
- Docteur Geneviève Ozenne, Diabétologue
- Docteur Caroline Mabilais, Pharmacien

Je vous remercie vivement de me faire l'honneur de consacrer une partie pour juger mon travail.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance envers Monsieur et Madame Mabilais, Docteurs en Phamacie à Mesnil Esnard pour avoir intégré leur officine.

J'ai également une petite pensée pour ceux qui au cours de ces années en pharmacie sont devenus des amis Christine, Alexandre, Matthieu. Bon courage à vous qui poursuivez vos études.

Enfin je remercie ma famille surtout mes parents qui s'inquiétaient de la conclusion de mes études.

Merci à toutes les autres personnes qui m'ont soutenue pendant ces années d'étude.

« L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs. »,

ANNEE UNIVERSITAIRE 2014 - 2015

U.F.R. DE MEDECINE ET DE-PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESSEURS : **Professeur Michel GUERBET**

Professeur Benoit VEBER

Professeur Pascal JOLY

Professeur Stéphane MARRET

I - **MEDECINE**

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric **ANSELME**	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle **AUQUIT AUCKBUR**	HCN	Chirurgie plastique
Mr Bruno **BACHY** *(surnombre)*	HCN	Chirurgie pédiatrique
Mr Fabrice **BAUER**	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya **BEKRI**	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Jacques **BENICHOU**	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Jean-Paul **BESSOU**	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise **BEURET-BLANQUART**	HCN	Commission E.P.P. D.P.C. Pôle Qualité *(surnombre)*
Mr Guy **BONMARCHAND** (*surnombre)*	HCN	Réanimation médicale
Mr Olivier **BOYER**	UFR	Immunologie
Mr Jean-François **CAILLARD** *(surnombre)*	HCN	Médecine et santé au travail
Mr François **CARON**	HCN	Maladies infectieuses et tropicales

Mr Philippe **CHASSAGNE**	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent **COMPERE**	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Antoine **CUVELIER**	HB	Pneumologie
Mr Pierre **CZERNICHOW**	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Nicolas **DACHER**	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan **DARMONI**	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre **DECHELOTTE**	HCN	Nutrition
Mme Danièle **DEHESDIN** *(surnombre)*	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Frédéric **DI FIORE**	CB	Cancérologie
Mr Fabien **DOGUET**	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean **DOUCET**	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard **DUBRAY**	CB	Radiothérapie
Mr Philippe **DUCROTTE**	HCN	Hépato-gastro-entérologie
Mr Frank **DUJARDIN**	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice **DUPARC**	HCN	Anatomie Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric **DURAND**	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand **DUREUIL**	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène **ELTCHANINOFF**	HCN	Cardiologie
Mr Thierry **FREBOURG**	UFR	Génétique
Mr Pierre **FREGER**	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François **GEHANNO**	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel **GERARDIN**	HCN	Imagerie médicale

Mme Priscille **GERARDIN**	HCN	Pédopsychiatrie
Mr Michel **GODIN** *(surnombre)*	HB	Néphrologie
M. Guillaume **GOURCEROL**	HCN	Physiologie
Mr Philippe **GRISE** *(surnombre)*	HCN	Urologie
Mr Olivier **GUILLIN**	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier **HANNEQUIN**	HCN	Neurologie
Mr Fabrice **JARDIN**	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie **JOLY**	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal **JOLY**	HCN	Dermato - Vénéréologie
Mme Annie **LAQUERRIERE**	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent **LAUDENBACH**	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Xavier **LE LOET**	HCN	Rhumatologie
Mr Joël **LECHEVALLIER**	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé **LEFEBVRE**	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry **LEQUERRE**	HB	Rhumatologie
Mr Eric **LEREBOURS**	HCN	Nutrition
Mme Anne-Marie **LEROI**	HCN	Physiologie
Mr Hervé **LEVESQUE**	HB	Médecine interne
Mme Agnès **LIARD-ZMUDA**	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves **LITZLER**	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand **MACE**	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David **MALTETE**	HCN	Neurologie
Mr Christophe **MARGUET**	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle **MARIE**	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul **MARIE**	HCN	Oto-rhino-laryngologie

Mr Loïc **MARPEAU**	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane **MARRET**	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique **MERLE**	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre **MICHEL**	HCN	Hépato-gastro-entérologie
Mr Bruno **MIHOUT** *(surnombre)*	HCN	Neurologie
Mr Jean-François **MUIR**	HB	Pneumologie
Mr Marc **MURAINE**	HCN	Ophtalmologie
Mr Philippe **MUSETTE**	HCN	Dermatologie - Vénéréologie
Mr Christophe **PEILLON**	HCN	Chirurgie générale
Mr Jean-Marc **PERON** *(surnombre)*	HCN	Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale
Mr Christian **PFISTER**	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe **PLANTIER**	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier **PLISSONNIER**	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Bernard **PROUST**	HCN	Médecine légale
Mr François **PROUST**	HCN	Neurochirurgie
Mme Nathalie **RIVES**	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Jean-Christophe **RICHARD** *(détachement)*	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Horace **ROMAN**	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe **SABOURIN**	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume **SAVOYE**	HCN	Hépato-gastrologie
Mme Céline **SAVOYE–COLLET**	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale **SCHNEIDER**	HCN	Pédiatrie
Mr Michel **SCOTTE**	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne **TAMION**	HCN	Thérapeutique
Mr Luc **THIBERVILLE**	HCN	Pneumologie

Mr Christian **THUILLEZ**	HB	Pharmacologie
Mr Hervé **TILLY**	CB	Hématologie et transfusion
Mr Jean-Jacques **TUECH**	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre **VANNIER**	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît **VEBER**	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre **VERA**	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric **VERIN**	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
Mr Eric **VERSPYCK**	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier **VITTECOQ**	HB	Rhumatologie
Mr Jacques **WEBER**	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Noëlle **BARBIER-FREBOURG**	HCN	Bactériologie – Virologie
Mr Jeremy **BELLIEN**	HCN	Pharmacologie
Mme Carole **BRASSE LAGNEL**	HCN	Biochimie
Mme Valérie **BRIDOUX HUYBRECHTS**	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard **BUCHONNET**	HCN	Hématologie
Mme Mireille **CASTANET**	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie **CHASTAN**	HCN	Physiologie
Mme Sophie **CLAEYSSENS**	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse **COEFFIER**	HCN	Nutrition
Mr Stéphanie **DERREY**	HCN	Neurochirurgie
Mr Manuel **ETIENNE**	HCN	Maladies infectieuses et tropicales

Mr Serge **JACQUOT**	UFR	Immunologie
Mr Joël **LADNER**	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste **LATOUCHE**	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas **MOUREZ**	HCN	Bactériologie
Mr Jean-François **MENARD**	HCN	Biophysique
Mme Muriel **QUILLARD**	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Vincent **RICHARD**	UFR	Pharmacologie
Mr Mathieu **SALAUN**	HCN	Pneumologie
Mme Pascale **SAUGIER-VEBER**	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire **TOBENAS-DUJARDIN**	HCN	Anatomie
Mr Olivier **TROST**	HCN	Chirurgie Maxillo Faciale

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Dominique **LANIEZ**	UFR	Anglais
Mr Thierry **WABLE**	UFR	Communication

II - PHARMACIE

PROFESSEURS

Mr Thierry **BESSON**	Chimie Thérapeutique
Mr Jean-Jacques **BONNET**	Pharmacologie
Mr Roland **CAPRON** (PU-PH)	Biophysique
Mr Jean **COSTENTIN** (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle **DUBUS**	Biochimie

Mr Loïc **FAVENNEC** (PU-PH) Parasitologie

Mr Jean Pierre **GOULLE** Toxicologie

Mr Michel **GUERBET** Toxicologie

Mme Isabelle **LEROUX - NICOLLET** Physiologie

Mme Christelle **MONTEIL** Toxicologie

Mme Martine **PESTEL-CARON** (PU-PH) Microbiologie

Mme Elisabeth **SEGUIN** Pharmacognosie

Mr Rémi **VARIN** (PU-PH) Pharmacie clinique

Mr Jean-Marie **VAUGEOIS** Pharmacologie

Mr Philippe **VERITE** Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile **BARBOT** Chimie Générale et Minérale

Mme Dominique **BOUCHER** Pharmacologie

Mr Frédéric **BOUNOURE** Pharmacie Galénique

Mr Abdeslam **CHAGRAOUI** Physiologie

Mr Jean **CHASTANG** Biomathématiques

Mme Marie Catherine **CONCE-CHEMTOB** Législation pharmaceutique et économie de la santé

Mme Elizabeth **CHOSSON** Botanique

Mme Cécile **CORBIERE** Biochimie

Mr Eric **DITTMAR** Biophysique

Mme Nathalie **DOURMAP** Pharmacologie

Mme Isabelle **DUBUC** Pharmacologie

Mr Abdelhakim **ELOMRI** Pharmacognosie

Mr François **ESTOUR** Chimie Organique

Mr Gilles **GARGALA** (MCU-PH) Parasitologie

Mme Najla **GHARBI**	Chimie analytique
Mme Marie-Laure **GROULT**	Botanique
Mr Hervé **HUE**	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia **LE GOFF**	Parasitologie - Immunologie
Mme Hong **LU**	Biologie
Mme Sabine **MENAGER**	Chimie organique
Mr Mohamed **SKIBA**	Pharmacie galénique
Mme Malika **SKIBA**	Pharmacie galénique
Mme Christine **THARASSE**	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric **ZIEGLER**	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile **GUERARD-DETUNCQ** Pharmacie officinale

Mr Jean-François **HOUIVET** Pharmacie officinale

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde **GUERIN** Anglais

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

Mr Jérémie **MARTINET** Immunologie

Mme Sandrine **DAHYOT** Bactériologie

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mr Romy **RAZAKANDRAINIBE** Parasitologie

Mr François **HALLOUARD** Galénique

Mme Caroline **LAUGEL** Chimie organique

Mr Souleymane **ABDOUL-AZIZE** Biochimie

Mme Maïté **NIEPCERON** Microbiologie

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile **BARBOT** Chimie Générale et minérale

Mr Thierry **BESSON** Chimie thérapeutique

Mr Roland **CAPRON** Biophysique

Mr Jean **CHASTANG** Mathématiques

Mme Marie-Catherine **CONCE-CHEMTOB** Législation et économie de la santé

Mme Elisabeth **CHOSSON** Botanique

Mr Jean-Jacques **BONNET** Pharmacodynamie

Mme Isabelle **DUBUS** Biochimie

Mr Loïc **FAVENNEC** Parasitologie

Mr Michel **GUERBET** Toxicologie

Mr François **ESTOUR** Chimie organique

Mme Isabelle **LEROUX-NICOLLET** Physiologie

Mme Martine **PESTEL-CARON** Microbiologie

Mme Elisabeth **SEGUIN** Pharmacognosie

Mr Mohamed **SKIBA** Pharmacie galénique

Mr Philippe **VERITE** Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR

Mr Jean-Loup **HERMIL** UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine Générale

Mr Alain **MERCIER** UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Serguei **FETISSOV** (med) Physiologie (ADEN)

Mr Paul **MULDER** (phar) Sciences du Médicament

Mme Su **RUAN** (med) Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil **ADRIOUCH** (med) Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)

Mme Gaëlle **BOUGEARD-DENOYELLE** (med) Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079**)**

Mme Carine **CLEREN** (phar) Neurosciences (Néovasc)

Mme Pascaline **GAILDRAT** (phar) Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)

Mr Nicolas **GUEROUT** (phar) Chirurgie Expérimentale

Mr Antoine **OUVRARD-PASCAUD** (med) Physiologie (Unité Inserm 1076)

Mr Frédéric **PASQUET** Sciences du langage, orthophonie

Mme Isabelle **TOURNIER** (phar) Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique **DELAFONTAINE**

HCN - Hôpital Charles Nicolle *HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME*

CB - Centre Henri Becquerel *CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray*

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation SJ – Saint Julien Rouen

SOMMAIRE

INTRODUCTION

1. Le diabète de type 2
    1.1. Définition
    1.2. Epidémiologie
    1.3. Signes cliniques du diabète de type 2
    1.4. Ethiopathogénie du diabète de type 2
        1.4.1. Arguments pour une susceptibilité génétique
        1.4.2. Arguments pour un rôle de l'environnement
    1.5. Physiopathologie du diabète de type 2
        1.5.1. Situation non diabétique
            1.5.1.1. Le pancréas
            1.5.1.2. Les hormones régulant la glycémie
            1.5.1.3. Les incrétines
        1.5.2. Mécanismes d'insulinorésistance et d'insulinodéficience
            1.5.2.1. L'insulinorésistance
            1.5.2.2. L'insulinodéficience
            1.5.2.3. Les complications du diabète
        1.5.3. Traitement du diabète
            1.5.3.1. Les mesures hygiéno-diététiques
            1.5.3.2. Les antidiabétiques oraux
            1.5.3.3. Les insulines
            1.5.3.4. Les molécules thérapeutiques récentes
2. Le stress oxydant
    2.1. Définition
    2.2. Les systèmes pro-oxydants
        2.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)
        2.2.2. Rôle physiologique des ROS
        2.2.3. Effets délétères du stress oxydant au niveau moléculaire
            2.2.3.1. L'ADN
            2.2.3.2. Les protéines
            2.2.3.3. Les lipoprotéines
            2.2.3.4. Les lipides membranaires

2.2.4. Les facteurs environnementaux du stress oxydant
2.3. Les marqueurs biochimiques de l'oxydation des lipides
2.3.1. Les hydroperoxydes
2.3.2. Les aldéhydes et TBARS
2.3.3. Les isoprostanes
2.4. Les marqueurs biochimiques de l'oxydation des protéines
2.5. Les marqueurs biochimiques de l'oxydation de l'ADN
2.6. Les systèmes antioxydants
2.6.1. Les enzymes antioxydantes
2.6.1.1. Les superoxydes dismutases
2.6.1.2. Les glutathions peroxydases
2.6.1.3. La catalase
2.6.2. Les systèmes non enzymatiques
2.6.2.1. Le glutathion
2.6.2.2. La vitamine E
2.6.2.3. La vitamine C
2.6.2.4. Le β-carotène
2.6.2.5. Le coenzyme Q10
2.6.2.6. L'acide urique
2.6.2.7. Les polyphénols
2.6.2.8. Les oligoéléments : sélénium, cuivre et zinc
2.7. Relation entre le diabète de type 2 et le stress oxydant
2.7.1. La lipotoxicité
2.7.2. La glucotoxicité
2.7.2.1. L'auto-oxydation du glucose
2.7.2.2. La glycation des protéines
2.7.2.3. La voie des polyols
2.7.3. Comment mettre en évidence un état de stress oxydant chez le patient diabétique ?
3. Etude clinique pilote
3.1. Matériels et méthodes
3.1.1. Patients
3.1.2. Méthodes
3.2. Résultats et discussion

3.2.1. Interprétation des données cliniques et discussion

3.2.2. Interprétation des données biologiques et discussion

3.3. Conclusion

CONCLUSION

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Ensemble des signes cliniques conduisant au diagnostic de diabète de type 2.
Tableau 2 : Paramètres cliniques et biologiques évalués.
Tableau 3 : Les différents types d'insuline.
Tableau 4 : Les facteurs contribuant à générer un stress oxydant.
Tableau 5 : Récapitulatif des antioxydants.
Tableau 6 : Données cliniques.
Tableau 7 : Données biologiques.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : L'escalier PNNS 2010.
Figure 2 : Le glucose.
Figure 3 : Prévalence du diabète en 2007 et prévision pour 2025.
Figure 4 : Le diabète en France par département en 2012.
Figure 5 : Pourcentage de la population diabétique française 2012.
Figure 6 : Ethiopathogénie du diabète de type 2.
Figure 7 : Schéma du pancréas.
Figure 8 : Structure primaire du glucagon.
Figure 9 : Structure primaire de l'insuline.
Figure 10 : Schéma simplifié de l'entrée du glucose dans les cellules.
Figure 11 : Insulinorésistance et insulinodéficience.
Figure 12 : Mécanismes de survenue du diabète.
Figure 13 : Mécanismes d'entrée du glucose dans la cellule.
Figure 14 : Voie de signalisation insulinique.
Figure 15 : Les complications cardiovasculaires liées au diabète (Diabetes atlas troisième édition 2007, IDF)
Figure 16 : La pyramide de l'index glycémique de D. Ludwig.
Figure 17 : Stylo à insuline.
Figure 18 : Représentation du schéma basal/bolus.
Figure 19 : Pompe à insuline.
Figure 20 : Kit d'auto surveillance du diabète.
Figure 21 : Le rôle des hormones intestinales dans l'homéostasie du glucose.
Figure 22 : Le stress oxydant, diabète et complications (CEED).
Figure 23 : Description des espèces oxygénées réactives.
Figure 24 : La chaine respiratoire.
Figure 25 : La peroxydation lipidique.
Figure 26 : Réaction du malondialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique.
Figure 27 : Structure de la 8-isoPGF2α.
Figure 28 : Essai de comète.
Figure 29 : Aperçu des différentes ROS et des antioxydants régulateurs de leur production.

Figure 30 : Réduction de l’oxygène en eau.
Figure 31 : Cycle oxydo-réduction. Toutes les enzymes sont indiquées en vert, des substrats et des produits en bleu, et les inhibiteurs en rouge.
Figure 32 : Réduction d'un radical peroxyde au sein d'un acide gras par l'alpha-tocophérol (vitamine E). L'alpha-tocophéryl ainsi formé est réduit en alpha-tocophérol par oxydation de l'acide ascorbique (vitamine C).
Figure 33 : Mécanismes de protection contre les ROS.
Figure 34 : Cycle « glucose-acides gras » de Randle.
Figure 35 : La reformulation des mécanismes biochimiques à l’origine du cycle « glucose-acides gras » dans les années 2000.
Figure 36 : Mécanismes biochimiques impliqués dans la lipotoxicité.
Figure 37 : La glycation des protéines.
Figure 38 : voie des polyols.

TABLE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AGE	Advanced Glycation End-product, produits de glycation avancé
AGL	Acides Gras Libres
AGPI	Acides Gras Poly-Insaturés
ALD	Affection Longue Durée
ATP	Adénosine-5'-TriPhosphate
CEED	Centre Européen d'Etude du Diabète
CLHP	Chromatographie en phase Liquide Haute Performance
DPP-4	enzyme DiPeptidylPeptidase-4
DNID	Diabète Non Insulino-Dépendant
DT2	Diabète de Type 2
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FID	Fédération Internationale du Diabète
G6P	Glucose-6-Phosphate
GIP	Glucose-dependent Insulinotropic Peptide
GLP-1	Glucagon Like Peptide-1
HODE	acide HydroxyOctaDEcadiénoïque
IMC	Indice de Masse Corporelle
IRS	Insulin Receptor Substrat
MAPK	Mitogen-Activated Protéin Kinases
MDA	MalonDiAldéhyde
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAD	Pression Artérielle Diastolique
PCOOH	HydroperOxydes de PhosphatidylCholine
PN	Polynucléaires Neutrophiles
PNNS	Programme National Nutrition Santé
RAGE	Receptor of advanced Glycation End Produ
ROS	Reactive Oxygen Species
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
SOD	SuperOxyde Dismutase
TBARS	ThioBarbituric Acid Reactive Substances

INTRODUCTION

Le diabète est une maladie considérée par l'OMS comme une épidémie et dont la prévalence a augmenté de façon très importante au cours de ces dernières années.

Actuellement, près de 285 millions de personnes dans le monde sont atteintes de diabète, dont plus de 3 millions pour la France. Selon la Fédération Internationale du Diabète (FID), si le taux de croissance actuel se poursuit, le nombre total de diabétiques dépassera les 435 millions d'ici 2030, soit une augmentation de 54%.

En plus de ces chiffres alarmants, il faut tenir compte des personnes qui ignorent qu'elles sont diabétiques car le développement de la pathologie est silencieux et sournois. Le diabète est une maladie potentiellement mortelle responsable chaque année dans le monde de près de 4 millions de décès. Un mauvais équilibre du diabète est responsable de l'apparition de complications cardiovasculaires par altération des vaisseaux sanguins, et représente :

- 3 à 6 fois plus de risque de développer des maladies cardiaques,
- 25% des atteintes rénales nécessitant une dialyse,
- La première cause de cécité,
- 50% des amputations des membres inférieurs.

De nombreuses études suggèrent que le diabète s'accompagne d'un stress oxydant favorisant le développement de la maladie. Il perturbe l'insulino-sécrétion, en promouvant l'insulino- résistance et les complications cardiovasculaires qui y sont associées. Ce stress oxydant est dû à une rupture de l'équilibre physiologique qui existe dans l'organisme entre les molécules oxydantes et les systèmes de défenses antioxydants.

Outre des défenses antioxydantes présentes dans l'organisme, l'alimentation apporte de nombreux antioxydants notamment par les vitamines et les oligo-éléments. Ainsi, une rupture de l'équilibre alimentaire (défaillance nutritionnelle, carence, alimentation trop riche) entraîne le développement du stress oxydant par diminution des systèmes de défense. Le développement du diabète et du stress oxydant est étroitement lié à

la qualité de vie et aux modes alimentaires.

En effet, dans nos sociétés modernes, la qualité de vie et de travail est augmentée sans pour autant que l'hygiène de vie ne s'améliore. Notre mode de vie devient de plus en plus sédentaire et les gestes du quotidien sont assistés pour diminuer l'effort. Ainsi en un demi- siècle, les besoins énergétiques journaliers de l'homme ont diminués et se situent de 1500 à 1700 Kcal/jour entre 2-6ans, 1700-1800 Kcal/jour chez la femme, 2300-2400 Kcal/jour chez les hommes (Rigaud D,1997).

En réponse aux problèmes liés à l'alimentation, l'Etat français a instauré des programmes de nutrition, comme le Programme National Nutrition Santé (PNNS), dont l'un des objectifs prioritaires était d'augmenter la consommation de fruits et légumes à au moins cinq par jour (Figure 1).

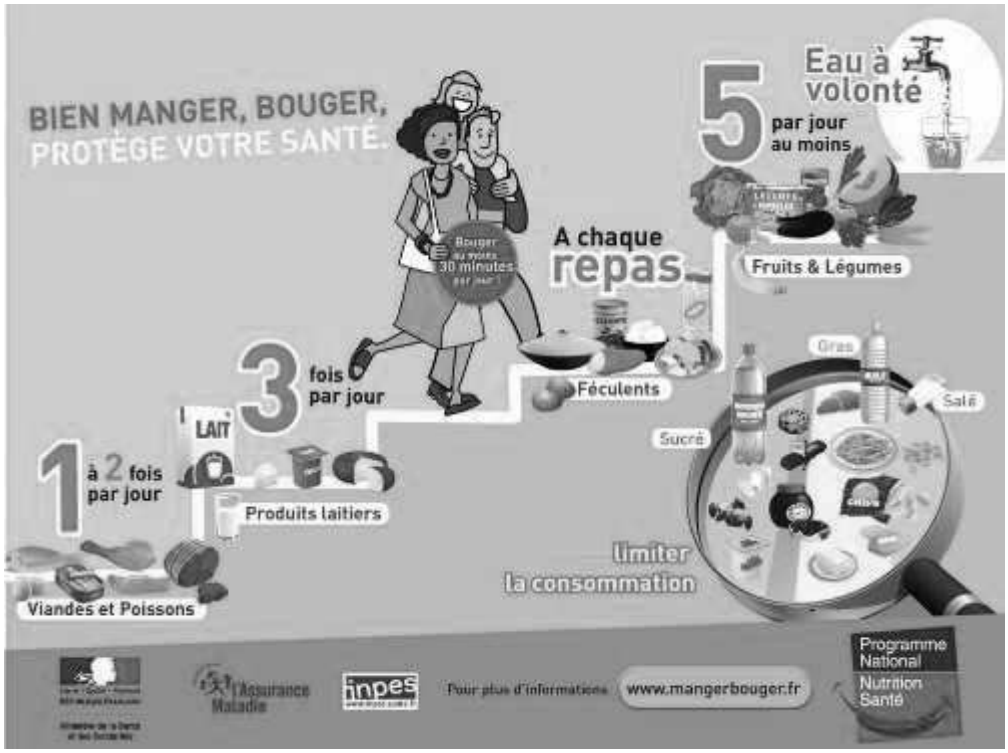


Figure 1 : L'escalier PNNS 2010

L'alimentation et notamment les fruits et légumes renferment des antioxydants dont certains d'entre eux sont connus pour avoir un fort pouvoir antioxydant, comme par exemple, les baies rouges et noires, les pruneaux, le raisin, la tomate, les épinards et brocolis...etc.

Ce pouvoir antioxydant des aliments est intéressant dans des études de prévention du stress oxydant associé aux maladies. Dans le cas du diabète, des études ont montré effectivement qu'une supplémentation en antioxydants naturels comme le cacao qui renferme des flavonoïdes améliorait la sensibilité à l'insuline (Grassi D, 2005).

1. Le diabète de type 2

1.1. Définition

Selon l'OMS, le diabète est une maladie métabolique chronique qui apparaît lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline ou alors lorsque celle-ci n'est pas correctement utilisée par l'organisme. L'insuline est une hormone qui régule la concentration de sucre dans le sang, elle est hypoglycémiante. La glycémie reflète le taux de glucose dans le sang, c'est l'un des principaux paramètres utilisé dans le diagnostic et le suivi du diabète (Figure 2). L'autre mesure importante est l'hémoglobine glyquée Hb1Ac qui reflète la glycémie moyenne des trois derniers mois. Sa valeur normale doit être inférieure à 6% chez le sujet sain.

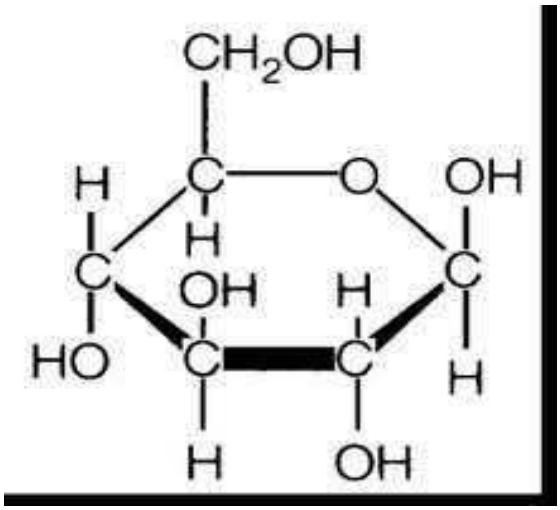


Figure 2: Le glucose.

L'hyperglycémie, fréquente au cours du diabète non contrôlé, conduit avec le temps à des atteintes graves de nombreux systèmes organiques et plus particulièrement des nerfs et des vaisseaux sanguins (OMS, 2011). Il existe 4 types de diabètes : les deux principaux sont le diabète de type 1 et le diabète de type 2, les autres sont les diabètes secondaires et gestationnel. Le diabète de type 1 ou diabète insulinodépendant est une maladie auto-immune aboutissant à une destruction progressive des cellules β des îlots de Langherans. Il apparaît le plus souvent chez

l'enfant ou le jeune adulte. Son traitement repose sur l'administration d'insuline. Sa prévalence est de 20%.

Le diabète de type 2 ou diabète non insulinodépendant représente environ 80% des diabètes mais son incidence croit dans beaucoup de pays. Le diabète de type 2 (DT2) se traduit par un ensemble de troubles métaboliques notamment des hyperglycémies post-prandiales secondaires à un trouble insulinique. Il est encore quelquefois nommé Diabète Non Insulino Dependant (DNID).

Le diabète est définit selon l'OMS par une hyperglycémie chronique supérieure à 1.26g/L ou par deux hyperglycémies post prandiales supérieures à 2g/L.

C'est une maladie hétérogène non auto-immune touchant principalement les adultes à partir de 40-45 ans « bons vivants ». Ses traitements reposent sur des règles hygiéno-diététiques, voir un régime, ainsi qu'un traitement médicamenteux (Collège des enseignants d'endocrinologie,2007).

1.2. Epidémiologie

L'évolution du diabète de type 2 est considérée aujourd'hui par l'OMS comme pandémique, il touche presque 285 millions de personnes dans le monde (Figure 3). Tous les continents sont concernés mais on observe une augmentation de fréquence dans les pays émergents ; 10% des Africains et Asiatiques contre 2% des européens.

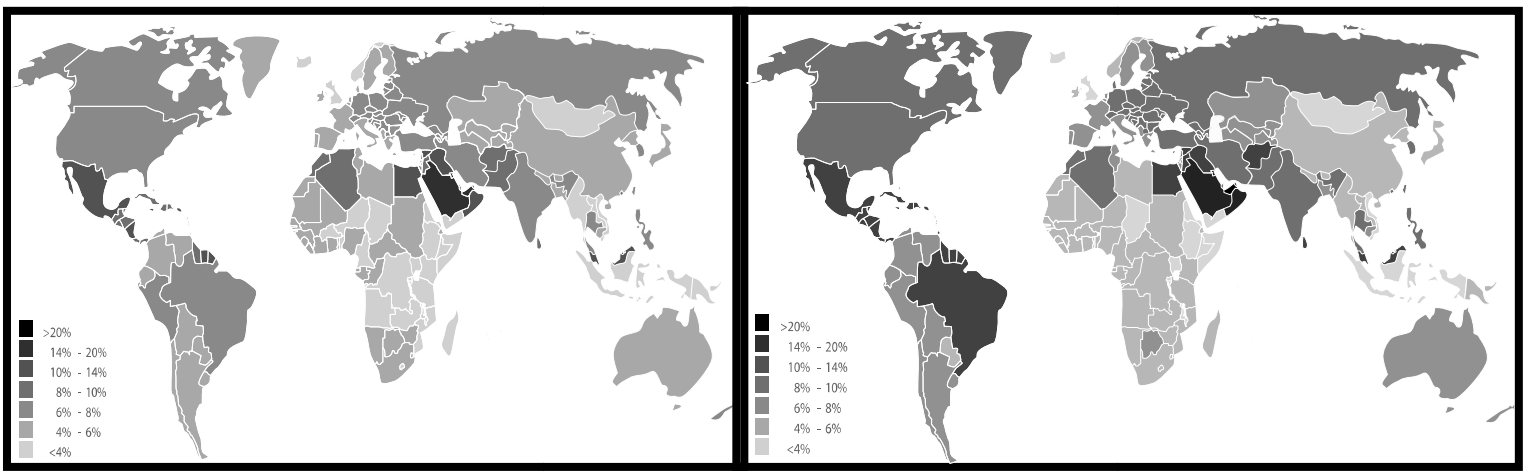


Figure 3: Prévalence du diabète en 2007 et prévision pour 2025.

La prévalence globale du diabète dans la population mondiale adulte de 20 à 80 ans est estimée être de 6.6%. Les pays comptant le plus de patients atteints de diabète sont l'Inde (50.8 millions de diabétiques soit 4,3% de sa population), la Chine (43,2

millions soit 12% de sa population), les Etats-Unis (26,8 millions soit 9% de sa population).

En Europe, l'estimation de 2011 est de 52.8 millions d'adultes (8.5% de la population adulte) atteints de diabète (IDF Montréal, 2009). Les pays comptant le plus grand nombre de personnes atteintes de diabète se situent encore essentiellement en Europe occidentale même si la prévalence diminue. Il s'agit notamment de l'Allemagne, l'Italie, la France, le Royaume-Uni, l'Espagne. De plus, ces pays économiquement développés font face à une population vieillissante. L'âge est un facteur de risque important pour le diabète de type II. En Europe, en 2011, un tiers de la population a plus de 50ans et ce chiffre devrait passer à 40% d'ici 2030. En revanche les prévalences les plus élevées se retrouvent chez les nouveaux pays européens : la Russie (10%), Pologne, Arménie (Kusnik- Joinville O et al, 2008).

En France on comptait en 2009 environ 2,9 millions de Français traités pour cette maladie. Le constat est inquiétant car ce chiffre était annoncé pour 2016, cela représente 4,4% de la population. On observe une disparité de la maladie, avec un développement plus important dans certaines régions : les départements d'Outre mer (la Réunion, Guadeloupe) et les départements du nord et nord-est de la France connaissent respectivement des taux de 8% et 5% de diabétiques, l'incidence étant moins élevée en Bretagne ou en pays de Loire (Kusnik- Joinville O et al, 2008). Ces disparités s'expliquent pour l'Outre mer par une situation économique mauvaise et pour les départements du Nord par une alimentation trop riche en graisse (Figure 4 et 5).

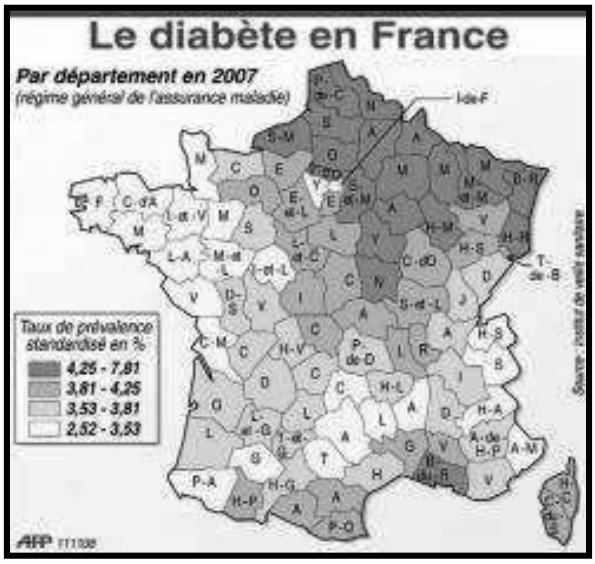


Figure 4 : Le diabète en France par département en 2012.

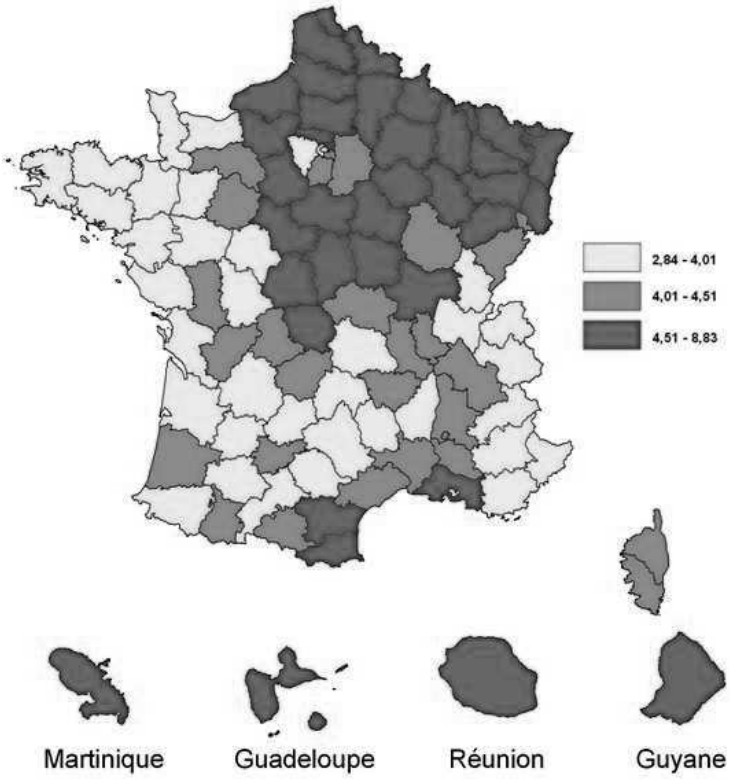


Figure 5 : pourcentage de la population diabétique francaise 2012

La prévalence du diabète est toujours plus élevée chez les hommes que chez les femmes même si, chez ces dernières, on note une augmentation.

Une augmentation continue de la prévalence du diabète depuis 10 ans devrait se poursuivre en raison du vieillissement de la population avec augmentation de l'espérance de vie des diabétiques, mais aussi l'augmentation de la prévalence de l'obésité.

Cette progression du diabète de type 2 est très liée au mode de vie notamment à l'alimentation riche en lipides et au manque d'activité physique. L'obésité est un facteur majeur dans l'apparition du diabète, un surpoids multiplie par cinq le risque de devenir diabétique. De plus, 80% des diabétiques sont obèses. Fait inquiétant selon l'étude ObEpi-Roche de 2012 sur le surpoids et l'obésité des français. En 2012, 32,3% des français adultes de plus de 18 ans étaient en surpoids et 15% obèses. Une nouvelle tendance se dessine, ainsi, l'obésité touche davantage les femmes (prévalence de 15,7% versus homme 14,3%) et les jeunes 25-34 ans.

Cette étude a aussi montré que l'IMC moyen français est passé de 24,3 kg/m^2 en 1997 à 25,4 kg/m^2 en 2009 soit une augmentation moyenne de 1,1kg/m^2 depuis 1997 (INSERM, KANTAR HEALTH, ROCHE. Ob-Epi, 2012).

En France l'incidence du diabète est mal connue. Toutefois, il est possible d'approcher l'incidence du diabète par l'incidence des affections de longue durée (ALD) pour diabète.

En 2006 environ 178.000 personnes ont été admises en ALD-diabète, soit une augmentation de +32% entre 2000 et 2006 (Païta M, Weill A, 2008). La prévalence du diabète traité a fortement augmenté entre 2000 et 2005. Dans le même temps, les pathologies cardiovasculaires, souvent associées au diabète, sont plus fréquemment prisent en charge par des médicaments. Il en résulte un surcoût, pour l'Assurance maladie, du traitement médicamenteux du diabète et des facteurs de risque d' 1,8 milliard d'euros en 2005 (Kusnik-Joinville O et al, 2007). La prise en charge des dépenses de santé liées au diabète a coûté environ 10 milliards d'euros en 2010, soit près de 8% de l'ensemble des remboursements versés par le régime général à ses assurés. Le diabète, avec une progression de 6,5% de ces effectifs recensés en

2010, est devenu la première affection longue durée, dépassant les cancers (Agence France Presse, 2011).

Il ne faut pas non plus oublier que le diabète induit de nombreuses autres complications graves :

- c'est la première cause de cécité dans le monde.
- la fréquence d'amputation d'un membre inférieur est estimée à environ 30.000 cas par an soit une incidence de 404/100.000 (un taux 14 fois supérieur que chez les non diabétiques) (Etude Entred, 2005).

Les causes potentielles d'amputation sont un traumatisme, une atteinte des artères et des nerfs distaux, ou une pathologie osseuse.

1.3. Signes cliniques du diabète de type 2.

Le diabète de type 2 passe pendant plusieurs mois ou années inaperçu car il est asymptomatique dans son début. Il s'agit de la phase d'installation de l'insulinorésistance, la glycémie est plus ou moins équilibrée.

Le diagnostic est posé à l'occasion de l'apparition de symptômes caractéristiques d'un diabète (Tableau 1) ou dans près d'un tiers des cas par la découverte fortuite d'un taux d'hémoglobine glyquée supérieur à 7%. C'est la phase d'insulinodéficience. Rappelons le, le diabète est définit selon l'OMS par une hyperglycémie chronique supérieure à 1.26g/L. Près de 90% des diabétiques vivent des années avec cette maladie sans le savoir et, dans 20% des cas, c'est une complication qui va poser le diagnostic (Tableau 1).

Tableau 1: Ensemble des signes conduisant au diagnostic de diabète de type 2

Symptômes caractéristiques	Complications
Polyurie Polydipsie Polyphagie Fatigue Perte de poids rapide	Infections cutanéo-muqueuses Douleurs, crampes des jambes, plaies des pieds Troubles visuels (cataracte, atteinte de la rétine) Pathologie cardiovasculaire Néphropathie diabétique, impuissance …

Une fois le diagnostic établit, un examen clinique et biologique plus approfondi est pratiqué afin de déceler d'éventuelles complications.

Tableau 2: Paramètres cliniques et biologiques évalués

Paramètres cliniques	Paramètres biologiques
Poids, Taille, IMC, Age Pression artérielle Auscultation du cœur et des artères, Doppler Percussion des réflexes tendineux Mode de vie, Alcool, Tabac Examen ophtalmologique	Glycémies à jeun et postprandiales Hémoglobine glyquée Glycosurie des 24h Dosage de la protéine C Bilan hématologique (GR, GB, hématocrite) Bilan lipidique (HDL-cholestérol, triglycérides) Bilan rénal (créatinine, clairance)

Le traitement de première intention est le régime hypocalorique, mais le plus souvent celui-ci ne suffit pas et un traitement médicamenteux est nécessaire.

1.4. Ethiopathogénie du diabète de type 2 (Figure 6)

1.4.1. Arguments pour une susceptibilité génétique

Ce diabète atteint classiquement les adultes de plus de 40 ans avec un pic d'incidence entre 50-70 ans. Cette observation est à nuancer car on retrouve de plus en plus de cas d'enfants et d'adolescents obèses diabétiques. Le diabète de type 2 est d'origine polygénique et environnementale.

Dans l'étiologie de cette pathologie il y a un puissant facteur génétique : avoir des membres de sa famille (surtout au premier degré) atteints de diabète de type 2 constitue un risque important pour en développer un également. Le risque de devenir soit même diabétique si l'on a un parent malade est de 40% (Collège des enseignants d'endocrinologie, 2007).

D'autre part l'hypothèse dite « de génotype d'épargne » émise par J.U.Neel il y a quelques dizaines d'années connaît un regain de vérité. Cette théorie repose sur le principe que le génotype prédisposant au DNID a offert une plus grande résistance aux populations pendant les années de famines et de pauvreté. Avec le récent changement de mode de vie, nourriture abondante, sédentarité et moins d'activité physique, ces populations sont devenues victimes de leur génotype d'épargne énergétique et ont développé un surpoids puis un DNID.

1.4.2. Arguments pour un rôle de l'environnement

L'environnement joue un rôle déterminant dans la genèse du DT2. Sont en cause les principaux facteurs d'environnement suivants :

- un déséquilibre nutritionnel avec consommation excessive d'aliments à haute teneur énergétique, des repas non équilibrés.
- une sédentarité ainsi qu'une activité physique insuffisante menant à la surcharge pondérale.

La majorité des patients DT2 sont obèses, or, l'obésité chronique induit une résistance accrue à l'insuline qui peut évoluer en diabète. On a pu aussi montrer que l'obésité et la conséquence de la résistance à l'insuline. L'insuline est en effet une hormone déclenchant le stockage des graisses et un excès d'insuline se traduit par une prise de poids. Il a été montré aux USA et en Europe une corrélation franche entre surcharge pondérale et diabète (Astrup A, 2005).

Outre l'obésité dans son ensemble, nommée comme facteur de risque important, c'est l'obésité androïde (distribution abdominale des graisses) qui prédispose le plus au développement du DT2. Cette obésité androïde est reflétée par une augmentation du rapport tour de taille/tour de hanche qui, normalement, doit être inférieur à 80 chez la femme et à 94 chez l'homme.

On constate aussi que le taux de personnes diabétiques est inversement proportionnel au niveau socio-économique de la population.

Un dernier facteur influençant la survenue de diabète cité est l'hypotrophie fœtale. En effet deux études ont montré que la masse des cellules Bêta se développe de la douzième semaine de grossesse au cinquième mois après la naissance (Lapillonne A, 2011).

Si pendant cette période, une malnutrition maternelle survenait, on peut craindre un développement insuffisant des cellules Bêta ce qui risquerait à l'âge adulte d'entrainer un DT2.

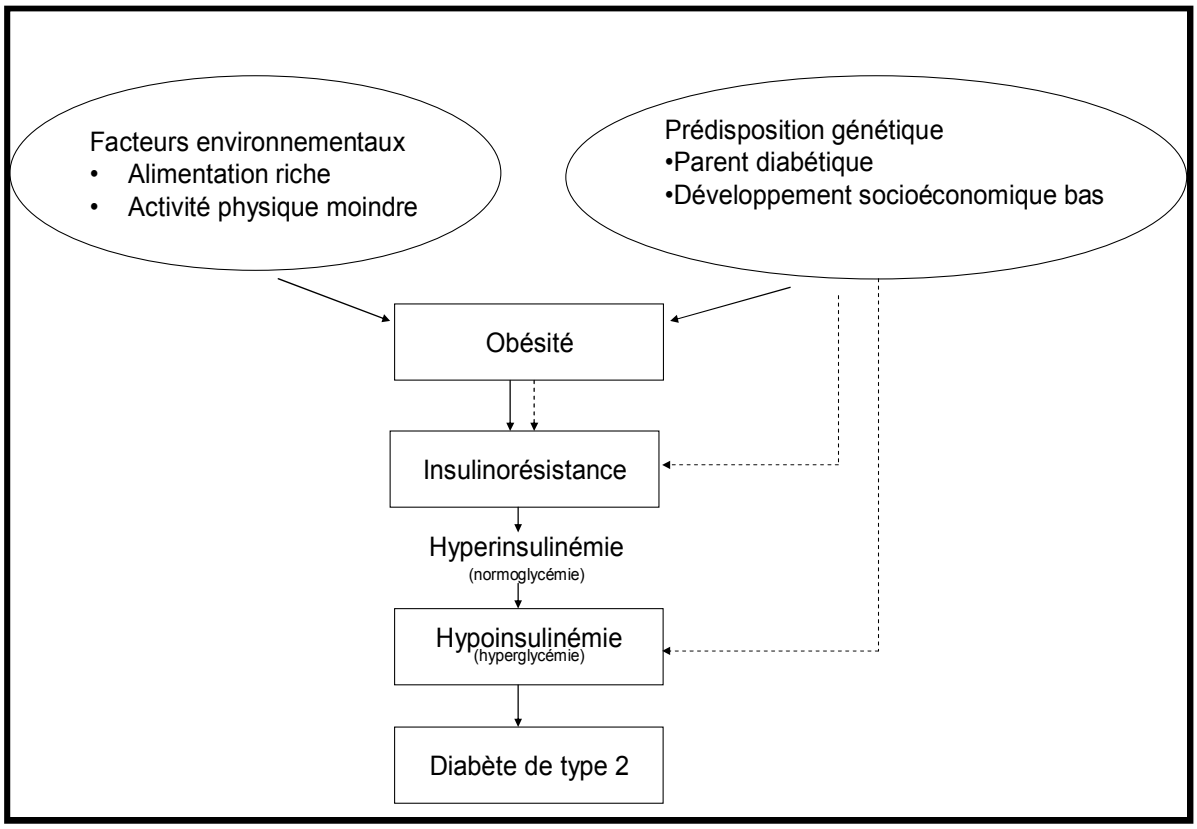


Figure 6 : Ethiopathogénie du diabète de type 2.

1.5. Physiopathologie du diabète de type 2

1.5.1. Situation non diabétique

1.5.1.1. Le pancréas

En temps normal chez une personne non diabétique, la glycémie est maintenue à une valeur d'environ 1g/L ou 5mmol/L. Cet équilibre dépend de la sécrétion de différentes hormones. Les deux principales sont l'insuline et le glucagon. Ces deux hormones sont synthétisées par le pancréas.

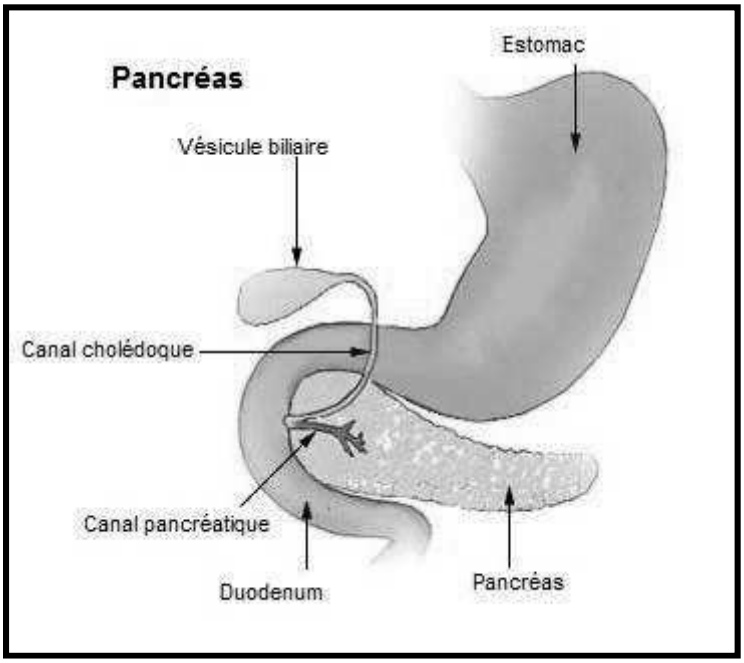


Figure 7 : Schéma du pancréas.

Le pancréas est un organe qui se trouve en arrière de l'estomac proche de la vésicule biliaire et de la rate. C'est une glande mixte : exocrine, elle produit le suc pancréatique nécessaire à la digestion des aliments et endocrine par la sécrétion des hormones régulant la glycémie (Figure 7).

La partie endocrine du pancréas est constituée des îlots de Langherans.

Ces îlots sont constitués de 4 types de cellules :

- les cellules β qui synthétise l'insuline. Ce sont les plus nombreuses 60% de la masse du pancréas.
- Les cellules α produisent le glucagon
- Les cellules δ sécrètent la somatostatine
- Les cellules PP synthétisent le polypeptide pancréatique.

1.5.1.2. Les hormones régulant la glycémie

- Le glucagon

Le glucagon est un polypeptide de 29 acides aminés.

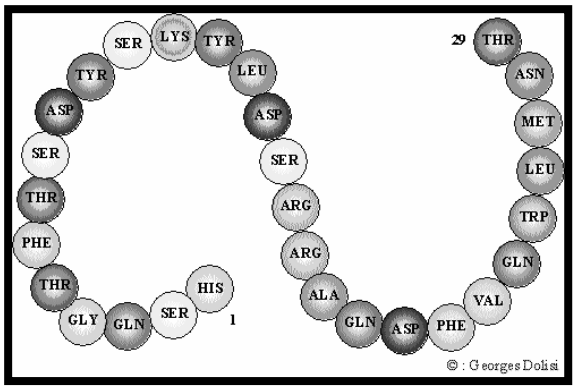


Figure 8 : Structure primaire du glucagon

Le glucagon est synthétisé par les cellules α du pancréas en cas d'hypoglycémie (Figure 8). Il est sécrété quand la glycémie est inférieure à 0,65g/L. Il déclenche une cascade de réactions enzymatiques au niveau hépatique et musculaires, constituant la glycogénolyse. Le glycogène, molécule de réserve du glucose est dégradé en glucose-6-phosphate (G6P) puis en glucose qui va rejoindre la circulation sanguine. Il stimule par ailleurs la néoglucogénèse hépathique à partir du pyruvate.

- L'insuline

A l'inverse, en cas d'hyperglycémie, la molécule régulatrice est l'insuline. L'insuline est un peptide de 51 acides aminé composé de deux chaînes ; la chaîne A de 21 acides aminés et la chaîne B de 30 acides aminés reliées entre elles par deux ponts disulfures (Figure 9).

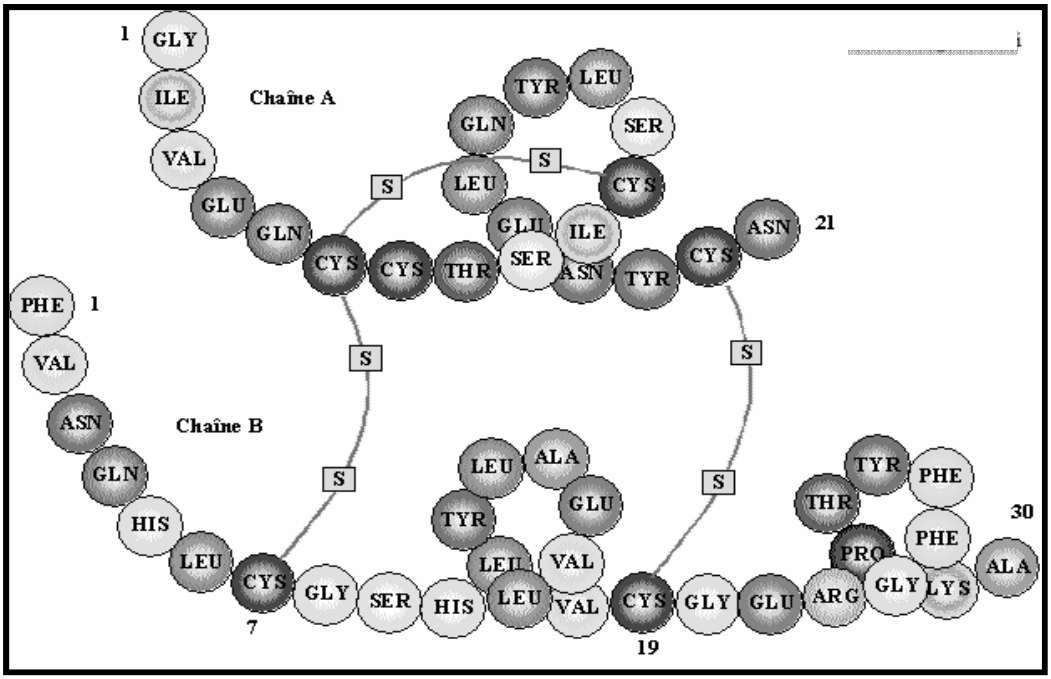


Figure 9 : Structure primaire de l'insuline.

L'insuline est stockée dans les cellules β pancréatiques sous forme de précurseur inactif, le peptide C. Lors d'un repas, le glucose ingéré se fixe sur le récepteur GLUT 2 des cellules β. Dans la cellule, le glucose est métabolisé pour produire de l'adénosine triphosphate (ATP) entrainant un blocage des canaux potassiques et l'ouverture des canaux calciques.

L'augmentation des concentrations intracellulaires en calcium est couplée à la sortie de l'insuline de la cellule. L'insuline libérée se fixe sur les cellules hépatiques et musculaires. Elle va permettre l'entrée de glucose circulant dans les cellules au niveau du foie et des muscles grâce au transporteur spécifique insulinodépendant GLUT4 (Figure 10).
Ce glucose sera stocké sous forme de glycogène par glycogénogenèse.

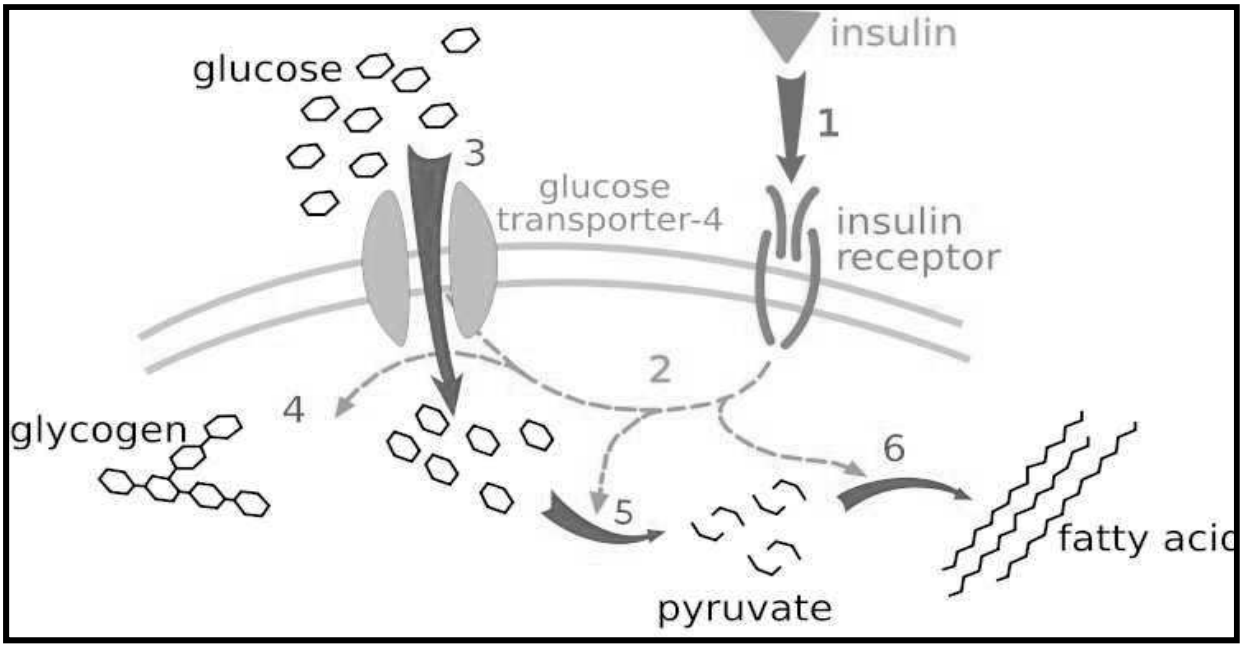


Figure 10 : Schéma simplifié de l'entrée du glucose dans les cellules.

1.5.1.3. Les incrétines

Les incrétines sont des peptides produits par les cellules α-pancréatiques et les cellules L-intestinales, souvent associées à des hormones et influencent la satiété (ralentissent la vidange gastrique). Le GLP-1 (Glucagon-like peptide) permet d'augmenter le flux entrant de glucose dans les cellules adipeuses.
Il est secrété par les cellules du jéjunum et de l'iléon en présence de nutriments dans l'intestin, ce qui stimule la sécrétion d'insuline et diminue la néoglucogenèse hépatique. Cette hormone intéressante a malheureusement une demi-vie très courte

car elle est rapidement dégradée par l'enzyme dipeptidylpeptidase-4 ou DPP-4.

1.5.2. Mécanisme d'insulinorésistance et d'insulinodéficience

1.5.2.1. L'insulinorésistance

Elle précède le diabète non insulinodépendant. Elle survient sur un terrain génétique de susceptibilité. En effet, chez 80% des diabétiques, on retrouve un phénotype particulier appelé l'intolérance au glucose ou syndrome métabolique. Ce syndrome métabolique caractérisé par une insulinorésistance constitue une pathologie importante, notamment en raison de la fréquence des complications cardiovasculaires qui y sont associées. Ce n'est pas une maladie en soi mais un ensemble de facteurs prédisposant au diabète et aux maladies cardiovasculaires. Pour parler de syndrome métabolique le patient doit présenter au moins trois des cinq facteurs suivants (définition basée sur les critères américains du NCEP ATP III) :

- un tour de taille supérieur à 102cm chez l'homme et 88cm chez la femme,
- un taux de HDL cholestérol inférieur à 0,40g/L chez l'homme et 0,50g/L chez la femme,
- des triglycérides supérieurs à 1,5g/L
- une glycémie à jeun supérieure à 1,1g/L
- une tension artérielle supérieure à 130-85mmHg.

Le syndrome métabolique n'est pas synonyme de diabète mais en constitue cependant un facteur de risque majeur (Furtado de Souza C et al, 2012). Il représente réellement « l'empreinte du diabète de type 2 auquel il conduira lorsqu'une insulinodéficience s'associera à l'insulinorésistance princeps » (Figure 11).

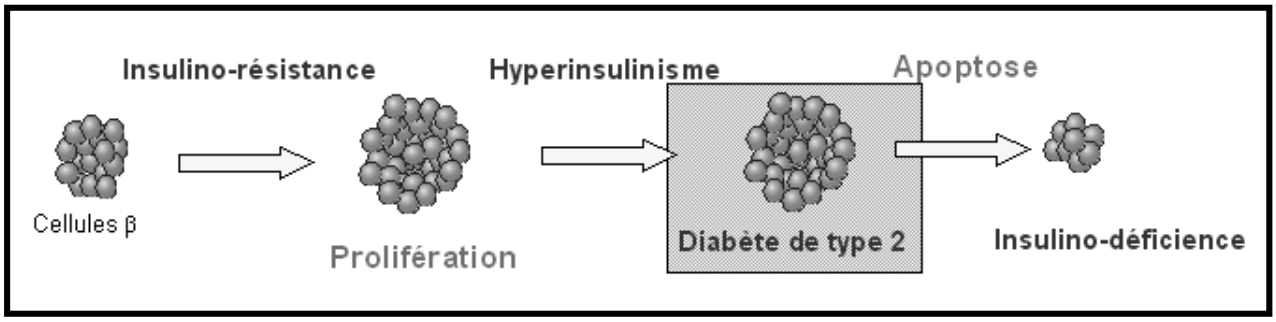


Figure 11 : Insulinorésistance et insulinodéficience.

Ce stade est caractérisé par une hyperglycémie modérée. A ce stade il y a très peu de signes cliniques. Dans un premier temps l'organisme lutte contre l'hyperglycémie en augmentant sa masse de cellules β pancréatiques. On assiste à une hypersécrétion insulinique. Mais cette situation, cet équilibre précaire est limité dans le temps.

Le passage de l'état pré-diabétique à diabétique de type 2 impose 3 étapes majeures incontournables. La première est l'apoptose des cellules β et donc la chute de la sécrétion insulinique compensatoire. Cela peut éventuellement être dû à la glucolipotoxicité. Puis, deuxièmement, la chute de l'insulinémie entraine la chute de glucose intracellulaire, mais une hyperglycémie, et donc une surproduction du glucose hépatique à partir des acides gras libres. Cette surproduction de glucose par le foie probablement secondaire à celle du glucagon ne suffit pas à équilibrer la glycémie. Troisièmement, c'est la réapparition d'une résistance à l'insuline fréquemment liée à l'obésité ou aux acides gras libres circulants (Virally M et al, 2007). En effet la majorité des diabétiques ont une surcharge pondérale.

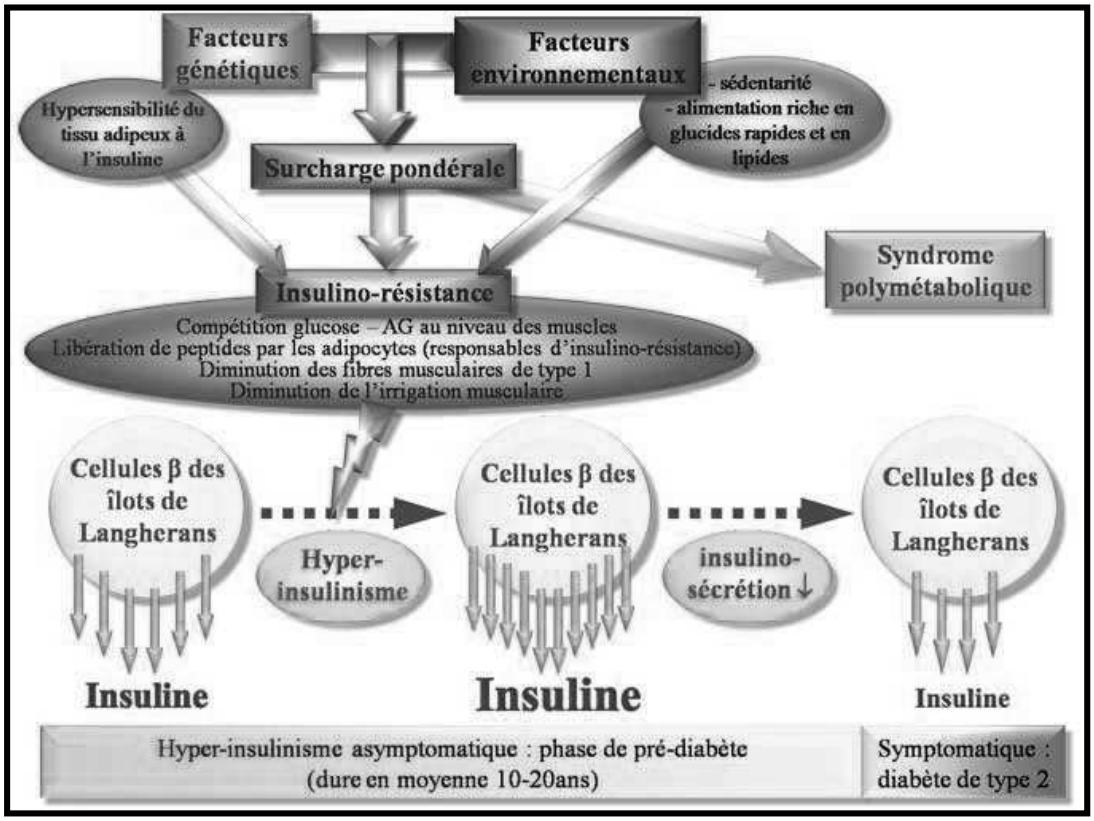


Figure 12 : Mécanismes de survenue du diabète.

Au début de la maladie la production d'insuline par le pancréas est normale. La prise de poids liée à une alimentation trop grasse et à un manque d'activité induit un stockage des graisses au niveau des cellules musculaires squelettiques et du tissu adipeux viscéral : les acides gras libres favorisent la synthèse hépatique des triglycérides et stimulent la néoglucogenèse hépatique. Au niveau musculaire, il existe une véritable compétition métabolique entre les acides gras libres et le glucose : les acides gras libres sont oxydés en priorité, entraînant une production accrue d'acetyl CoA qui inhibe en retour les enzymes de la glycolyse. L'énergie musculaire est donc fournie en priorité par l'oxydation des acides gras libres et le stock de glycogène musculaire reste intact, ce qui réprime en retour la glycogène synthase.
En résumé, le stockage et l'utilisation du glucose sont diminués au niveau musculaire alors qu'au niveau hépatique, il y a une stimulation de la néoglucogénèse. Ce processus participe à augmenter la glycémie (Figure 12).

Lors de la pathologie diabétique, l'oxydation des acides gras (vue ci-dessus) et les hyperglycémies engendrent un stress oxydant dû à la production d'ions superoxydes.

1.5.2.2. L'insulinodéficience

Ce stade d'insulinorésistance peut durer 10 à 20 ans, délai pendant lequel l'hyperinsulinisme permet de maintenir la glycémie à jeun inférieure à 1.2g/L (Figure 13).

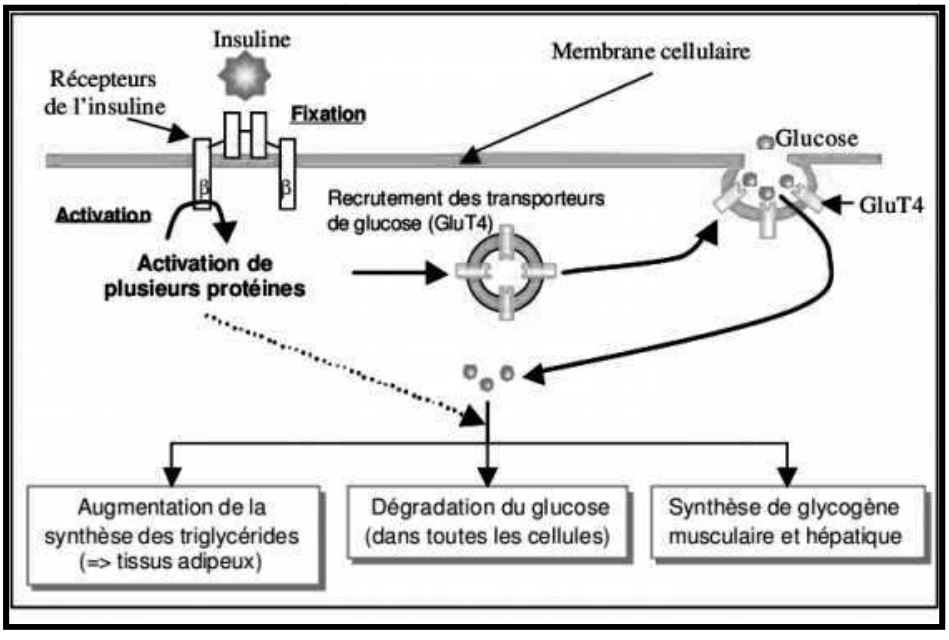


Figure 13 : Mécanismes d'entrée du glucose dans la cellule.

Par la suite, l'insulinémie décroît progressivement en même temps que la glycémie à jeun dépasse 1.2g/L. Un diabète franc apparait lorsque l'insulinodéficience devient totale et que la glycémie à jeun dépasse 2g/L. Cette insulinodéficience serait le résultat de plusieurs mécanismes et elle va de pair avec l'insulinorésistance. Les recherches actuelles ne permettent pas d'établir celui qui interfère en premier (WWW.exobiologie.info/diabete/11insulinoresist.pdf).

En premier, on peut rappeler l'apoptose des cellules β secondaire à l'insulinorésistance. Par ailleurs une étude a permis d'établir que cette insulinodéficience n'était pas la conséquence d'une baisse du nombre de récepteurs mais d'un défaut de signalisation de la voie de l'insuline (Bouzakri K et al, 2005). Grâce aux nouvelles technologies, notamment la résonance magnétique nucléaire, on peut identifier *in vivo* les étapes défectueuses du transfert de glucose insulinodépendant (Shulman GI, 2000). Ainsi, il a été observé une inhibition de la phosphorylation du récepteur IRS (InsulinReceptor Substrat) sur la tyrosine, une diminution de l'association IRS- sous unité p85 de la phosphatidyl inositol-3-kinase entrainant la diminution de la cascade enzymatique permettant l'exposition membranaire du GLUT4 et, de ce fait, la diminution du transport du glucose (Litherland GJ et al, 2001) (Figure 14).

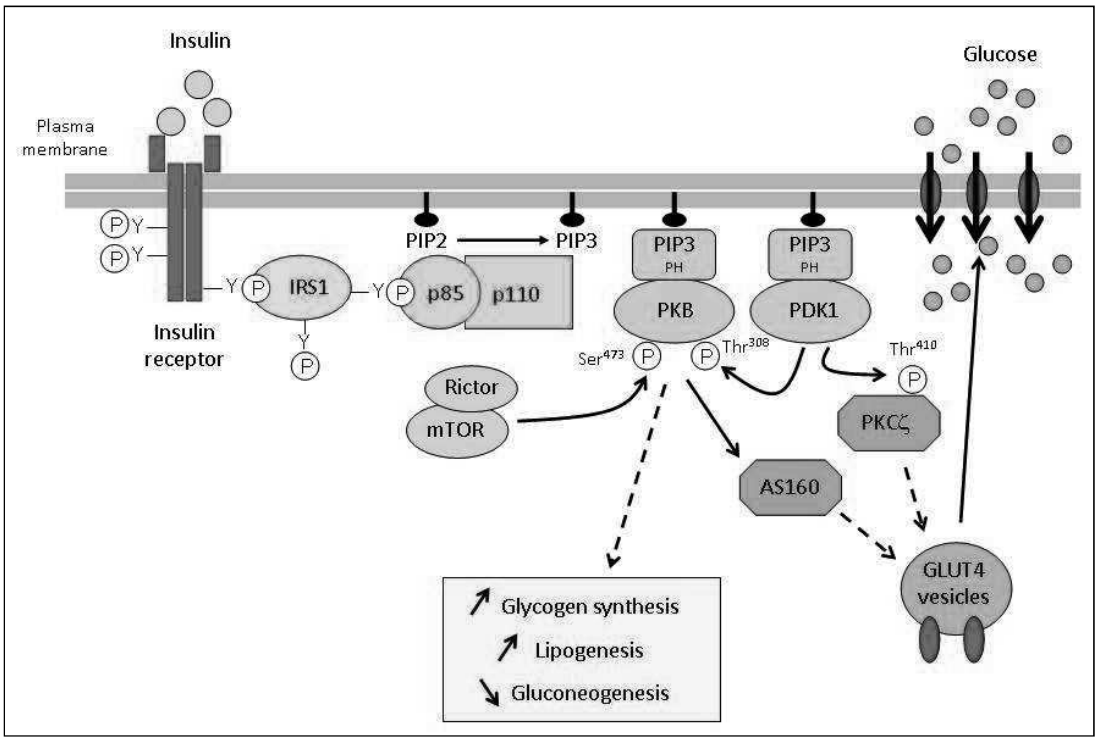


Figure 14 : Voie de signalisation insulinique

Enfin Il est clairement établi qu'une augmentation de la quantité de lipides dans les tissus périphériques non-adipocytaires serait responsable du phénomène d'insulino-résistance en induisant une accumulation de molécules de signalisation intracellulaire qui interfèrent avec la voie de signalisation insulinique. Bien que la lipotoxicité soit souvent corrélée avec une augmentation des triglycérides intracellulaires, il est maintenant bien documenté que ce sont des métabolites dérivés des acides gras qui sont impliqués. Dans le muscle squelettique, ce sont les céramides, produits à partir du palmitate, qui sont des facteurs majeurs dans le développement de la résistance à l'insuline induite par un excès lipidique (Summers SA, 2006).

1.5.2.3. Les complications du diabète

Les complications de cette pathologie surviennent après plusieurs années. Le diabète est aujourd'hui une des principales causes de mortalité et de morbidité dans les pays touchés.

Le diabète est difficile à équilibrer, il y souvent des oscillations entre hyperglycémies et hypoglycémies.

Les conséquences de ces deux évènements peuvent être graves si l'équilibre glycémique n'est pas rétabli. C'est pourquoi il est important de connaître et repérer les premiers signes d'alerte de ces variations de glycémies.

L'hyperglycémie se caractérise par une polyurie, une soif importante et un dessèchement de la bouche, une somnolence. Ces symptômes sont dus à des réactions métaboliques. Le manque d'insuline empêche le glucose de rentrer dans les cellules pour produire de l'énergie.

Les hépatocytes prennent alors le relai via la glycogénèse et la glycogénolyse pour produire le glucose. De plus comme alternative ils utilisent les acides gras comme substrat énergétique. Ces acides gras subissent des réactions de désaminations et de transammination pour rentrer dans le cycle de Krebs.

Lors de ces réactions des produits secondaires toxiques sont produits : les corps cétoniques, ce sont des composés acides qui diminuent le pH sanguin et conduisent à l'acidocétose.

L'absence de prise en charge médicale entraine une hypotension, une altération de la fonction cardiaque et un coma acido-cétosique.

L'hypoglycémie se traduit par des étourdissements, des vertiges, des tremblements, une vision trouble, des maux de tête, une sudation importante et une asthénie soudaine et intense qui peut entrainer un coma. Le traitement d'urgence repose sur l'administration de sucre ou l'injection de glucagon.

Dans pratiquement tous les pays industrialisés, cette maladie est classée parmi les causes majeures de cécité, d'insuffisance rénale et d'amputation des membres inférieurs.

L'hyperglycémie chronique a un impact non négligeable sur le système cardiovasculaire. Le risque de maladies cardiovasculaires est presque 3 fois plus élevé chez une personne diabétique que dans l'ensemble de la population (Figure 15) (International Diabetes Federation, 2007).

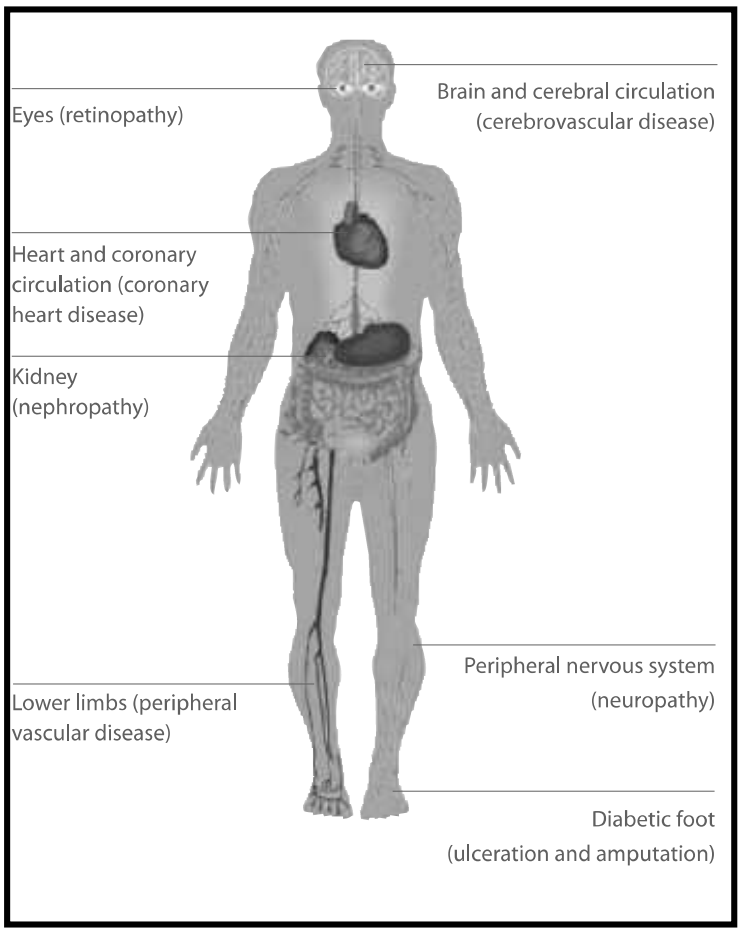


Figure 15 : Les complications cardiovasculaires liées (Diabetes atlas troisième édition 2007, IDF)

L'hyperglycémie chronique provoque des lésions tissulaires dont le mécanisme est complexe et pas entièrement connus. Il comprend un épaississement et une fragilité des vaisseaux avec un niveau élevé de thrombose veineuse.

Les complications cardiovasculaires sont inévitables après plusieurs années de diabète. Elles représentent 50% des décès dus au diabète. Au niveau cardiaque on observe un angor, douleur au niveau de la poitrine causée par un phénomène d'ischémie qui si l'artère vient à se boucher complètement aboutit à l'infarctus du myocarde.

Toutes ces pathologies voient leur probabilité de survenue augmentée par une hypertension artérielle, une hypercholestérolémie, ou un tabagisme, concomitants au diabète (Haffner SM et al , 1998).

- La première complication majeure est la rétinopathie diabétique. Elle constitue la première cause de cécité dans les pays industrialisés chez les moins de 65 ans. Les capillaires de la rétine sont alors obturés avec une accumulation de liquide derrière la rétine formant un œdème maculaire. De plus le diabète majore le risque de survenue de cataracte et de glaucome. Une surveillance régulière par un examen du fond de l'œil permet de diagnostiquer tôt ces troubles et de les traiter par laser.

- La néphropathie diabétique : chez le patient diabétique la capacité de filtration glomérulaire est diminuée, les déchets toxiques s'accumulent donc. Pour y remédier la prise en charge se fait grâce à des dialyses si l'insuffisance rénale est terminale.

- Les neuropathies périphériques : l'hyperglycémie endommage le système nerveux. Ces anomalies des nerfs se manifestent surtout aux niveaux des membres inférieurs des patients. Leur sensibilité est diminuée aux niveaux des pieds et des orteils. A cela peut s'ajouter des douleurs, des crampes, des fourmillements et des picotements. Il est très important pour le patient diabétique de surveiller régulièrement l'hygiène de ses pieds. Toute infection passée inaperçue peut avoir des conséquences gravissimes par la suite.

A l'extrême, un pied diabétique mal soigné peut conduire à l'amputation d'une partie du membre inférieur, cela représente une incidence de 463/100.000 (Davis TM et al, 1997).

1.5.3. Traitement du diabète

En première intention, ce sont les règles hygiéno-diététiques, mais souvent celles-ci ne suffisent pas. Le traitement médicamenteux se fait par les antidiabétiques oraux associés ou non à de l'insuline.

1.5.3.1 Les mesures hygiéno-diététiques

- l'alimentation

Pour améliorer le contrôle glycémique des patients diabétiques (type 1 et 2), il est nécessaire de modifier et contrôler leur régime alimentaire. Une réduction du poids est souvent nécessaire. Cette modification du régime alimentaire se fait avec l'accompagnement de médecins nutritionnistes ou de diététiciens. L'alimentation du diabétique doit être équilibrée entre les 3 repas quotidiens et comporter des glucides (environ 50% de l'apport énergétique total), des lipides (35%), des protéines (15%).
Les glucides doivent provenir d'aliments à faible index glycémique comme le riz, les pâtes, le pain et les légumes secs (Figure 16).
Les graisses seront limitées de préférence aux graisses d'origine végétale avec au maximum 5 à 10% d'acides gras saturés et 20 à 25% d'acides gras insaturés. Les sucres rapides tels que les boissons sucrées, les confitures, les confiseries et les glaces sont à bannir, de même que le grignotage. Un régime hypocalorique permet de réduire plus facilement le surpoids.
En effet, des études indiquent que la meilleure alimentation pour prévenir la prise de poids, l'obésité, le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires est une alimentation pauvre en graisse et en boissons sucrées en privilégiant les fibres, les céréales et les protéines (Astrup A, 2005). La pyramide de D.Ludwig a pour objectif de minimiser la charge glycémique de l'alimentation, dans le but de perdre du poids, et plus généralement de se mettre à l'abri des problèmes de santé comme le prédiabète, le diabète et ses complications, certains cancers digestifs, les maladies cardiovasculaires, le vieillissement accéléré (Figure 16). D'emblée, ce sont les fruits et légumes qui devraient être consommés en plus grande quantité, devant les

légumineuses, les viandes et les laitages, tous regroupés au premier étage. Les céréales complètes et les pâtes sont reléguées au deuxième étage. Au dernier, on trouve, les céréales raffinées et les sucreries.

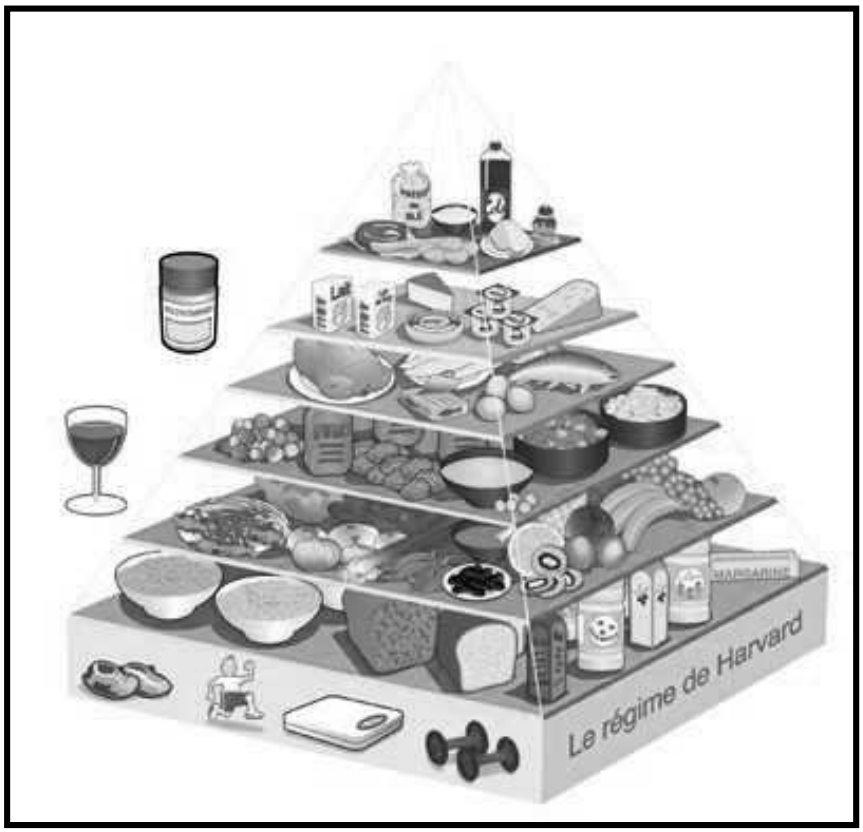


Figure 16 : La pyramide de l'index glycémique de D. Ludwig

- L'activité physique

Associée à des règles alimentaires spécifiques, la pratique d'une activité physique régulière est indispensable (marche, vélo, natation...). Idéalement, une activité de 45 minutes, 3 jours par semaine voire tous les jours est requise.

Cela permet de diminuer les besoins en insuline et l'insulino-résistance, de diminuer le taux de triglycérides par augmentation des récepteurs aux LDL et d'augmenter la dépense énergétique. Cependant, pour un patient diabétique de type 1, l'exercice physique ne doit pas être intense car il augmente le risque d'hypoglycémie.

1.5.3.2. Les antidiabétiques oraux

La metformine est un biguanide a action normoglycémiante en réduisant la néoglucogenèse hépatique, elle entraine une diminution modérée de la production d'ATP dans les cellules du foie, mais suffisante pour réduire le flux de la production

de glucose hépatique. D'autre part les chercheurs ont découverts un effet à long terme de la metformine : en modulant l'AMPK, elle pourrait améliorer la stéatose hépatique (Foretz M et al, 2007). C'est un médicament à prendre au cours des repas pour éviter les troubles digestifs indésirables. Outre cet effet indésirable, elle peut entraîner une acidose lactique par surdosage ou insuffisance rénale et cardiaque ou par la consommation d'alcool. Elle existe associée aussi à d'autres molécules médicamenteuses comme dans le Glucovance® (+glibenclamide) ou à l'insuline.

L'acarbose ou Glucor®, inhibiteur des glucosidases intestinales, joue le rôle de faux substrat retardant l'hydrolyse des glucides complexes. Il atténue l'hyperglycémie post prandiale.

Les sulfamides hypoglycémiants : glimépiride (Amarel®) ou glibenclamide (Daonil®) et glicazide (Diamicron®) ont une action hypoglycémiante en stimulant la sécrétion d'insuline par les cellules β par fermeture des canaux potassiques ATP dépendant. Associés à la metformine ils ont une action synergique. Ils sont des substrats des cytochromes 2C9 et 2C19, donc, leur association est déconseillée avec les AVK (acénocoumarol, warfarine), les anticonvulsivants (acide valproïque), les AINS (diclofenac, flurbiprofene, ibuprofène). Ils sont indiqués dans le diabète non insulinorequérant.

Les glinides tel que le répaglinide (Novonorm®), sont des composés hypoglycémiants important par le même mécanisme d'action que les sulfamides. Leur administration se fait dans les 15 minutes avant les repas car leur pic d'activité est atteint en 1heure. Le répaglinide peut être associé à la metformine en cas de diabète insuffisamment contrôlé par monothérapie. Il est métabolisé par le cytochrome 3A4 et contre indiqué en association avec le gemfibrozil (Lipur®) (risque d'hypoglycémie sévère).

Deux classes plus récemment mises sur le marché sont indiquées en seconde intention :

- Les inhibiteurs de la dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4) : le sitagliptine (Xelevia®, Januvia®).
- Les analogues de la glucagon-like-peptide-1 (GLP1) : l'exenatide (Byetta®) incrétinomimétique qui augmente la sécrétion d'insuline et inhibe celle du glucagon. Il ralentit la vidange gastrique, diminuant ainsi le taux d'absorption intestinal de glucose. Les effets indésirables les plus courants sont des nausées, vomissements, diarrhée. En raison de la modification de

la vidange gastrique, les IPP et toutes les formes gastrorésistantes doivent être pris une heure avant l'injection. En effet ce médicament se présente sous forme de stylo injecteur et est utilisé à la posologie initiale de deux injections de 5µg par jour.

1.5.3.3. Les insulines

Elles se présentent sous différentes formes d'administration (cartouche, flacon) mais la plus commune est le stylo injecteur (Figure 17).

Figure 17 : Stylo à insuline.

On différencie les insulines en fonction de leurs durées d'action (Tableau 3).

Tableau 3 : Les différents types d'insulines

Insulines rapides	Insulines retard ou intermédiaires	Insulines lentes
Délai d'action : 15 min Durée d'action : 2-5h	Délai d'action : 15-30 min Durée d'action : 12-20h	Délai d'action : 1-4h Durée d'action : 24h
Humalog® Novarapid®	Humalox mix 25®, 50® Novomix 30®, 50®, 70® Insuman Comb 15®, 25®, 50®	Insulatard® Lantus® Levemir®

Les insulines rapides sont injectées en bolus au moment des repas, elles agissent sur les pics de glucose. Les insulines lentes miment la sécrétion d'insuline basale et sont administrées une fois par jour (Figure 18).

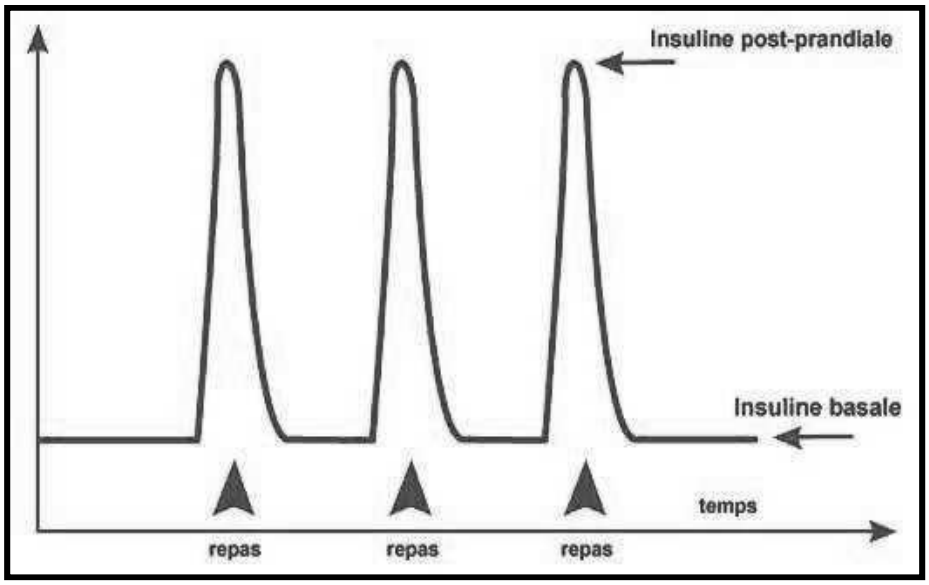


Figure 18 : Représentation du schéma basal/bolus

Un dispositif nouveau, la pompe à insuline ambulatoire, permet une libération en continue d'insuline avec la possibilité de faire des bolus aux repas ou en cas d'hyperglycémie (Figure 19). L'insuline utilisée est conditionnée en cartouche.

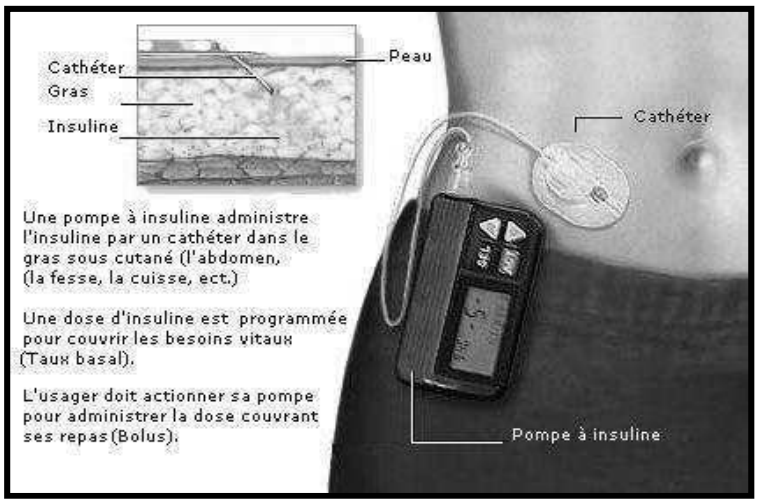


Figure 19 : Pompe à insuline

Avant toute injection d'insuline, les patients doivent réaliser un contrôle glycémique. Ils se piquent le doigt à l'aide d'un auto piqueur afin d'obtenir une goutte de sang. Le sang est placé sur la bandelette d'un lecteur glycémique. Par réaction chimique faisant intervenir la glucokinase, le lecteur détermine la glycémie (Figure 20).

Figure 20 : Kit d'auto surveillance du diabète

1.5.3.4. Les molécules thérapeutiques récentes

L'idée que certains facteurs, produits par la muqueuse digestive sous l'effet d'un repas, sont capables de stimuler la libération d'insuline a été introduite dès le début des années 1900. Cependant c'est Creutzfeld en 1979 qui élucida la théorie des incrétines : l'ingestion de glucose au niveau du tractus digestif stimule la production d'insuline grâce à des signaux chimiques relayés et amplifiés par les incrétines. Ce phénomène implique 50-70% de l'insuline totale sécrétée lors de l'administration orale de glucose (Girard J, 2008).

Les deux hormones impliquées dans l'effet incrétine sont le GIP (Glucose-dependent Insulinotropic Peptide) et le GLP-1 (Glucagon Like Peptide 1).

Leurs concentrations plasmatiques physiologiques sont faibles (5-10pmol/L) mais augmentent fortement dans les 5 à15 minutes après un repas (15-50pmol/L).

Le mécanisme d'action des incrétines est le suivant : le glucose ingéré stimule la production de GLP-1 et de GIP intestinal, ces incrétines se lient à des récepteurs spécifiques au niveau des cellules α et β pancréatiques (Figure 21).

L'activation des récepteurs entraine :

- une augmentation de l'AMP-cyclique
- une inhibition des canaux potassiques ATP-dépendants
- une augmentation du calcium intracellulaire

- l'exocytose glucose dépendante de l'insuline
- la prolifération des cellules β
- une diminution de la sécrétion glucose dépendante du glucagon
- un ralentissement de la vidange gastrique
- la régulation de la prise alimentaire et de l'appétit.

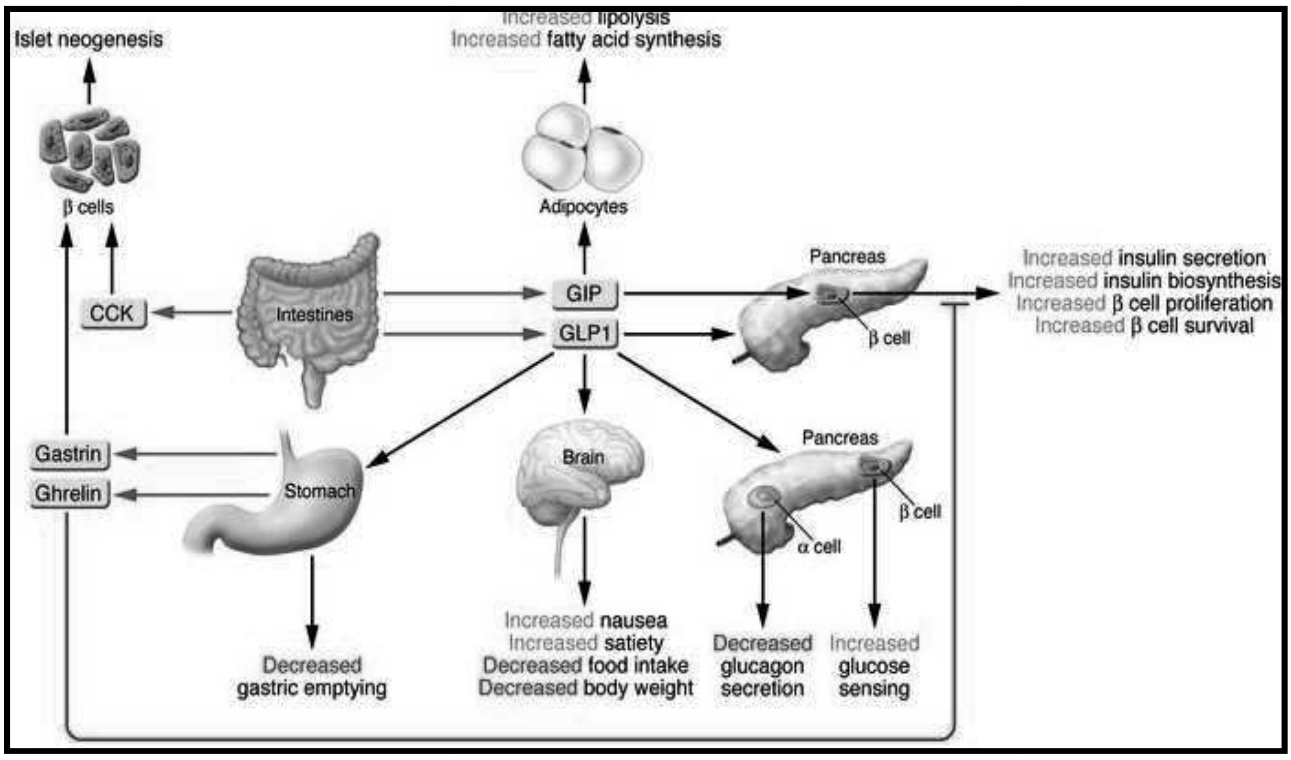


Figure 21 : Le rôle des hormones intestinales dans l'homéostasie du glucose. (Le rôle des hormones intestinales dans l'homéostasie du glucose. Drucker. J Clin Invest 2007)

L'inconvénient ces incrétines est leur demi vie très brève : 1 à 2 minutes pour le GLP-1 et 5 à 7 minutes pour le GIP. Elles sont inactivées par une enzyme plasmatique, la DPP4 (Dipeptidyl-peptidase 4) (Virally M et al, 2008).

Lors du diabète de type 2, l'effet incrétine est altéré du fait d'un déficit en GLP-1. Les nouvelles thérapeutiques antidiabétiques sont basées sur l'action des incrétines, dont on retrouve deux classes : les analogues du GLP-1 et les inhibiteurs de la DPP-4.

- Les analogues du GLP-1

L'Exenatide ou Byetta® (laboratoire Eli Lilly) est commercialisé depuis 2006. Cette molécule a 50% de similitude avec le GLP-1 humain et résiste à la dégradation par la

DPP-4. C'est un agoniste du récepteur du GLP-1. Son administration se fait par injection sous cutanée.
Il est présenté en stylo pré-rempli contenant 5µg ou 10µg/dose. L'utilisation du Byetta® n'est recommandée qu'en deuxième ou troisième intention, toujours en association avec la metformine, un sulfamide ou une thiazolidinedione.
Il est administré avant le repas, au début à la posologie de 5µg 2 fois par jour puis celle-ci peut être augmentée à 10µg 2 fois par jour. Il augmente la synthèse d'insuline, diminue celle du glucagon, entraîne un effet de satiété et n'entraîne pas d'hypoglycémie.
Les effets indésirables très fréquents (≥1/10) survenant avec le Byetta® sont des troubles gastro-intestinaux précoces (nausées, vomissements, diarrhée) mais qui peuvent s'atténuer. Des effets indésirables majeurs ont été mis en évidence depuis sa commercialisation : pancréatites (une étude cas-témoin américaine montre une forte augmentation du risque de pancréatite mais aussi de cancer de la thyroïde associé avec l'exenatide ; Il multiplie par 6 le risque de pancréatite par rapport au groupe contrôle) (Elashoff M et al, 2011) et d'insuffisances rénales dans la majorité des cas réversibles à l'arrêt du traitement (Revue prescrire 2008, FDA, 2009*).*

Le Liraglutide ou Victoza® (laboratoire Novo Nordisk) est administré une fois par jour à n'importe quel moment de la journée en injection sous cutanée. Lui aussi est utilisé dans le cadre de la bithérapie, initié à la dose de 0,6 mg par jour et qui peut être augmentée à 1,2mg par jour. Il a des effets similaires au Byetta®. L'utilisation du Victoza® est associée à des effets gastro-intestinaux transitoires (très fréquents ≥1/10), une sensibilité aux infections (≥1/100) mais aussi des effets indésirables thyroïdiens tels que l'apparition d'un goitre ou d'une néoplasie thyroïdienne, rapportés dans les études cliniques (HAS, 2009).

- Les inhibiteurs de la DPP-4

Ils sont aussi appelés les gliptines. Ce sont de nouveaux antidiabétiques oraux indiqués dans le diabète de type 2. Ils réduisent la dégradation endogène de GLP-1.
La Sitagliptine ou Januvia®, associée à la metformine dans la spécialité Janumet® (Ahren B, 2010).
La Vildagliptine ou Galvus®, associée à la metformine dans la spécialité Eucréas®.
La Saxagliptine ou Onglyza®.

L’utilisation de ces gliptines est à privilégier pour les patients pour qui la prévention du risque hypoglycémique est importante, et pour qui une prise de poids est potentiellement délétère. Leurs principaux effets indésirables sont une sensibilité des voies aériennes supérieures aux infections, ainsi que des troubles digestifs.

2. Le stress oxydant

2.1. Définition

Au cours de ces dernières années, les termes radicaux libres, espèces oxygénées réactives (ROS), stress oxydant et antioxydants sont devenus des termes familiers tant dans le monde médical que dans le grand public.

Ce n'est que depuis les années 50 que des études ont montrées le rôle de l'oxygène indispensable à la vie mais aussi de sa toxicité pour l'organisme. En 1969 les Américains Mc Cord et Fridovich isolent à partir des globules rouges humains un système enzymatique antioxydant, la superoxyde dismutase (SOD), qui élimine le radical libre superoxyde. Cette découverte a été le point de départ de nombreuses recherches sur les radicaux libres. Les radicaux libres sont des molécules instables qui possèdent sur leur couche externe au moins un électron non apparié (Halliwell B et al, 1989).

Cette grande instabilité va conduire ces molécules à réagir avec de nombreux composés (enzymes, ADN, lipides, protéines, glucose) pour devenir plus stables. Au début des années 90, c'est une certitude, l'existence de radicaux libres est bien montrée grâce à l'utilisation de la résonance paramagnétique électronique (RPE) associée au « sprintrapping » (Cadenas E et al, 2000)

Dans la foulée de la découverte de la SOD, les scientifiques élaborent également de multiples expériences in vitro montrant la toxicité des radicaux libres, en provoquant des dégâts cellulaires important tels les cassures et mutations au sein de l'ADN, l'inactivation de certaines enzymes, la modification de la structure protéique, l'oxydation des sucres et l'induction de la peroxydation lipidique. En condition physiologique, l'organisme produit lui aussi des espèces réactives notamment des espèces oxygénées activées (ROS) mais leur concentration est limitée par le métabolisme antioxydant.

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre profond de la balance pro-oxydants/antioxydants en faveur des premiers ce qui conduit à un affaiblissement des défenses antioxydantes et à des dégâts cellulaires irréversibles par surproduction des ROS (Figure 22).

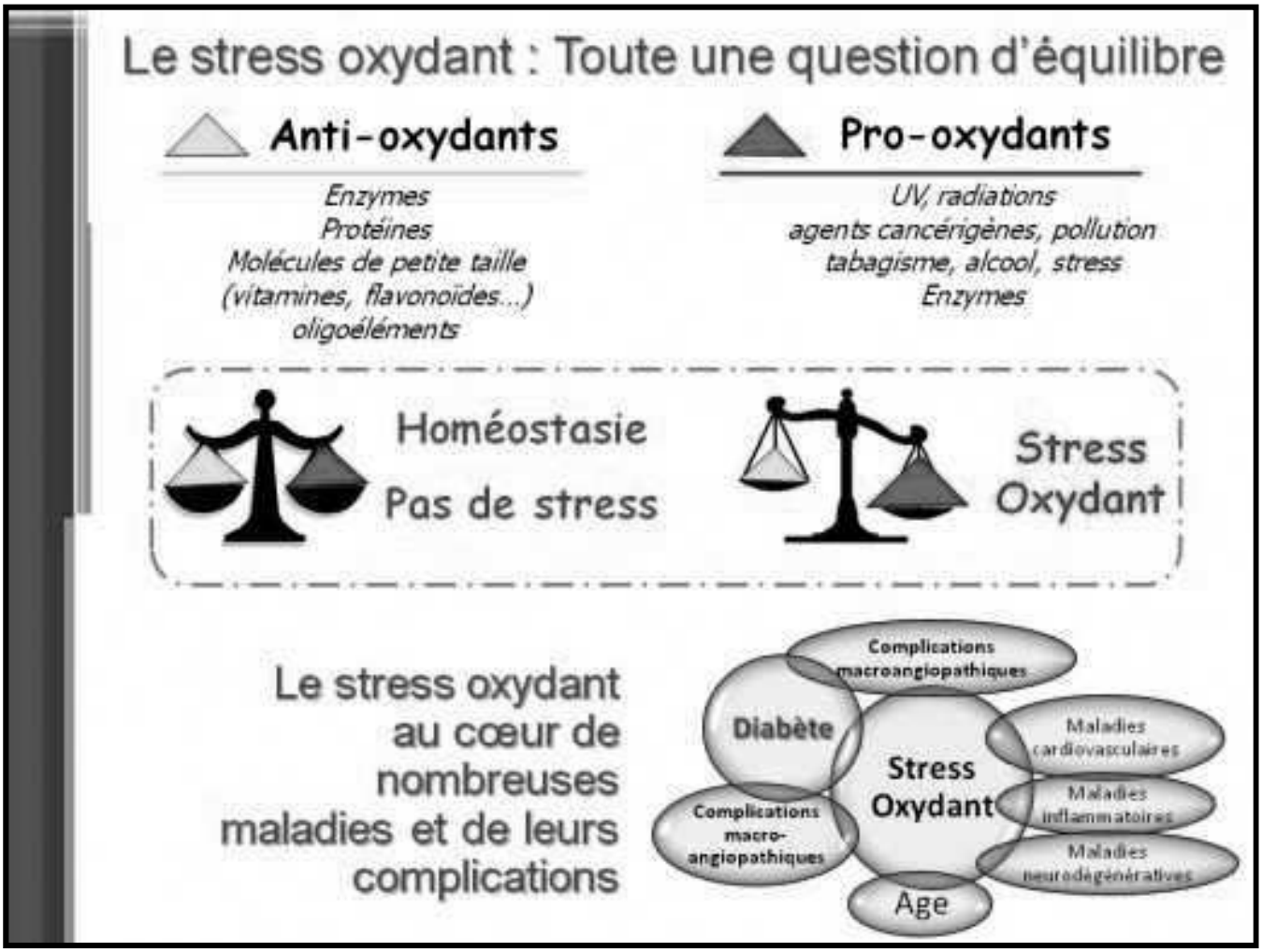


Figure 22 : Le stress oxydant, diabète et complications. CEED (Centre Européen d'Etude du Diabète) (Dal S, 2007)

2.2. Les systèmes pro-oxydants

2.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les espèces réactives de l'oxygène qui nous intéressent ici sont l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2, le radical hydroxyle $OH^{\cdot}$, le radical hydroperoxyle $HO_2^{\cdot}$, les radicaux peroxydes $ROO^{\cdot}$ et le radical alkoxyle $RO^{\cdot}$ (Figure 23).

Il existe deux autres grandes familles d'espèces réactives :

- Celle de l'azote ou RNS (Reactive Nitrogen Species) qui donnent le monoxyde d'azote ($NO^{\cdot}$), le radical peroxyl ($ROO^{\cdot}$), les peroxynitrites ($ONOO^{-}$) (Massion P et al, 2002).

- Les espèces réactives du chlore ou RCS (Reactive Chlorine Species) comme l'acide hypochlorique HOCl.

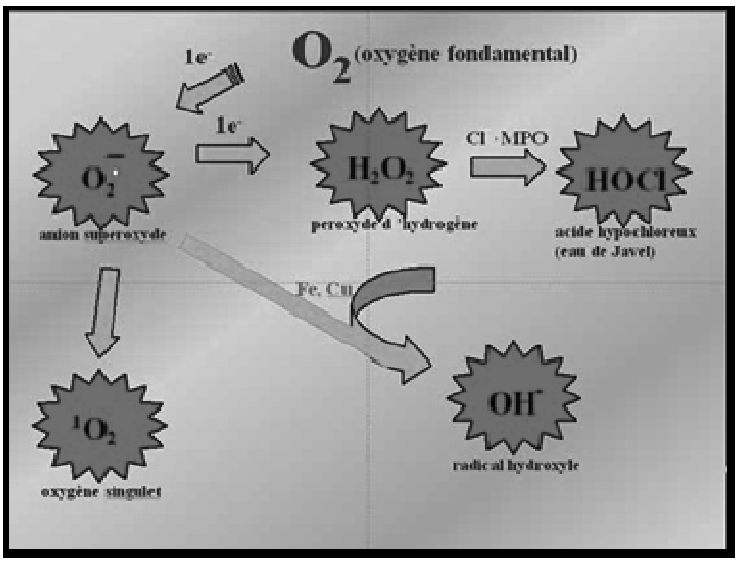


Figure 23 : Description des espèces oxygénées activées

L'énergie produite par l'organisme pour fonctionner provient de l'ensemble des réactions enzymatiques notamment les réactions d'oxydoréduction. Ceux sont des réactions d'échanges d'électrons : un oxydant capte un électron d'une autre molécule qui se trouve alors réduite.

La majorité de l'énergie est produite par la chaîne de transfert d'électrons mitochondriale (Figure 24). L'oxygène que nous respirons est réduit en molécule d'eau par l'intermédiaire de protéines et de quatre complexes enzymatiques localisés dans la membrane mitochondriale (réaction (a)).

$$O_2 + 4\ e^- + 4\ H^+ \rightarrow 2\ H_2O \qquad (a)$$

Cette réaction est catalysée par la cytochrome oxydase présente dans le complexe IV de la chaine de transport d'électrons située dans la membrane interne mitochondriale. Elle conduit à la production d'énergie sous forme d'ATP (Hodge JE, 1953).

Cependant, lors de cette réaction, environ 2% de l'oxygène n'est pas réduit en eau, il est transformé en espèces oxygénées réactives. La production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) est normale dans tous les organismes aérobies, elle ne constitue pas en soi une situation de stress oxydant.

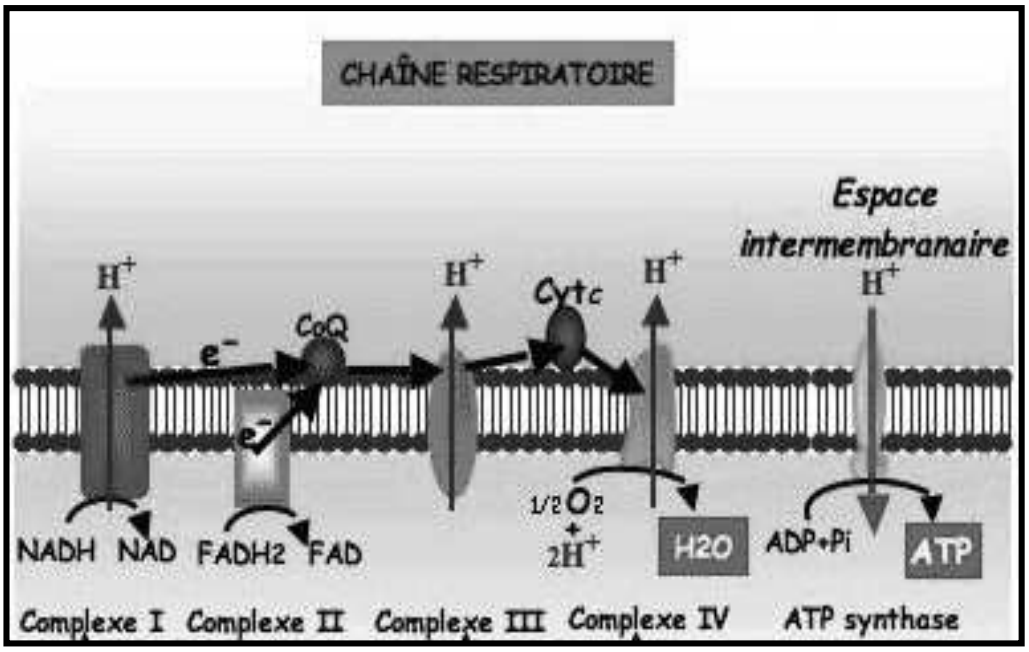


Figure 24 : La chaine respiratoire

L'oxygène subit au niveau du complexe 1 de la chaîne respiratoire ou ubiquinone, une réduction monoélectronique (réaction (b)) en présence d'un cofacteur NADH conduisant à la formation du radical superoxyde $O_2^{-\cdot}$ (Cadenas E et al, 2000).

$$O_2 + 1\ e^- \rightarrow O_2^{-\cdot} \qquad (b)$$

De même, la NADH-deshydrogénase située dans la membrane mitochondriale interne, tout comme la NADPH-oxydase présente au niveau des cellules vasculaires endothéliales (Griendling KK el al, 2000), peuvent conduire à la formation de

radicaux $O_2^{\cdot -}$. Par ailleurs, l'apparition de radicaux superoxydes peut résulter de l'auto-oxydation (oxydation par l'oxygène) de composés tels que des neuromédiateurs (adrénaline, noradrénaline, dopamine…), des thiols (cystéine), des coenzymes réduits ($FADH_2$), mais aussi de la détoxification des xénobiotiques (médicaments) par les cytochromes P450 présents au niveau du réticulum endoplasmique (Halliwell B et al, 1999). Le radical superoxyde est éliminé ou tout au moins maintenu à un niveau de concentration assez bas par des enzymes appelées superoxyde dismutases (SOD) qui catalysent sa disparition par dismutation (réaction (c)).

$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} \rightarrow H_2O_2 + O_2 \quad (c)$$

Outre l'$O_2^{\cdot -}$ il y a aussi le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 formé par la chaîne respiratoire qui n'est pas un radical libre mais néanmoins une molécule oxydante pour l'organisme par genèse du radical hydroxyle $OH^{\cdot}$. Sa production peut également résulter de la réduction biélectronique de l'oxygène (réaction (d)) en présence d'oxydases (aminoacides oxydases, glycolate oxydase…) qui se trouvent principalement dans des organites cellulaires bien individualisés comme les peroxysomes. Par ailleurs, la membrane mitochondriale externe renferme une monoamine oxydase capable de catalyser la désamination oxydative de certaines amines avec production simultanée de H_2O_2.

$$O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 \quad (d)$$

La concentration d'eau oxygénée est régulée par des enzymes telles que la catalase (présente dans les peroxysomes) et les glutathion peroxydases (localisées dans le cytosol). La catalase accélère la réaction de dismutation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau (réaction (e)), tandis que la glutathion peroxydase accélère la réaction d'oxydation du glutathion (GSH) par l'eau oxygénée (réaction (f)).

$$H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2 \quad (e)$$

$$H_2O_2 + 2\ GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG \quad (f)$$

La majeure partie de la toxicité de l'eau oxygénée provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle $OH^{\cdot}$. En présence de cations métalliques tels que Fe^{2+} (réaction dite de Fenton, réaction (g)) ou Cu^+ (Wardman P et al, 1996). En effet, par la réaction de Fenton, le peroxyde d'hydrogène va produire l'ion $OH^{\cdot}$, réaction non enzymatique faisant intervenir le système d'ions ferreux.

$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^- + OH^{\cdot} + Fe^{3+}$ (g)

Le radical hydroxyle est particulièrement délétère vis-à-vis des matériaux biologiques (ADN, protéines, lipides) en raison de son extrême réactivité et de l'absence de destruction enzymatique. Ce radical diffuse peu, il agit à proximité de son site de production, contrairement aux ions superoxydes, selon trois modes d'action : en arrachant un électron, en arrachant un atome d'hydrogène, ou en se fixant sur les doubles liaisons.

Notre organisme produit donc en permanence ces ROS. Outre la chaîne respiratoire comme source principale, il y a d'autres enzymes comme la NAD(P) H oxydase dans la paroi vasculaire ou les xanthines oxydases lors des phénomènes d'ischémie reperfusion qui en produisent. Dans certaines conditions, il apparait un déséquilibre provoqué par une production exagérée de radicaux libres ou par une diminution des systèmes de défenses, ou encore par une association de ces deux phénomènes. Un tel déséquilibre entre systèmes producteurs de ROS et systèmes antioxydants caractérise l'état de stress oxydant (Halliwell B et al, 1999), sans qu'il soit aisé de déterminer si ce dernier est causal ou s'il constitue seulement une réponse de l'organisme à des stimuli, notamment inflammatoires.

2.2.2 Rôle physiologique des ROS

Le rôle des ROS est très complexe car elles peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration. Les espèces oxygénées réactives existent dans les cellules et les tissus à faible concentration et ont le rôle de second messager ou de protecteur et régulateur du fonctionnement cellulaire, notamment les radicaux superoxydes (Halliwell B et al, 1989).

Les ROS sont impliqués dans :

- les phénomènes d'apoptose
- la prolifération des cellules musculaires lisses (cellules vasculaires) et ont un rôle dans le tonus vasculaire notamment le monoxyde d'azote radicalaire $NO^{\cdot}$ Il est synthétisé par les cellules endothéliales via l'action de NO synthase sur la L-arginine. C'est un radical très diffusible, dont les effets régulateurs s'exercent sur la plupart des fonctions physiologiques de l'organisme (maintien du tonus vasculaire, neurotransmission, fonctionnement rénal) (Hare J, 2004).

- L'action des facteurs de la transcription eux-mêmes responsables de l'activation de gènes impliqués dans la réponse immunitaire. Ils jouent un rôle dans l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales ou dans l'agrégation plaquettaire
- La modulation de l'expression de gènes de structure codant pour les enzymes oxydantes. Les radicaux superoxydes sont capables de modifier l'activité enzymatique de la tyrosine kinase et de sérine/thréonine kinases (telles que les « mitogen-activated protein kinases » ou MAPK) conduisant en aval à activer des facteurs de transcription qui vont initier l'expression de gènes « redox-sensibles ».
- la défense de l'organisme par leur action toxique sur les bactéries par le phénomène de « burst oxydatif » dans les leucocytes et particulièrement les polynucléaires neutrophiles (PN) (Dröde W, 2002). Les polynucléaires neutrophiles et les macrophages activés des tissus inflammatoires génèrent d'énormes quantités de ROS pour tuer les agents pathogènes. La NADPH oxydase phagocytaire produit des ions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène. Une autre enzyme phagocytaire participe à ce burst oxydatif, la myéloperoxydase qui génère de l'acide hypochloreux (HClO) un des plus forts oxydants physiologiques. Cette production massive de ROS antimicrobiens et tumoricides constitue la première ligne de défense contre les agents pathogènes environnementaux.
- le processus de fécondation, au cours duquel les spermatozoïdes sécrètent de grandes quantités de ROS pour percer la paroi membranaire de l'ovule. Ils sont impliqués aussi à une phase plus tardive, durant l'embryogénèse. Un accroissement des ROS dans des cellules particulières provoque l'apoptose requise pour l'élimination tissulaire durant la morphogenèse. Les données de Salas- Vidal et al suggèrent que la génération du stress oxydatif est une exigence commune à la mort cellulaire qui se produit pendant le développement embryonnaire de la souris (Salas-Vidal E et al, 1998).

A l'inverse, produites en quantité trop importantes, les ROS ont des effets délétères pour l'organisme.

2.2.3. Effets délétères du stress oxydant au niveau moléculaire

Les radicaux hydroxyles sont les ROS les plus dommageables du stress oxydant en raison de leur extrême réactivité. Paradoxalement les radicaux superoxydes sont eux-mêmes peu réactifs vis-à-vis de la majorité des substrats bioorganiques. Ce sont des espèces dont la durée de vie est relativement longue (quelques dizaines de secondes) et qui peuvent diffuser au-delà de leur lieu de production pour atteindre leurs cibles, les SOD, le cytochrome c, l'ascorbate (Halliwell B et al, 1999). Leur toxicité semble s'exercer de manière indirecte. En effet, en réagissant avec l'eau oxygénée, les radicaux $O_2^{\cdot -}$ peuvent donner naissance à des radicaux $OH^{\cdot}$ (réaction de Haber Weiss, catalysée par Fe^{2+}, réaction (h)), ou bien encore, en réagissant avec des radicaux $NO^{\cdot}$ Conduire à l'apparition de peroxynitrites (réaction i) (Moncada S et al, 1991).

$$O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^{\cdot} + OH^- \quad (h)$$

$$O_2^{\cdot -}\ NO^{\cdot} \rightarrow ONOO^- \quad (i)$$

Les principales cibles biologiques des ROS sont exposées ci-après.

2.2.3.1. L'ADN

L'ADN est une cible privilégiée pour les ROS. La guanine, par exemple, peut réagir avec $OH^{\cdot}$ Pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entrainant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement.

2.2.3.2. Les protéines

Les acides aminés possèdent des sensibilités variables vis-à-vis des ROS. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoque l'oxydation de certains résidus avec, pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaines peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaines. La plupart des dommages sont irréparables et entrainent des modifications fonctionnelles importantes (non reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique).

2.2.3.3. Les lipoprotéines

L'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation de LDL oxydées, qui sont captées par des récepteurs spécifiques des macrophages. L'activité de ces récepteurs n'étant pas régulée par la concentration intracellulaire en cholestérol, les macrophages se transforment petit à petit en cellules spumeuses (rôle important dans les premières étapes de l'athérosclérose) (Nakajima K et al, 2006). En outre, ces LDL oxydées sont immunogènes et les immuns complexes formés activent la voie classique du complément et génèrent la sécrétion de cytokines proinflammatoires par les macrophages (Saad A et al, 2006).

2.2.3.4. Les lipides membranaires

La peroxydation lipidique se fait de préférence sur les acides gras polyinsaturés tels que l'acide linoléique, l'acide α-linolénique ou l'acide arachidonique. Elle comporte 3 phases (Figure 25). La phase d'initiation ; une espèce radicalaire suffisamment réactive (comme $OH^{\cdot}$) arrache un atome d'hydrogène sur un carbone situé en α d'une double liaison des acides gras poly-insaturés (AGPI). Ce radical centré sur le carbone se stabilise par réarrangement intramoléculaire en formant un diène conjugué. Ce nouveau site radicalaire fixe facilement l'oxygène, c'est le début de la deuxième phase, la phase de propagation.
Cette phase de propagation voit la formation d'un radical peroxyle $ROO^{\cdot}$. Ce dernier peut à son tour arracher un atome d'hydrogène à un AGPI voisin, créant ainsi une réaction en chaine. Il se forme donc un hydroperoxyde lipidique ROOH et un acide gras radicalaire qui reprend la peroxydation. Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire.
La phase terminale de cette peroxydation conduit soit à la neutralisation des peroxydes par la glutathion peroxydase, soit à leur oxydation ou fragmentation en aldehydes (malondialdéhyde ou MDA) dont l'activité pro-athérogène est bien connue.

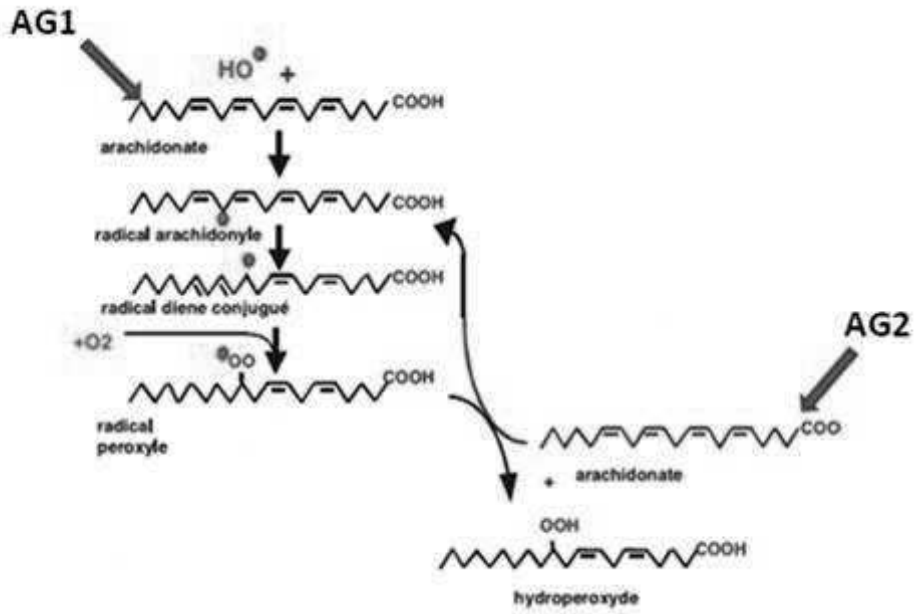


Figure 25 : La peroxydation lipidique

Les lipides concernés sont les phospholipides membranaires et les lipoprotéines circulantes. Cette oxydation modifie la structure chimique des membranes cellulaires, perturbant le fonctionnement des récepteurs et des transporteurs situés à la surface des phospholipides. Elle produit des LDL oxydés à l'origine des dépôts lipidiques de la plaque d'athérome. Lorsque les systèmes antioxydants sont dépassés, il s'agit d'une situation pathologique, on parle de stress oxydant.

2.2.4. Les facteurs environnementaux du stress oxydant

Les ROS sont également générées sous l'effet d'oxydants environnementaux comme le tabac, la pollution, l'alcool, l'exposition prolongée au soleil du fait de la nocivité des UV, les médicaments, le phénomène d'ischémie reperfusion (Vindis C, 2000).

Tableau 4 : Les facteurs contribuant à générer un stress oxydant

In vivo	Facteurs extérieurs

Altération de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie	Exposition prolongée au soleil et aux radiations
Activation des globules blancs, inflammation	Tabagisme
Phénomène d'ischémie reperfusion	Pratique trop intense d'un sport
Activation de la xanthine oxydase	Pollution, intoxication aux métaux lourds
Oxydation de l'hémoglobine	Consommation excessive d'alcool
Métabolisme accru des prostaglandines	Stress intellectuel, stress thermique
Libération de fer libre	Alimentation non équilibrée
	Prise de médicaments, pilule contraceptive

Le tabac est un vrai risque médical, il touche 34% de la population adulte française allant jusqu'une personne sur deux pour les 18-34 ans. Il induit ou potentialise de nombreuses maladies : diabète, cancers, problèmes cardiaques et respiratoires, asthme…

Une association significative entre le tabagisme et le diabète de type 2 a été mis en évidence par une méta-analyse publié en 2007 : comparativement aux non-fumeurs, le risque relatif de diabète est plus élevé pour l'ensemble des fumeurs (RR=1,61 pour les gros fumeurs) (Will C et al, 2007).

En ce qui concerne la prise d'alcool : les résultats d'études ont établi et confirmé qu'une consommation modérée de boissons alcooliques est associée à une diminution de l'incidence des maladies cardiovasculaires, à des effets protecteurs vis-à-vis du processus athéromateux, à peu d'incidence sur l'équilibre glycémique. En revanche une consommation excessive est pathologique (hépatotoxicité, hypoglycémie grave (Ref Diabete Quebec)). Elle entraine une surproduction d'anions superoxydes dans les cellules hépatiques, l'éthanol désorganise les membranes mitochondriales, diminue l'activité des complexes de la chaine respiratoire (Kukielka E et al, 1994).

2.3. Les marqueurs biochimiques de l'oxydation des lipides.

2.3.1. Les hydroperoxydes

Parmi les lipides, les acides gras libres, les phospholipides, les triglycérides, les esters de cholestérol et le cholestérol peuvent conduire à la formation d'hydroperoxydes. Ce sont les produits « primaires » de la peroxydation lipidique. De nombreuses méthodes peuvent être utilisées pour déterminer la concentration de ces

lipides oxydés. En 2003 Gay et Gebicki publie une méthode permettant de mesurer séparément les hydroperoxydes issus des lipides et des protéines. Ils extraient les lipides de l'échantillon biologique (sérum ou cellules) puis quantifient les hydroperoxydes (Gay CA et al, 2003). Cette méthode ne permet pas d'automatisation. En 2004, Arab et Steghens ont proposés une variante sans phase d'extraction des lipides et ne nécessitant que 10µL de plasma (Arab K et al, 2004). Récemment, cette méthode a été appliquée à la détermination des hydroperoxydes de phosphatidylcholine en solution ou dans les membranes. Dans le plasma, chez l'homme, la concentration d'hydroperoxydes exprimée en acide hydroxyoctadécadiénoïque (HODE) est de 207 ± 15 nmol/L. Cet HODE est le produit primaire de la peroxydation lipidique de l'acide linoléique et du cholestérol très abondants dans le plasma. Ces tests ont pour but de donner une image globale du niveau du stress oxydant en mesurant des marqueurs dans le plasma, les urines, mais ne renseignent pas sur l'origine tissulaire du stress oxydant.

Une des méthodes les plus sensibles pour déterminer la concentration des hydroperoxydes lipidiques est la chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP) couplée à la chimiluminescence. Les hydroperoxydes isolés des autres lipides réagissent avec une enzyme contenant du fer produisant des radicaux peroxyles sensibles à la sonde de chimiluminescence et produisant des photons. C'est cette luminescence qui va être quantifiée (Thérond P et al, 1993).

Des travaux ont démontré que la détermination des hydroxydes lipidiques plasmatiques pouvait constituer un nouveau marqueur dans différentes situations pathologiques. Par exemple, une étude montre que les hydroperoxydes de phosphatidylcholine (PCOOH) plasmatiques mesurés par CLHP et chimiluminescence étaient significativement augmentés chez des patients alcooliques et corrélés positivement avec la ɣGT, le cholestérol-HDL, l'alcoolémie et les triglycérides. De plus, une abstinence de six semaines permet une diminution franche de ces concentrations de PCOOH (88,0 ± 10,5 nmol/L chez les alcooliques avant sevrage, 22,8± 3,1 nmol/L après sevrage) (Adachi J et al, 2004).

2.3.2. Aldéhydes, TBARS.

Le 4-hydroxynonénal (4-HNE) est produit lors de la peroxydation lipidique des AGPI ω-6. Il est très réactif vis-à-vis des protéines, et donne des produits d'addition stables avec l'histidine, la lysine et la cystéine ou produits de lipoxydation avancée

(Uchida K et al, 1992). Sa détermination et quantification nécessitent des techniques longues limitant son emploi en biologie clinique.

Le malondialdéhyde (MDA) est produit lors de la peroxydation lipidique de l'acide arachidonique, mais aussi des autres acides gras polyinsaturés. Il peut également être formé à partir de composés non lipidiques tels que l'acide ascorbique, les acides aminés ou le saccharose lorsqu'ils sont exposés à l'action du radical hydroxyle, en présence de métaux par exemple (Janero DR, 1990). Le MDA est également un excellent substrat des peroxydases. La réaction du MDA avec différents constituants du plasma comme les protéines, le glutathion et les acides aminés a fait l'objet de nombreux travaux (Shin BC et al, 1972). Par ses fonctions aldéhyde, le MDA est susceptible de réagir avec les fonctions amine et thiol. Ainsi, la forte réactivité de la fonction aldéhyde vis-à-vis de la fonction amine primaire entraîne la formation d'une base de Schiff (>C=N-), caractérisée par une liaison labile en milieu acide ou alcalin (Nair V et al, 1984). En revanche, la réaction de condensation du MDA avec les groupements-SH est irréversible (Beljean-Leymarie M et al, 1993). L'excès de MDA produit dans un tissu peut se combiner aux groupements aminés libres des protéines (surtout la lysine), conduisant à la formation de produits d'addition susceptibles d'altérer les propriétés biologiques des protéines concernées. En outre, les protéines modifiées par le MDA sont immunogènes et peuvent conduire à la formation d'anticorps dirigés en particulier contre les résidus lysines modifiés par le MDA. Cet effet a été montré chez l'homme, notamment en association avec les maladies cardiovasculaires (Stocker R et al, 2004).

La réaction de dosage du MDA, décrite par Kohn et Liversedge, en 1944, précisée par Patton et Kuntz en 1951, repose sur la formation, en milieu acide et à chaud entre le MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA), d'un pigment absorbant à 532 nm, extractible par les solvants organiques comme le butanol (Figure 26). La réaction colorée, observée avec l'acide thiobarbiturique, mesure non seulement le malondialdéhyde préexistant, mais aussi le malondialdéhyde formé de manière artéfactuelle par décomposition thermique des peroxydes, et de ceux générés au cours même de la réaction. Les méthodes utilisées actuellement dérivent de celle de Yagi (Yagi K, 1976).

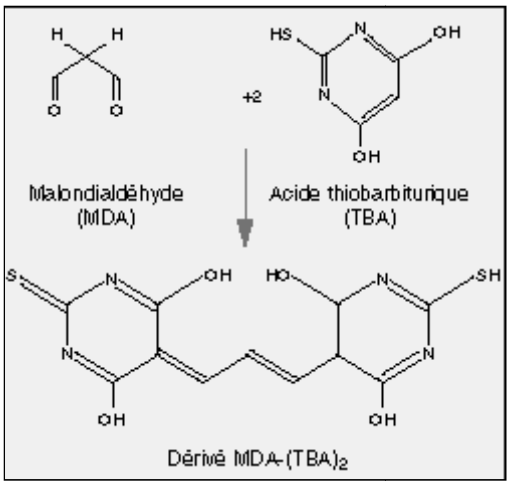


Figure 26 : Réaction du malondialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique

Le résultat du dosage du MDA par l'acide thiobarbiturique est donc la somme du MDA préexistant lié ou non aux molécules biologiques, des peroxydes lipidiques, des produits d'auto-oxydation des acides gras et autres substances qui donnent naissance soit à du MDA, soit à des molécules réagissant avec l'acide thiobarbiturique en milieu acide et à chaud (Gutteridge JMC et al, 1974). C'est pourquoi à la notion initiale de dosage du malondialdéhyde s'est substituée la notion de « substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique » (*thiobarbituric acid reactive substances* ou TBARS). Une des sources de l'hétérogénéité des résultats observés avec les TBARS est liée au nombre important de molécules différentes qui ne relèvent pas forcément du stress oxydant, mais qui réagissent avec l'acide thiobarbiturique. De nombreuses améliorations de cette technique ont vu le jour afin d'accroitre la spécificité, comme l'utilisation du plasma EDTA, un milieu réactionnel à pH < 3, une incubation du surnageant avec l'acide thiobarbiturique d'au moins 30 minutes, avec expression des résultats en équivalent MDA et en fonction des concentrations en lipides du milieu (Del rio D et al, 2005). Les résultats des TBARS sont exprimés le plus souvent en équivalents µmol/L de MDA, elles oscillent entre 0 et 1 µmol/L dans le plasma de sujets sains. Une méthode plus rapide, plus simple et plus sensible a été proposée, basée sur une dérivatisation par l'acide diéthylthiobarbiturique en milieu acide et une détermination par CLHP.

Des concentrations élevées de MDA ont été observées dans le diabète sucré mais aussi dans la pré-éclampsie ou l'asthme (Slatter DA et al, 2000).

2.3.3. Les isoprostanes

Les isoprostanes sont une famille d'eicosanoïdes produits lors de la réaction oxydative des phospholipides par les radicaux libres (Figure 27). Ils apparaissent normalement dans le plasma et les urines et sont augmentés par le stress oxydant. Ceux sont des composés analogues des prostaglandines produits principalement par l'oxydation d'esters de l'acide arachidonique par voie non enzymatique mais tout de même catalysée par les radicaux libres (Tsikas D et al, 2003). Cette réaction non spécifique conduit à de nombreux stéréo-isomères. Parmi les biomarqueurs de stress oxydant, les isoprostanes ont été reconnus comme étant les plus fiables, en particulier les F2-isoprostanes (Milne GL et al, 2007). Ils sont excrétés dans les urines sous forme d'isoprostanes libres, composés relativement stables permettant une mesure plus juste du stress oxydant.

Les isoprostanes F2 sont formés de 5 types d'isoprostanes regroupant chacun 8 régioisomères (Morrow JD et al, 1990). La 8-isoprostaglandine $F_{2\alpha}$ (8-isoPGF$_{2\alpha}$) est l'isomère majoritaire, mesuré dans les urines il est considéré comme le marqueur de référence de la peroxydation lipidique in vivo (Roberts 2nd LJ et al, 2000).

Certains de ces isoprostanes ont une activité biologique physiologique au niveau pulmonaire et rénale.

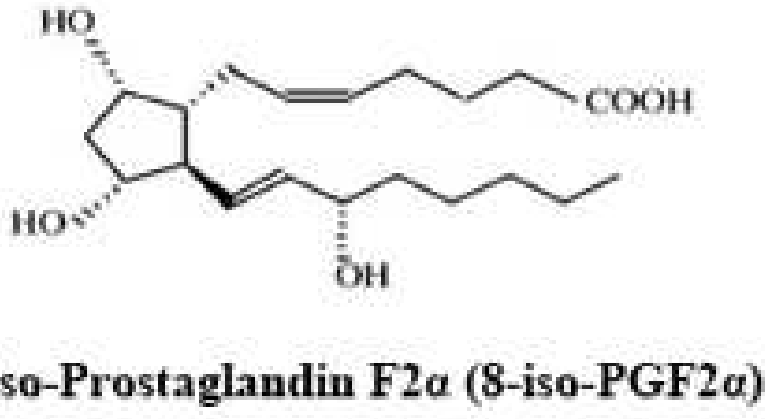


Figure 27 : Structure de la 8-isoPGF$_{2\alpha}$

Le dosage du 8-isoprostane peut être réalisé par des méthodes par chromatographie en phase gazeuse ou liquide couplée à la spectrométrie de masse dans les milieux biologiques. Des méthodes immunologiques (RIA et ELISA) ont été développées, et certains kits ELISA sont commercialisés, notamment la méthode par compétition proposée par Cayman Chemical. La limite de ces méthodes est leur exactitude et

leur précision. Peu de données sont disponibles confrontant les résultats obtenus par spectrométrie de masse avec ceux obtenus par ELISA. De plus la sensibilité et la spécificité varient selon les fabricants.

La concentration de 8-isoPGF$_{2\alpha}$ dans le plasma des sujets sains est de 40-100 pg/mL. Dans l'urine, les valeurs usuelles rapportées à la concentration urinaire de créatinine sont comprises entre 50-100 ng/mmol créatinine. Leur concentration ne présente pas de variations nycthémérales et n'est pas affectée par le contenu alimentaire en lipides (à l'inverse du dosage des TBARS). Elle croit en conditions de stress oxydant. Les isoprostanes constituent actuellement les meilleurs marqueurs de stress oxydant au cours de diverses situations cliniques, telles que l'inflammation aiguë et chronique, le diabète de type 2, l'athérosclérose, la maladie d'Alzheimer, différents types de cancer (Montushi P et al, 2004).

2.4. Les marqueurs biochimiques de l'oxydation des protéines

Les protéines, par leur abondance au sein des systèmes biologiques et du fait de leur rôle fonctionnel majeur au sein de la cellule, constituent, après les marqueurs lipidiques, des cibles majeures des ROS (Davies MJ et al, 1999).

L'un des marqueurs utilisé est constitué par les protéines carbonylées. Le dosage est réalisé par méthodes immunologiques, spectrophotométriques ou de Western blot. La concentration plasmatique des protéines carbonylées a été particulièrement étudiée dans deux pathologies humaines : le syndrome de détresse respiratoire aiguë et les maladies inflammatoires intestinales (Dalle-Donne I et al, 2006).

Un deuxième marqueur utilise est le dosage des produits de glycation avancée ou AGE. Des modifications se produisent suite à la réaction des groupements aminés libres des protéines avec le glucose : c'est le processus de glycation, auquel peut s'associer une oxydation. On parle de glyco-oxydation avec formation d'AGE. Leur concentration peut être déterminée par chromatographie couplée à la fluorescence ou à la spectrophotométrie de masse. Une technique récente basée sur l'autofluorescence de la peau a été proposée afin de suivre plus aisément et de façon non invasive l'accumulation des AGE au niveau de la peau de l'avant-bras (Mulder DJ et al, 2006). Les AGE d'origine cellulaire sont libérés dans le plasma et excrétés dans l'urine. Les concentrations plasmatiques et l'excrétion urinaire des AGE sont aussi accrues chez des patients diabétiques dont la glycémie est mal contrôlée, en relation avec une glycation augmentée des protéines suivies d'une

protéolyse. Du fait du caractère irréversible des modifications des protéines par la carboxyméthyllysine, cet AGE a pu être proposé en tant que marqueur intégratif du stress oxydant ; il constitue un marqueur intéressant de la glycoxydation et est corrélé avec le développement des lésions microvasculaires du diabétique (Tan AL et al, 2007).

2.5. Les marqueurs biochimiques de l'ADN.

Les ROS, en particulier le radical hydroxyle, attaque le squelette désoxyribose-phosphate, en provoquant des liaisons croisées ADN-protéines, et modifie les bases puriques et pyrimidiques.

Le test des comètes est une méthode mesurant les cassures de brins d'ADN dans les cellules eucaryotes. Après extraction de l'ADN cellulaire, celui-ci est inclus dans un gel d'agarose et soumis à une électrophorèse à pH élevé. Cela produit des structures ressemblant à des comètes qui, si l'on utilise les colorants fluorescents appropriés, peuvent être observées par microscopie à fluorescence. En fonction de leur taille les fragments d'ADN migrent de la tête vers la queue de la comète, et l'intensité de la queue de la comète relative à l'intensité totale (tête plus queue) reflète l'ampleur des cassures de l'ADN (Figure 28).

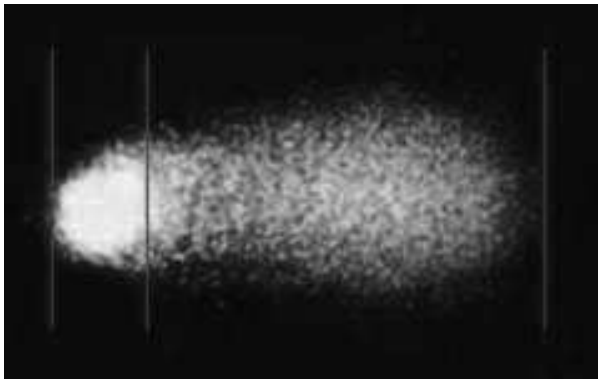


Figure 28 : Essai de comète.

2.6. Les systèmes antioxydants

Halliwell et Gutteridge (Halliwell B et al, 1989) ont défini les antioxydants comme des substances qui sont en mesure, à des concentrations relativement faibles, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et, par conséquent, à retarder de façon significative ou d'inhiber l'oxydation de ces substrats (Figure 28). Cette définition inclut des enzymes : SOD, glutathion peroxydase (GPx), et catalase,

ainsi que des composés non enzymatiques tels que α-tocophérol (vitamine E), β-carotène, l'acide ascorbique (vitamine C), et le glutathion. Les antioxydants d'origine exogènes sont apportés par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riche en vitamines C, E, caroténoïdes, flavonoïdes.

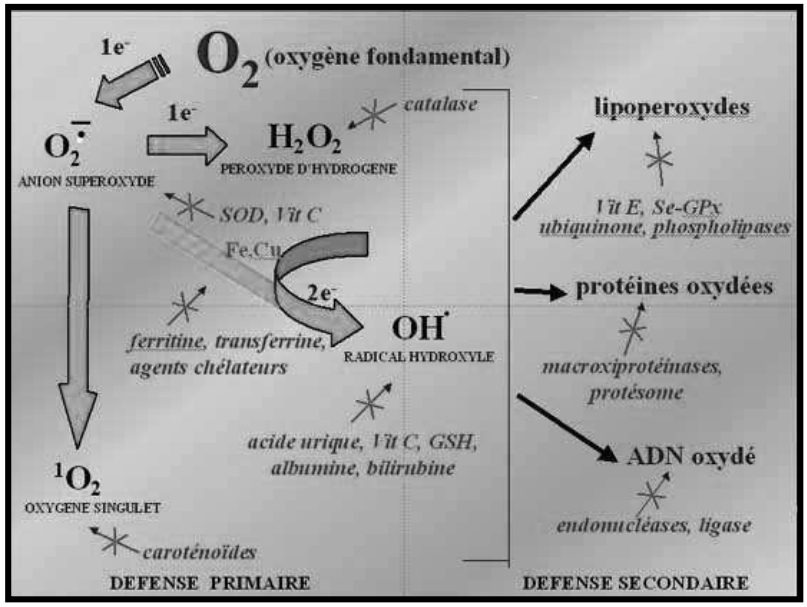


Figure 29 : Aperçu des différentes ROS et des antioxydants régulateurs de leur production

2.6.1. Les enzymes antioxydantes

Les enzymes antioxydantes inactivent les intermédiaires clés de la réduction de l'oxygène en eau (Figure 29). Leur rôle est de diminuer la quantité de ROS présentes dans la cellule.

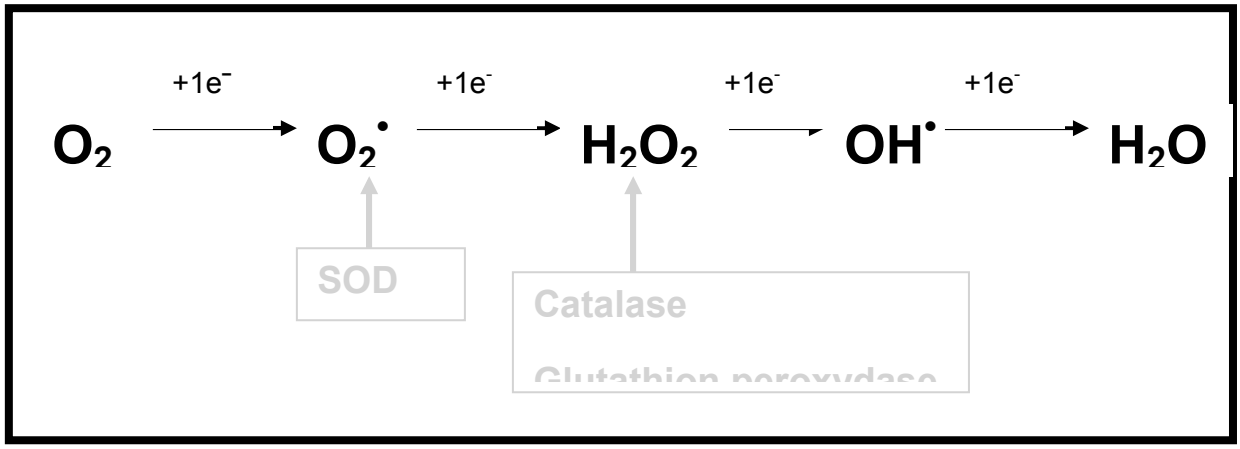


Figure 30 : Réduction de l'oxygène en eau

2.6.1.1 Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases ou SOD sont des métalloprotéines qui catalysent la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et oxygène. Elles représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant et sont sécrétées par les cellules musculaires lisses. Découvertes en 1969 par Mc Cord et Fridovitch, elles sont présentes chez tous les organismes aérobies sauf chez Lactobacillus planturum et les Lactobacillus apparentés. Il existe trois types de SOD selon le cofacteur et leur localisation cellulaire ; La Cu/Zn SOD retrouvée dans le cytosol et le cytoplasme des cellules, la Mn SOD au niveau des mitochondries et la Cu/Zn SOD extracellulaire (Fridovich I, 1995).

Cette enzyme empêche surtout la production d'entités oxydantes beaucoup plus toxiques comme le peroxynitrite (réaction $O_2^{\bullet}$ avec NO) ou l'ion hydroxyle.

Des études animales suggèrent qu'elle a un rôle dans la prévention du vieillissement cellulaire et dans des pathologies inflammatoires telles que l'arthrite (Afonso V et al, 2007).

2.6.1.2. Les glutathion peroxydases

L'ensemble des glutathion peroxydases catalysent la réduction des hydroperoxydes en molécules d'eau ou alcool couplée à l'oxydation d'un substrat comportant une fonction thiol (glutathion). La glutathion peroxydase quant à elle comporte 4 atomes de sélénium. On distingue cinq isoformes : GP_x1 cytoplasmique et mitochondriale, GP_x2 gastrointestinale, GP_x3 plasmatique, GP_x4 à l'interface de la membrane interne du cytoplasme et la GP_x5 épididymaire. Sa concentration dans l'organisme est proportionnelle à celle du glutathion, antioxydant puissant du système immunitaire et protégeant des effets délétères des facteurs extérieurs oxydants.

2.6.1.3. La catalase

La catalase est une enzyme héminique transformant le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes, les érythrocytes, les hépatocytes et les reins. Pour son dosage, une

méthode basée sur un mécanisme en deux temps est utilisée. Dans un premier temps la catalase oxyde un donneur d'hydrogène (en excès par rapport au peroxyde d'hydrogène) comme le méthanol en formaldéhyde puis, dans un second temps, réagit avec le Purpald® pour donner un composé qui absorbe à 550nm (Johanson L et al, 1988). Sa valeur usuelle dans les érythrocytes est de 9 ± 1 U/mg de protéine (par la méthode de Johanson et Borg).

2.6.2. Les systèmes non enzymatiques

Outre les antioxydants non enzymatiques exogènes tel que la vitamine E, vitamine C, caroténoïde, les autres systèmes antioxydants non enzymatiques présents dans l'organisme humain comprennent le glutathion, les protéines à groupements thiols, la bilirubine, les hormones sexuelles, l'acide urique, le coenzyme Q, la mélatonine et l'acide lipoïque. Ces composés peuvent être dosés dans le plasma mais aussi dans les érythrocytes. L'évaluation de ces systèmes antioxydants est considérée comme utile en tant que biomarqueurs pouvant contribuer notamment au choix des stratégies thérapeutiques au cours de pathologies induites par le stress oxydant, en particulier en cancérologie (Ziech O et al, 2010).

2.6.2.1. Le glutathion

- Le glutathion est un tripeptide, formé par l'association d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Il est fabriqué et régénéré par l'organisme à partir d'éléments nutritifs riches en vitamines C (agrumes, kiwis, fruits rouges), vitamine E (germe de blé, huiles végétales, amandes), en zinc (viande, foie, œuf, fromage, fruits à coque) et en sélénium (poissons gras, toutes les noix, foie, riz complet). C'est le thiol intracellulaire le plus abondant, il est présent sous forme essentiellement réduite (GSH). Dans des conditions physiologiques, sa forme oxydée (GSSG) est en concentration très faible Le glutathion détermine le potentiel d'oxydoréduction intracellulaire et détoxifie les ROS nuisibles par la réaction couplée glutathion-peroxydase. Par ailleurs, c'est un coenzyme de la glutathion peroxydase protectrice contre le stress oxydant. Il permet la conversion des ponts disulfures (R-S-S-R) des protéines oxydées en ponts thiols (R-SH), ce qui engendre une accumulation intracellulaire de sa forme oxydée (Deleve LD et al, 1991). De plus il régénère certains antioxydants comme la vitamine C. Le GSH constitue un marqueur du statut redox intracellulaire extrêmement sensible, et sa diminution est précoce lors d'un

stress oxydant. Dans le cytosol, sa concentration se situe entre 2 et 10 mM dans la plupart des types cellulaires. Le rapport GSH/GSSG en condition physiologique est d'environ 100/1 (dans le foie) et se trouve diminué au cours du stress oxydant (Circu ML et al, 2010), induit par le diabète, le cancer, les maladies neurodégénératives et hépatiques (Franco R et al, 2007). L'apport recommandé journalier est de 300 mg (agrumes).

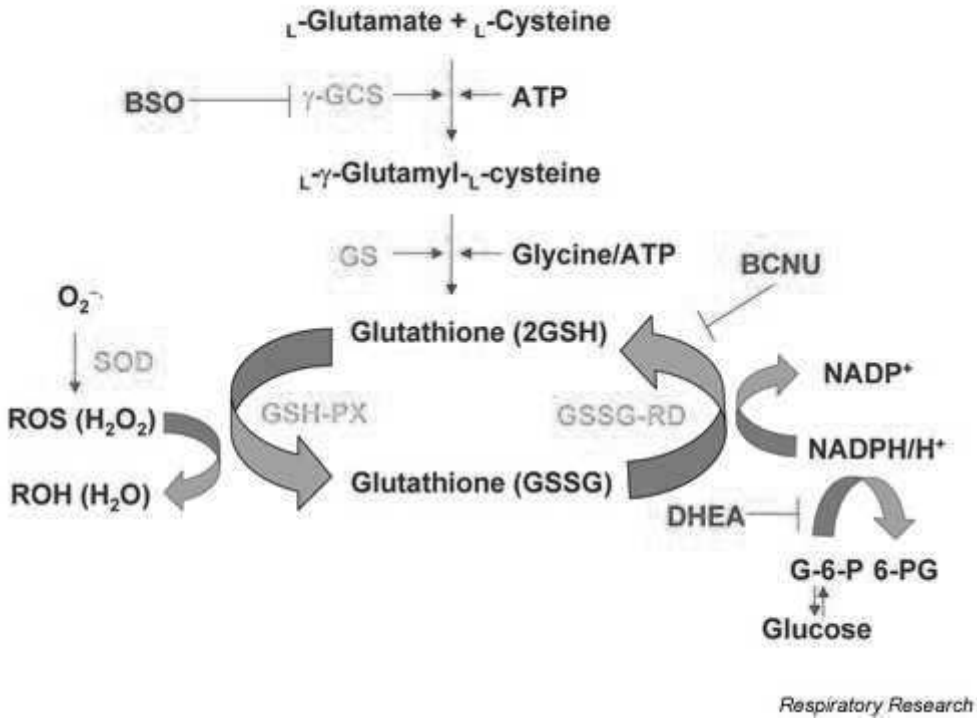


Figure 31 : cycle oxydo-réduction. Toutes les enzymes sont indiquées en vert, des substrats et des produits en bleu, et les inhibiteurs en rouge.

Le schéma du cycle d'oxydo-réduction montre la relation entre les enzymes antioxydantes et le glutathion (Figure 30) (Haddad JJ, 2002). Le glutathion (GSH) est synthétisé à partir des acides aminés sous l'action de γ-glutamylcystéine synthétase (γ-GCS), l'enzyme limitante est la glutamyl-synthase (GS). Cette réaction nécessite de l'énergie sous forme d'ATP. Le glutathion couplé à la peroxydase (GSH-PX), induit la détoxification des ROS tels que le peroxyde d'hydrogène. Une source importante de H_2O_2 est la conversion biochimique de l'anion superoxyde ($O_2^{-\cdot}$) par la superoxyde dismutase (SOD). Au cours de cette réaction, le GSH est oxydé pour générer GSSG, lui-même recyclé en GSH par l'action de la glutathion réductase (GSSG-RD) au détriment de nicotinamide réduit (NADPH / H^+), formant ainsi le cycle d'oxydo-réduction. La principale source de NADPH / H^+ provient de la conversion du glucose en pyruvate au cours de la glycolyse.

2.6.2.2. La vitamine E

Ce terme désigne un ensemble d'isomères, les tocophérols et les tocotriénols (3 doubles liaisons sur leur chaîne latérale). L'isomère principal est l'α-tocophérol, agissant en milieu lipophile sur les radicaux peroxyles pour donner un radical tocophéryle et ainsi empêcher la propagation de la peroxydation lipidique. Les apports journaliers d' α-tocophérol sont de l'ordre de 10mg. La vitamine E uniquement apportée par l'alimentation se retrouve dans les huiles végétales (olive, colza, arachide) mais aussi dans le beurre, les céréales et les légumes verts (Suzuki K et al, 2011).

2.6.2.3. La vitamine C

La vitamine C neutralise les ROS hydrosolubles ($OH^{\cdot}$, $O_2^{-\cdot}$). Elle agit en synergie avec la vitamine E, car elle permet la régénération l'α-tocophérol (Figure 31). Elle est présente essentiellement dans les agrumes, son apport journalier doit être proche de 100mg (Suzuki K et al, 2011).

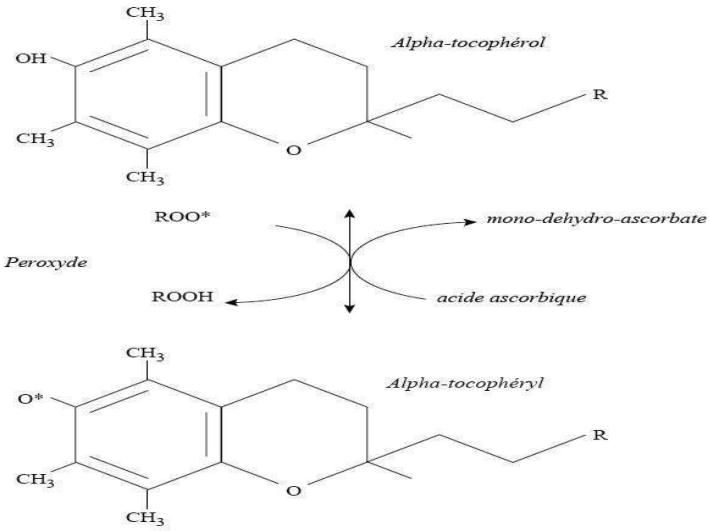


Figure 32 : Réduction d'un radical peroxyde au sein d'un acide gras par l'alpha-tocophérol (vitamine E). L'alpha-tocophéryl ainsi formé est réduit en alpha-tocophérol par oxydation de l'acide ascorbique (vitamine C).

2.6.2.4. Le β-carotène

Il appartient à la grande famille des caroténoïdes. Il est capable de piéger les radicaux hydroxyles et les peroxydes. Il protège ainsi les LDL, dans lesquelles il est transporté. C'est le précurseur de la vitamine A. L'apport journalier recommandé est de 1-5 mg, il est retrouvé dans la carotte, l'abricot, les épinards. Très récemment, une relation inverse entre la concentration circulante de β-carotène et l'incidence de syndrome métabolique a été montrée dans une population japonaise, suggérant que les caroténoïdes pourraient également jouer un rôle dans la prévention du diabète (Suzuki K et al, 2011).

2.6.2.5. Le Coenzyme Q10

Aussi appelé ubiquinone, il joue un rôle essentiel dans la chaîne de transport d'électrons, et est un puissant inhibiteur de la peroxydation lipidique en synergie avec la vitamine E (Suzuki K et al, 2011).

2.6.2.6. L'acide urique

Produit terminal majeur du métabolisme des purines chez l'homme, il est à pH physiologique ionisé sous forme d'urate. Les propriétés antioxydantes de l'urate peuvent être appréciées indirectement par le fait qu'un produit de réaction de l'urate avec les ROS ($OH^{\cdot}$, $ROO^{\cdot}$), l'allantoïne, est présent à des taux élevés lors d'un stress oxydant (Suzuki K et al, 2011).

2.6.2.7. Les polyphénols

Ils constituent une famille importante d'antioxydants présents dans les végétaux. L'alimentation fournit environ 1g de polyphénols par jour principalement par l'apport en fruits et, dans une moindre mesure, en légumes et en céréales. Ils sont présents sous forme d'anthocyanine dans les fruits rouges et le vin rouge, sous forme de flavonoïdes dans les agrumes, l'huile de lin et sous forme d'épicatéchine dans le vin, le thé, le chocolat, les pommes, les oignons et les algues brunes. Globalement, ce sont d'excellents piégeurs des ROS et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre (Suzuki K et al, 2011).

2.6.2.8. Les oligoéléments ; sélénium, cuivre et zinc (Suzuki K et al, 2011)

Le sélénium n'est pas un anti-oxydant en tant que tel, car il ne peut piéger les radicaux libres, mais il joue un rôle primordial comme cofacteur de la GPx. Dans

l'alimentation, on retrouvera essentiellement du sélénium organique, lié à un acide aminé, la cystéine. Le sélénium organique est mieux absorbé, il subit une métabolisation hépatique qui conduit à des intermédiaires nécessaires à la synthèse de dérivés physiologiquement actifs comme la GPx.
La dose journalière recommandée est de 50-70 µg/jour. Les aliments riches en sélénium sont, notamment, les noix, les brocolis, l'ail…

A concentration physiologique, le cuivre est le cofacteur d'enzymes notamment la SOD. Cependant, en tant que métal de transition, il joue un rôle important dans le déclenchement de réactions de production de ROS (réactions de Fenton) et peut lorsque sa concentration est élevée devenir pro-oxydant. Les apports journaliers recommandés sont de l'ordre de 2,5 mg. Il est présent dans le son, l'avoine, le seigle, le foie de veau.

Le zinc joue un rôle de cofacteur pour de nombreux enzymes et intervient dans le métabolisme des nucléotides, la synthèse des prostaglandines, le fonctionnement de l'anhydrase carbonique. Comme le cuivre, le zinc est un des cofacteurs essentiels de la SOD. Il protège également les groupements thiols des protéines et il peut inhiber les réactions de formation de ROS induites par des métaux de transition comme le fer ou le cuivre. Le rapport Cu / Zn, (normalement inférieur à 1,5) sera un excellent indicateur de l'état de stress oxydant d'un individu. Les aliments les plus riches en zinc sont les viandes et les poissons, les céréales complètes et les légumes secs; les apports journaliers recommandés sont de l'ordre de 20 mg.

Tableau 5 : Récapitulatif des antioxydants

	Antioxydants endogènes	Antioxydants exogènes
Enzymes	Superoxyde dismutase Catalase Glutathion peroxydase Hème oxygénase	
Protéines	Albumine Ferritine Ceruléoplasmine	
Molécules	Glutathion Acide urique	Vitamines A, C, E Caroténoïdes

	Glucose Bilirubine	Flavonoïdes
Oligoéléments		Cuivre Zinc Sélénium

Un système de défense secondaire composé d'enzymes vient compléter les moyens de protection contre les ROS (Figure 32). Il a pour but de limiter l'accumulation de protéines ou d'ADN oxydés et de dégrader les fragments toxiques.

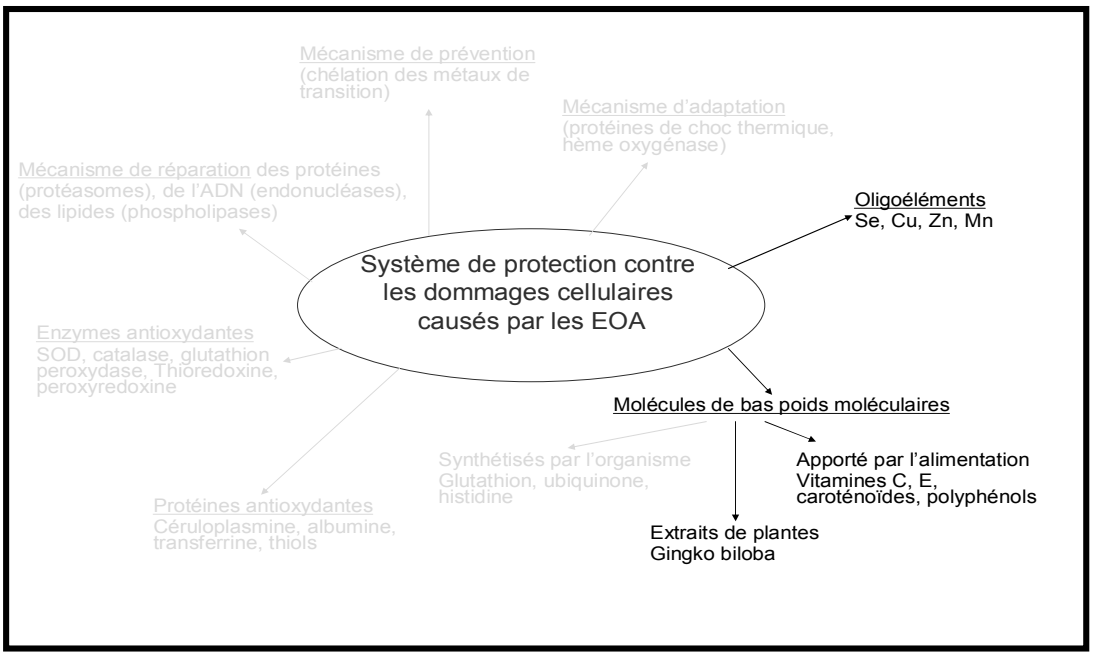


Figure 33 : Mécanismes de protection contre les ROS

Comme nous l'avons vu précédemment l'équilibre oxydants-antioxydants est fragile. Les antioxydants exogènes sont apportés par l'alimentation, il est donc nécessaire et important d'avoir une alimentation équilibrée. Le cuivre et le zinc servent de cofacteur aux enzymes antioxydantes. De plus les vitamines A, C, E ne sont apportées que par l'alimentation et leur rôle antioxydant est très important.

L'apport journalier recommandé pour ces vitamines peut être couvert par une prise quotidienne de 5 fruits et légumes par jour. Cette situation est loin d'être observée en réalité.

Le statut de stress oxydant de chaque personne ne peut pas être évalué par une seule méthode. Ce que l'on va étudier c'est le profil antioxydant de la personne, en évaluant les concentrations des enzymes, protéines, oligo-éléments antioxydants.

2.7 Relation entre le diabète de type 2 et le stress oxydant

Le diabète de type 2 est une maladie très hétérogène à l'origine de laquelle différents mécanismes physiopathologiques sont impliqués. Si un petit nombre d'auteurs suggèrent que le défaut génétique primaire se situe au niveau de la sécrétion d'insuline, la majorité d'entre eux pense que le diabète de type 2 débute par une résistance à l'action de l'insuline, que celle-ci soit d'origine génétique, acquise, ou mixte. Lorsque le fonctionnement du pancréas est normal, la sécrétion d'insuline augmente, de façon à compenser l'insulino-résistance et à maintenir la glycémie dans les limites de la normale. Par conséquent, la traduction la plus simple de l'insulino-résistance, avant le développement d'un diabète, est la présence d'un hyperinsulinisme. Le passage à l'état de diabète à proprement parler requiert que des anomalies pancréatiques soient associées à l'insulino-résistance, de telle sorte que l'hyperinsulinisme ne sera pas suffisant pour la compenser et maintenir la glycémie dans les limites de la normale. Le diabète se caractérise donc par une diminution de la fonction des cellules bêta pancréatiques et de l'hyperinsulinisme, par une augmentation de la production hépatique de glucose (PHG) et par une majoration de l'insulino-résistance. La part de l'acquis et des gènes dans la séquence d'apparition de ces phénomènes n'est toujours pas clairement établie (Avignon A et al, 1999). Deux mécanismes principaux liés au diabète sont susceptibles d'intervenir comme facteurs aggravant les 3 mécanismes physiopathologiques suscités et responsables de stress oxydant : la lipotoxicité et surtout la glucotoxicité.

Comme nous l'avons vu précédemment chez les patients diabétiques, le métabolisme lipidique est fortement perturbé. Le dysfonctionnement du métabolisme des acides gras est un facteur déterminant menant à l'insulinorésistance et, chez les sujets prédisposés, au diabète de type 2. Plusieurs anomalies lipidiques peuvent être relevées (Girard J, 2003).

2.7.1 La lipotoxicité

Les anomalies de l'action de l'insuline sur les tissus cibles se traduisent par une diminution du captage de glucose par les muscles et par une augmentation de la production hépatique de glucose responsables d'une production de ROS. Elles sont liées à des défauts multiples dans les mécanismes de signalisation par le récepteur de l'insuline et dans des étapes régulatrices du métabolisme du glucose (transport,

enzymes clés de la synthèse de glycogène ou de l'oxydation mitochondriale du glucose). Ces défauts «post-récepteurs» sont amplifiés par la présence d'une concentration augmentée d'acides gras libres. Les concentrations élevées d'acides gras libres (AGL) plasmatiques contribuent à la diminution de l'utilisation musculaire de glucose (principalement par l'atténuation de la transmission du signal insulinique) et à l'augmentation de la production hépatique (stimulation de la néoglucogenèse par l'apport de co-facteurs tels que l'acétyl-CoA, l'ATP et le NADH). L'exposition chronique à des concentrations élevées d'acides gras entraîne une accumulation d'acyl-CoA dans les cellules β du pancréas qui se traduit par la disparition de 50% de ces cellules par apoptose (phénomène de lipotoxicité).

Il y a une quarantaine d'année, Randle et son équipe ont démontré, à partir d'une expérience réalisée in vitro sur le cœur de rat isolé et perfusé, l'existence d'un cycle « glucose-acides gras » (Figure 33) (Randle P et al, 1963). Une augmentation des AGL dans le milieu de perfusion conduisait à une réduction du captage et de l'utilisation du glucose par le myocarde. Ils avaient ensuite généralisé ces observations au muscle squelettique, et suggéré qu'un excès d'AGL pourrait in vivo contribuer à la diminution de l'utilisation du glucose et au développement du DT2.

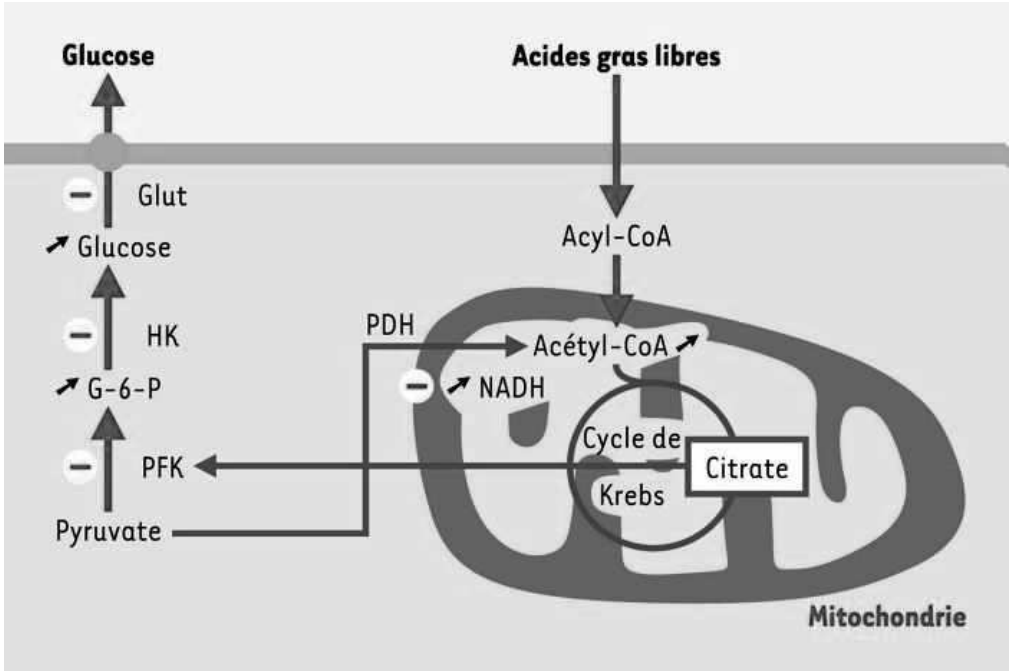


Figure 34 : Cycle « glucose-acides gras » de Randle. L'accumulation de citrate, en inhibant la phosphofructokinase, entraînerait une augmentation de fructose-6-phosphate et de glucose-6-phosphate (G-6-P). Cette accumulation deglucose-6-phosphate inhiberait l'hexokinase, conduisant à l'augmentation du glucose intracellulaire et à l'inhibition du transport de glucose (le transport deglucose des muscles est un transport «facilité», dans le sens du gradient de concentration). Glut: transporteur de glucose; HK: hexokinase; PKF: phosphofructo-kinase; PDH: pyruvate déshydrogénase.

Ces dernières années, il est apparu, d'une part, que les mécanismes biochimiques initialement proposés pour expliquer le rôle des AGL dans le cycle « glucose-acides gras » étaient en partie erronés et, d'autre part, que les AGL n'étaient pas seulement des carburants énergétiques de la cellule, mais servaient également de molécules de signalisation. Une nouvelle proposition a été faite pour expliquer le cycle de Randle, qui suggère que l'excès d'acides gras libres perturbe les mécanismes de la transmission du signal insulinique (Shulman GI, 2000). Selon cette hypothèse, l'augmentation des AGL dans le muscle conduirait à l'accumulation de certains de leurs métabolites, tels que l'acyl-CoA et le diacylglycérol. Ceux-ci activent la protéine kinase C, une sérine/thréonine kinase, qui phosphoryle le substrat majeur du récepteur de l'insuline (IRS) sur des résidus sérine-thréonine, et inhibe ainsi sa capacité de recrutement et d'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 kinase) (Dresner A et al, 1999). La voie de transduction du signal insulinique est donc diminuée, ce qui conduit à une réduction du transport de glucose. Le même type de mécanisme existe dans le foie, qui conduit à une inhibition de la glycolyse; la résistance à l'insuline entraîne en effet une inactivation (phosphorylation) des enzymes clés (phosphofructo-2 kinase et pyruvate kinase) de la glycolyse, avec pour corollaire une activation de la néoglucogenèse. Cette hypothèse a été étayée par des études récentes réalisées chez des souris dépourvues de tissu adipeux. Celles-ci sont très insulinorésistantes en raison d'un défaut de signalisation insulinique dans les muscles et dans le foie, et présentent une accumulation de triglycérides dans ces tissus (Kim JK et al, 2000). La transplantation d'un tissu adipeux chez ces souris corrige toutes ces anomalies, ce qui suggère que l'insulinorésistance observée dans le diabète de type 2, mais aussi dans l'obésité a pour origine une altération de la répartition des AGL entre les adipocytes, le foie et les muscles.

Les acides gras sont des substrats énergétiques majeurs de la cellule β des îlots de Langerhans. Même s'ils ont un faible effet insulinosécréteur, ils contribuent surtout au métabolisme oxydant des cellules β (Malaisse WJ et al, 1985). Ils engendrent donc du stress oxydant. Des études récentes ont montrés une dualité des acides gras sur la cellule β ; l'exposition à court terme (quelques heures) aux acides gras libres potentialise la sécrétion d'insuline en réponse au glucose alors qu'une exposition prolongée (plusieurs jours) l'inhibe (Mason TM et al, 1999). Une étude menée sur le développement du diabète chez le rat ZDF (Zucker Diabetic Fatty)

montre de nombreuses analogies avec le diabète humain (Unger RH, 1997). Les rats deviennent obèses en raison d'une mutation génique et à l'état homozygote présentent progressivement une insulinorésistance, une intolérance au glucose et deviennent en 8-10 semaines diabétiques. On observe une inhibition de l'insulinosécrétion en réponse au glucose dû à l'accumulation de triglycérides dans les îlots de Langerhans et à la lipotoxicité. L'expression et l'activité de la lipogenèse sont stimulées alors que celle de l'oxydation des acides gras sont diminuées. La lipotoxicité des îlots de Langerhans va conduire :

- à l'inhibition des mécanismes de la transmission du signal insulinique dans les muscles. L'accumulation de métabolites dérivés de ces acides gras libres (acyl-CoA et diacylglycérol) conduit à une activation de la protéine kinase C qui, en phosphorylant un résidu sérine du substrat majeur du récepteur de l'insuline (IRS), entraîne une diminution du recrutement de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 kinase) et donc une réduction du transport de glucose (Figure 34).

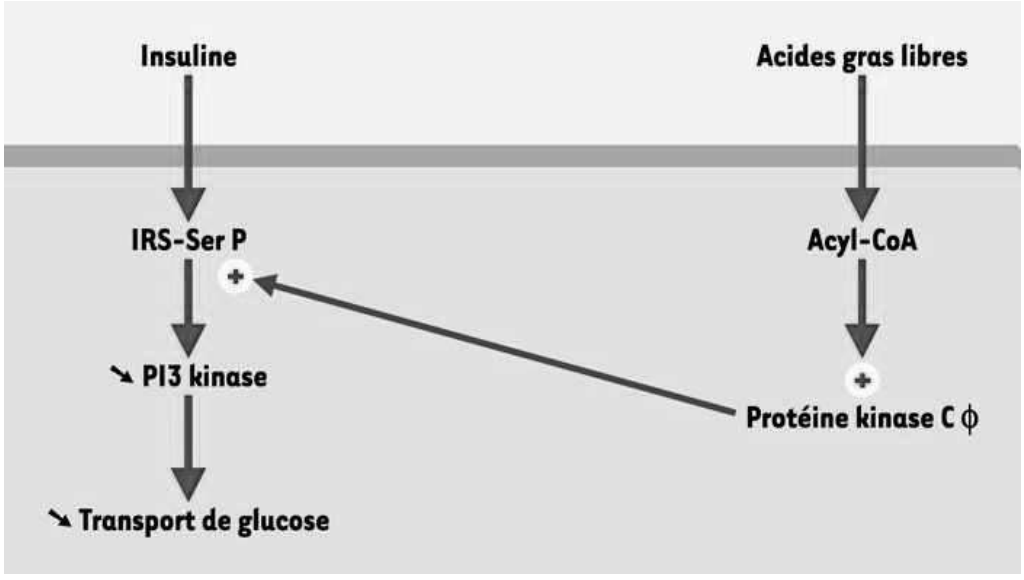


Figure 35 : La reformulation des mécanismes biochimiques à l'origine du cycle « glucose-acides gras » dans les années 2000.

- à une diminution de l'expression du récepteur GLUT2

- à une diminution de la sécrétion d'insuline car les Acyl-CoA stimulent le canal K^+, bloquent sa fermeture et induisent la perte de sensibilité de la cellule β au glucose. Il y a aussi une diminution du la synthèse d'ATP et une production d'H_2O_2.

- à une synthèse accrue de céramides. Les céramides activent les iNOS et induisent une surproduction de monoxyde d'azote NO. Le NO déclenche l'apoptose prématurée des cellules β et induit une production importante de ROS (Figure 35) (Girard J, 1995).

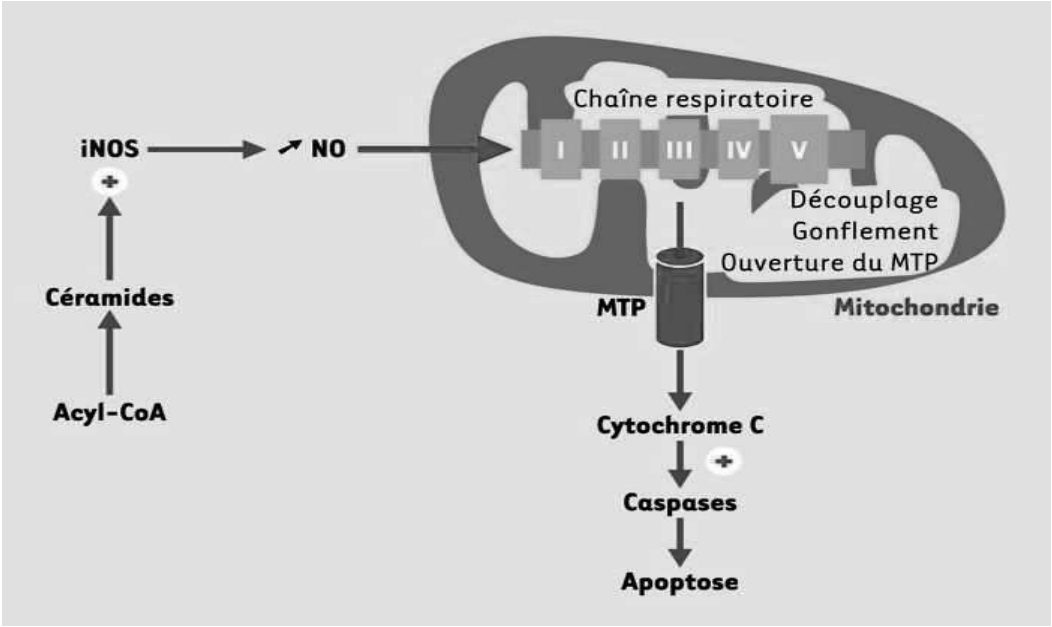


Figure 36 : Mécanismes biochimiques impliqués dans la lipotoxicité.

2.7.2 La glucotoxicité

Lorsque les îlots de Langerhans sont exposés de manière chronique à des concentrations élevées de glucose, un phénomène de glucotoxicité a également été décrit. La part relative de la glucotoxicité et de la lipotoxicité dans la perte des cellules β n'a pas été établie, mais il est clair que ces deux mécanismes doivent être impliqués chez les diabétiques de type 2 exposés de façon chronique à des concentrations élevées de glucose et d'acides gras (Poitout V et al, 2002).

La relation entre concentrations élevées en glucose et stress oxydant a pu être mise en évidence sur des cellules en culture. Ainsi, l'incubation de cellules endothéliales d'aorte d'origine bovine en présence de 30mM de glucose se traduit par une production intra-cellulaire accrue de ROS et par une augmentation de la concentration intracellulaire des TBARS ; Au cours de cette expérience, il est de plus montré que la production accrue de ROS favorise la formation de produits terminaux de glycation avancée (AGE : Advanced Glycation End Products) au niveau des protéines cytosoliques. L'addition d'antioxydants, comme l'α-tocophérol, inhibe à la fois la production de ROS et la formation d'AGE (Giardino I et al, 1996). Une autre étude, réalisée sur des cellules endothéliales d'origine humaine, montre que des concentrations élevées en glucose augmentent les activités des enzymes antioxydantes (SOD à Cu, ZN, catalase) ainsi que l'expression des ARNm de ces enzymes. La surexpression cellulaire de ces enzymes antioxydantes constitue une

réponse au stress oxydant consécutif à des taux de glucose élevés (Ceriello A et al, 1996). Plusieurs mécanismes semblent impliqués dans le développement d'un stress oxydant chez les diabétiques : l'auto-oxydation du glucose, la glycation des protéines et la voie des polyols.

2.7.2.1. L'auto-oxydation du glucose

En présence de fer, le glucose s'oxyde, entraînant la génération d'anions superoxydes, mais aussi la production de la forme aldéhyde du glucose, le glyoxal. Cette molécule se fixe rapidement sur les protéines dans lesquelles apparaît un résidu carboxyméthyllysine. Ce groupement capte facilement le cuivre, ce qui provoque le déclenchement de réactions de type Fenton avec production des radicaux hydroxyles : il s'ensuit une augmentation de la peroxydation lipidique (Hunt JV et al, 1988). Ce mécanisme pourrait expliquer pourquoi le diabète est souvent associé à des complications cardio-vasculaires.

2.7.2.2. La glycation des protéines

L'hyperglycémie chronique entraîne une glycation (ou glycosylation non enzymatique) des protéines aboutissant à la formation d'AGE qui caractérisent le vieillissement.

La glycation des protéines, ou réaction de Maillard, lie le groupement carbonyl d'un sucre réducteur et le groupement aminé d'une protéine, donnant naissance à une protéine glyquée en quantité proportionnelle à la quantité de sucre en présence. Au bout de quelques semaines, un état d'équilibre se crée entre la protéine glyquée et le glucose.

Ce processus se déroule selon trois étapes (Figure 36) :

-Formation d'une base de Schiff instable par combinaison de la fonction aldéhyde du glucose avec les groupements amines libres des protéines, principalement la lysine et la fonction amine N-terminale.

-Réarrangement d'Amadori, réarrangement moléculaire conduisant à la formation d'une liaison cétoamine stable. Ces deux étapes aboutissent aux produits de glycation dits produits d'Amadori et caractérisent les protéines de demi-vie brèves ou intermédiaires. L'HbA_{1c} et les fructosamines sont des exemples caractéristiques de produits d'Amadori évalués en biologie clinique au cours du suivi des patients diabétiques (Gillery P et al, 1998). La formation de ces composés est réversible

(Brownlee M et al, 1984). Les produits d'Amadori ne constituent pas forcément un état définitif.

-Accumulation lente et irréversible d'AGE par des réactions d'oxydation. Les traits biochimiques principaux sont leur pigmentation brune, leur fluorescence. Ils sont fortement mutagènes et ne peuvent pas être détruits. Ils s'accumulent dans la cellule. La glycation modifie la structure des protéines (formation de liaisons croisées, modifications d'antigénicité), mais également leurs fonctions (activité enzymatique ou biologique), et leurs rapports avec les cellules, en premier lieu avec les cellules inflammatoires (Monnier VM, 1989). Les protéines glyquées interviennent dans des phénomènes aussi divers que l'inflammation, le remodelage tissulaire, l'apoptose ou encore l'angiogenèse. On sait que l'apparition des complications à long terme du diabète est corrélée à la qualité de l'équilibre glycémique, donc à l'intensité de la glycation.

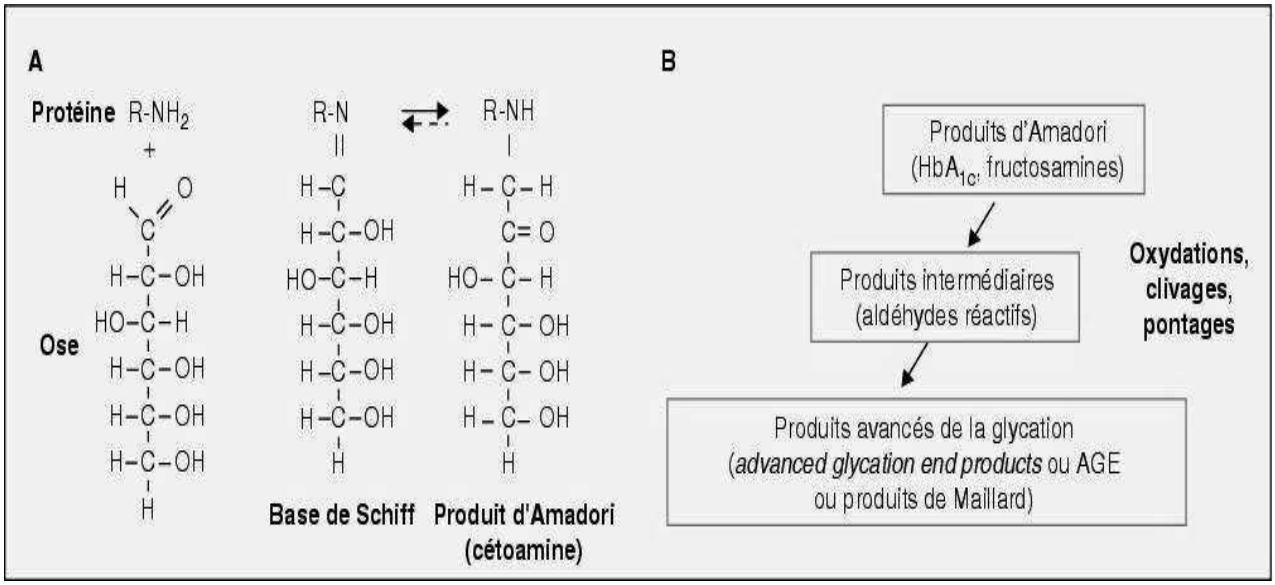


Figure 37 : La glycation des protéines

Cette glycation concerne les protéines comme l'albumine, les immunoglobulines, le collagène, les LDL.

Les AGE interagissent avec des récepteurs tissulaires ubiquitaires (notamment macrophages, lymphocytes, cellules endothéliales, mésangiales). En se polymérisant, les AGE exercent un effet toxique sur les protéines de la matrice cellulaire, les interactions matrice-cellule, les molécules intracellulaires. Les anomalies structurales et fonctionnelles des protéines conduisent à:

- un épaississement de la membrane basale, une perte de l'élasticité des parois vasculaires et du collagène, une hypertrophie du mésangium.
- une augmentation de la perméabilité vasculaire. Les AGE plasmatiques peuvent se lier à des récepteurs (RAGE : Receptor of advanced Glycation End Products) présents sur les cellules endothéliales, glomérulaires et les macrophages. L'activation de ces récepteurs déclenche une production de ROS et active le facteur de transcription NF-κB (Nuclear Factor kappa-B), modifiant la transcription génique. La liaison des AGE aux RAGE endothéliaux semble, en partie, responsable de l'hyperperméabilité capillaire observée au cours du diabète, via la production de $NO^{\cdot}$ (Hudson BI et al, 2005).

Néanmoins la glycation des protéines n'est pas seule en cause: il existe une augmentation des AGE lors du vieillissement et de l'insuffisance rénale non diabétique.

La formation des AGE est source de ROS (Kennedy AL et al, 1997). Au niveau des macrophages, des cellules endothéliales, des fibres musculaires et des fibroblastes, les AGE se fixent sur des récepteurs spécifiques RAGE. In vivo cette liaison provoque la formation de radicaux libres par activation de la NADPH oxydase comme l'a démontré Thallas-Bonke et al (Thallas-Bonke Vet al, 2008).

2.7.2.3. La voie des polyols

Lorsque la glycémie est normale, le glucose est métabolisé par la voie de la glycolyse. Le glucose est transformé en pyruvate grâce notamment à l'hexokinase (glucose en glucose-6-phosphate) et permet la production d'ATP, de pyruvate qui va entrer dans le cycle de Krebs pour produire de l'énergie.

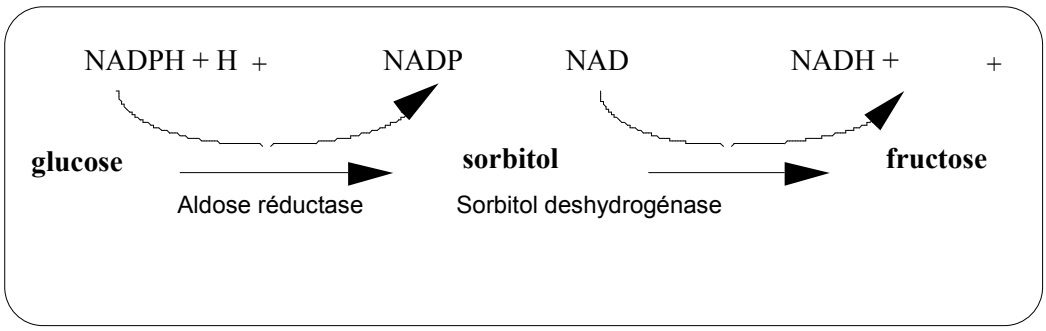


Figure 38 : voie des polyols

En cas d'hyperglycémie, cette voie secondaire est activée (Figure 37). L'aldose réductase enzyme clé de cette voie, a peu d'affinité pour le glucose mais dans les cellules insulino-indépendantes (cellules rénales, rétiniennes et nerveuses) et quand ce dernier est en concentration élevé, l'enzyme métabolise le glucose en sorbitol (King GL et al, 1996). Le sorbitol s'accumule dans la cellule et modifie l'osmolarité des cellules. Cette réaction nécessite le NADPH comme cofacteur qui sera donc moins disponible pour les enzymes antioxydantes comme la glutathion-réductase, l'ascorbate réductase. De plus le NAD+ lui aussi utilisé pour transformer le sorbitol en fructose n'est plus disponible pour la synthèse de $NO^{\cdot}$, rôle important dans le métabolisme vasculaire (Duron F et al, 2005).
La production accrue de fructose par cette voie stimule la formation des AGE grâce au plus grand pouvoir réducteur du fructose par rapport au glucose (Suarez G et al, 1988).

L'activation de cette voie des polyols (hyperosmolarité intracellulaire, pouvoir réducteur du fructose, baisse des cofacteurs NADPH et NAD+, baisse du glutathion réduit) peut donc avoir des effets délétères sur les cellules qui sont plus exposées au stress oxydant (Brownlee M, 2001).

L'hyperglycémie chronique s'accompagne d'anomalies de la fonction endothéliale, des fonctions plaquettaires et d'une majoration du stress oxydant, intervenant dans l'ensemble des complications chroniques micro et macrovasculaires.

2.7.3. Comment mettre en évidence un état de stress oxydant chez le patient diabétique ?

Chaque individu ne possède pas le même potentiel antioxydant en fonction de son mode de vie, de ces caractéristiques génétiques ou de l'environnement dans lequel il vit. Déterminer le statut de stress oxydant d'un individu devient actuellement un sujet de priorité en terme de prévention des maladies car de nombreuses études indiquent qu'il existe une association étroite entre l'altération des systèmes de défense antioxydants et le développement de plus de 200 pathophysiologies comme l'athérosclérose, les maladies inflammatoires, le diabète, le cancer (Gutteridge JMC, 1992, Pincemail J et al, 1999).

Une seule méthode ne peut à elle seule rendre compte du statut de stress oxydant. Il importe donc d'avoir à sa disposition un panel de tests adéquats afin d'évaluer exactement la situation.

Les marqueurs principaux utilisés pour évaluer un stress oxydant chez les diabétiques sont :

- les marqueurs de la peroxydation lipidique. Le dosage des TBARS plasmatiques, facile à mettre en œuvre, est très utilisé mais peu spécifique. Le dosage des isoprostanes, beaucoup plus spécifique sera préféré. Ces marqueurs sont stables *in vivo* et *in vitro (*Tsimikas S, 2006) ; ils peuvent être dosés à des concentrations picomolaires (GC/MS), mais il faut une extraction et un appareillage spécifiques; ils ne sont pas affectés par l'alimentation Par ailleurs, leur formation *in vivo* est corrélée à l'importance du stress.
- les systèmes de défenses anti-oxydants.
- l'oxydation de l'ADN.
- Le pouvoir antioxydant total du plasma. Le plasma contient un grand nombre de substances douées d'un pouvoir anti-oxydant ; elles sont d'ailleurs présentes à des concentrations extrêmement variables. On peut les classer en trois catégories : tout d'abord les chélateurs de métaux comme la transferrine et la céruloplasmine qui s'opposent à la phase d'initiation de la production de radicaux libres oxygénés ; puis les capteurs de radicaux libres qui agissent sur la phase de propagation de la peroxydation lipidique ; il s'agit des vitamines E et C, du glutathion réduit, de l'acide urique, de la bilirubine et de certaines protéines comme l'albumine ; enfin les enzymes anti-oxydantes comme la superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase. Toutefois, leur activité dans le plasma est faible et leur importance à ce niveau est toute relative.

Des méthodes ont été développées pour mesurer le pouvoir anti-oxydant total du plasma ou *total peroxyl radical trapping antioxidant parameter*. Elles sont faciles à mettre en œuvre et sont commercialisées (*total antioxidant status*, Laboratoire Randox). Leur principe est basé sur la propriété que possède le plasma de diminuer l'absorbance à 660 nm d'un radical cationique produit par l'action d'une peroxydase sur le 2,2' azino-di-(3-éthylbenzothiazolidine sulfonate) en présence de peroxyde d'hydrogène (Brasseur L et al, 1995). La plupart des études, effectuées soit chez des diabétiques de type 1, soit chez des diabétiques de type 2, mettent en évidence une diminution significative du pouvoir antioxydant total du

plasma (Cerellio A et al, 1997). Il est intéressant de souligner que, lors d'une épreuve d'hyperglycémie par voie orale, Cerellio *et al.* ont observé, chez les patients diabétiques de type 1 et chez les sujets normoglycémiques, une diminution du pouvoir anti-oxydant total du plasma au cours de l'épreuve. Pour ces auteurs, l'hyperglycémie, y compris sous forme aiguë, induit un stress oxydant (Cerellio A et al, 1998).

3. Etude clinique pilote

L'étude du stress oxydant au cours du diabète de type 2 a fait l'objet de nombreux travaux chez l'animal mais peu de données sont disponibles chez l'homme. Or, le stress oxydant est un déterminant majeur de l'installation du diabète de type 2. L'excès des ROS est à l'origine de la perturbation du métabolisme énergétique musculaire et ce phénomène est réversible après supplémentation en antioxydants.

En effet les travaux de Bonnard, Rieusset et al. ont montré sur des modèles de souris rendues diabétiques que des dysfonctionnement mitochondriaux semblent être la conséquence d'un stress oxydant musculaire associé à l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie (Bonnard C et al, 2008). Les chercheurs ont dans un premier temps montré que les altérations mitochondriales n'étaient pas un évènement précoce dans la survenue d'un diabète de type 2 puisqu'une diète de 4 semaines riche en lipides et en sucrose, suffisante pour induire une intolérance au glucose, ne produisait aucune altération mitochondriale dans le muscle squelettique des souris. Par contre, après 16 semaines de ce régime, les souris rendues diabétiques présentaient bien une altération de la biogénèse, de la structure et des fonctions mitochondriales. L'équipe a de plus observé l'augmentation de la production des ROS dans le muscle des souris diabétiques. Afin de confirmer l'implication des ROS dans les altérations mitochondriales en situation de diabète, les auteurs ont utilisé un autre modèle murin, la souris traitée à la streptozocine, qui présente un fort stress oxydant associé à une hyperglycémie, mais pas d'obésité ni d'insulinorésistance. Dans ce modèle, la production des ROS musculaire était également associée à des altérations mitochondriales, ces dernières pouvant être prévenues soit par un traitement à l'insuline, soit par un traitement antioxydant. Ces données confirment l'absence de relation directe entre altérations mitochondriales et insulinorésistance, et démontrent l'implication des ROS dans les altérations mitochondriales (Bonnard C et al, 2008).
Enfin, l'induction in vitro de ROS par le glucose ou des lipides altère la densité et les fonctions mitochondriales dans des cellules musculaires en culture, et ces effets sont restaurés par un traitement antioxydant (Bonnard C et al, 2008).

L'ensemble de ces données suggère donc que les altérations mitochondriales sont la conséquence d'un stress oxydant musculaire associé à l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie des souris diabétiques.
Une autre étude, réalisée sur des cellules endothéliales d'origine humaine, montre que des concentrations élevées en glucose augmentent les activités des enzymes anti-oxydantes (SOD à Cu, Zn, catalase) ainsi que l'expression des ARNm de ces enzymes. Selon les auteurs de cette étude, la surexpression cellulaire de ces enzymes anti-oxydantes constitue une réponse au stress oxydant consécutif à une glycémie élevée (Ceriello A, et al, 1996).
L'objectif de ce travail est de rechercher une relation directe entre hyperglycémie et stress oxydant chez des patients diabétiques de type 2 ainsi qu'une baisse de ce stress par la prise en charge du diabète à l'hôpital.
L'évaluation du stress oxydant est réalisée par le dosage urinaire du 8-Isoprostane.

3.1. Matériels et méthodes

3.1.1. Patients

Cette étude a été réalisée chez 26 patients diabétiques de type 2 hospitalisés au CHU de Rouen en service diabétologie. Cette population était constituée de 9 femmes âgées de 46 à 78 ans et de 17 hommes âgés de 49 à 79 ans. Pour être inclus dans l'étude, les patients devaient présenter un diabète décompensé : hyperglycémies répétées et/ou supérieures à 2g/L, une hémoglobine glyquée élevée (7,7-13,4%, moyenne : 10,6%). L'hospitalisation devait durer au minimum 5 jours consécutifs. Lors de l'hospitalisation, les patients ont bénéficié d'un ajustement de leur traitement antidiabétique ainsi que la mise en place de règles hygiéno-diététiques. Dans cette étude, nous avons exclus les patients ayant des complications cardiaques, infectieuses, oculaires récentes, les patients ayant un syndrome inflammatoire sévère, les patients non diabétiques de type 2.
L'étude a été effectuée après que chaque patient ait donné par écrit son consentement éclairé, en accord avec les directives européennes qui n'exigent pas d'autorisation d'un comité d'éthique pour le type de plan expérimental utilisé ici (Annexe 1 : formulaire de non opposition aux recueils des échantillons urinaires). De plus pendant leur hospitalisation, une fiche de renseignements (Annexe 2) a été complétée, celle-ci regroupe les principales données biologiques et cliniques nécessaires pour l'étude.

3.1.2. Méthodes

Les glycémies à jeun et post-prandiales ont été mesurées à l'aide d'un lecteur de glycémie portatif par la méthode de la glucokinase. La glycémie postprandiale était effectuée 1h30 après le repas.

Un prélèvement de sang sur tube EDTA est réalisé pour les dosages suivants : HbA_{1c}, cholestérol, cholestérol HDL, triglycérides, CRP et formule sanguine. Une pesée et un calcul de l'IMC ont aussi été faits à l'entrée et à la sortie des patients. L'analyse de l'HbA_{1c} est réalisée par chromatographie liquide haute performance. Le dosage du cholestérol total se fait par la méthode de la cholestérol oxydase de même que le dosage du cholestérol HDL et des triglycérides qui s'effectue aussi par méthode enzymatique (COBAS, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (Allemagne)).

Deux échantillons urinaires ont été recueillis, le premier à J0 et le second le jour de la sortie, puis conservés à -80℃ en présen ce d'un antioxydant (BHT) jusqu'à la réalisation des dosages des 8-iso $PGF_{2\alpha}$ et des créatinines urinaires. La créatinine urinaire est évaluée par méthode cinétique de Jaffé. La concentration en CRP est déterminée par immunodosage (BNII, Beckman Coulter, Lasadena, USA). La clairance à la créatinine est calculée par la formule MDRD. Les pressions artérielles diastoliques et systoliques sont mesurées au bras droit après 5 minutes de repos en position de décubitus dorsal. Le calcul de l'IMC se fait à partir du poids et de la taille notée.

Le 8-iso $PGF_{2\alpha}$ (8-IP) est l'isoprostane qui est choisi comme reflet du niveau de stress oxydant du sujet. Son dosage se fait après recueil des échantillons urinaires par une méthode immunoenzymatique (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA) mise en œuvre sur 2 jours. Cayman's 8-Isoprostane EIA Kit est une technique qui peut être utilisée pour quantifier le 8-IP dans le plasma, les urines et d'autres liquides biologiques. Après la phase de purification et d'évaporation, chaque échantillon urinaire est repris dans le tampon EIA du kit. Les dosages sont réalisés de façon semi-automatisée à l'aide de l'automate ETI-MAX 3000 (Diasorin, Saluggia, Italie). Tous les aliquotes sont placés dans l'ETI-MAX ainsi que tous les réactifs nécessaire et la plaque à 96 puits. Cette méthode est basée sur la compétition entre les 8-IP libres et les 8-IP couplés à l'acétylcholinestérase (8-isprostane traceur) pour se lier à l'antisérum spécifique des 8-IP. Parce que la concentration du 8-IP traceur est maintenue constante tandis que la concentration du 8-IP libre varie, la quantité

de 8-IP traceur capable de se lier à l'antisérum est inversement proportionnelle à la concentration de 8-isoprostanes dans les puits. L'ensemble 8-isoprostanes-antisérum se fixe sur des anticorps monoclonaux positionnés au fond des puits. Après 18 heures d'incubation, la plaque est lavée pour éliminer l'excès de réactifs et le réactif d'Ellman est alors ajouté dans les puits. L'intensité de la coloration, déterminée par spectrophotomètre, est proportionnelle à la quantité de traceur et donc inversement proportionnelle à la quantité de 8-isoprostanes libres dans les puits. Le réactif d'Ellman contient de l'acétylthiocholine qui, sous l'action de la cholinestérase, fournit deux produits dont l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque dont l'absorbance à 412nm est mesurée.

Les dosages ont été réalisés au Laboratoire de Biochimie Médicale du CHU. Le premier jour, ce fut l'étape de purification et d'extraction des échantillons urinaires. La purification est réalisée sur des colonnes avec un tampon d'affinité pour le 8-isoprostane. Nous disposions de douze colonnes que l'on a régénérées deux fois pour purifier 40 échantillons. Cette étape terminée, il s'ensuit une phase d'évaporation sous azote pendant 3h. Le reste de la manipulation est réalisée sur l'ETI-MAX 3000. Nous préparons les réactifs et disposons tout le matériel dans l'appareil pour son bon fonctionnement. L'ETI-MAX réalise les différents transferts d'échantillons et de réactifs au sein de la plaque 96 puits pour mettre en œuvre la méthode. Avant la prochaine étape, 18h d'incubation sont nécessaires. Le lendemain a lieu l'ajout du réactif d'Ellman, puis la lecture par spectrophotométrie de la plaque. Les résultats ont été exprimés en concentrations absolues et rapportés à la créatininurie (ng/mmol créatinine).

Les tests statistiques non-paramétriques de Wilcoxon pour séries appariées (variation des marqueurs entre l'admission et la sortie) et de corrélation de Spearman (corrélation 8-IP/glycémies) ont été utilisés.

3.2. Résultats et discussion

Les caractéristiques cliniques et biologiques des 26 patients sont indiquées dans les tableaux 6 et 7.

Tableau 6 : Données cliniques

Patients	Age	Pression artérielle Systolique/diastolique à l'entrée (mmHg)	Poids à l'entrée (Kg)	Poids à la sortie (Kg)	IMC à l'entrée (Kg/m²) N : 18,5-25	IMC à la sortie (Kg/m²) N : 18,5-25
1	78	16/8	108	103	41	39
2	49	ND	106	104	36	ND
3	65	14/7	75	74	26	26
4	74	13/9	89	90	31	31
5	51	ND	104	101	36	35
6	73	19/10	78	78	25	26
7	48	15/7	74	73	27	26
8	71	12/8	78	78	31	31
9	53	13/7	78	76	29	28
10	60	15/8	74	73	29	29
11	64	11/8	109	105	38	36
12	49	15/9	114	113	37	37
13	46	13/8	136	134	46	45
14	55	16/11	133	130	43	42
15	52	10/6	109	108	34	34
16	57	13/8	71	74	25	26
17	58	14/6	92	91	38	38
18	53	13/8	103	101	43	42
19	71	11/7	95	94	35	35
20	72	12/7	66	ND	25	ND
21	67	12/7	76	75	26	26
22	66	14/7	64	64	27	27
23	52	17/9	125	ND	44	ND
24	58	13/7	95	93	36	35
25	55	14/8	115	ND	37	ND
26	79	18/9	98	ND	37	ND

Tableau 7 : Données biologiques

Patients	Glycémie à l'entrée (g/L) N : 0,7-1,1	Hb1Ac à l'entrée (%) N : 4,5-6,0	CRP à l'entrée (mg/L) N : <5	GB à l'entrée (g/L) N : 4-10	Clairance à la créatinine à l'entrée (mL/mn) N : 80-100
1	1,29	10,7	60	9,9	ND
2	1,22	13,4	6	9,4	250
3	1,62	9,6	<5	6,5	90
4	1,76	9,1	8	5,2	15
5	1,47	8,3	<5	4,9	ND
6	1,73	9,3	<5	7,6	50
7	3,84	11,6	<5	8,9	ND
8	2,95	10,9	<5	4,9	125
9	1,37	8,8	<5	6,5	96
10	2,56	10,8	<5	6,4	160
11	2,67	10,3	<5	7,9	42
12	2,1	10,6	<5	7,2	114
13	2,46	11,7	6	6,0	101
14	2,24	13,1	13	5,7	120
15	1,73	13,4	<5	7,5	167
16	1,46	12,7	<5	7,2	152
17	1,89	8,7	9	7,5	112
18	1,52	8,1	8	10,8	86
19	1,14	9,5	<5	7,8	74
20	2,16	9,0	<5	4,0	93
21	1,49	7,7	<5	5,3	92
22	1,9	10,3	<5	4,8	75
23	2,6	10,7	18	8,0	117
24	1,2	9,5	<5	6,3	111
25	2,57	9,4	6	5,3	115
26	1,25	8,7	<5	6,5	120

3.2.1. Interprétation des données cliniques et discussion

Ces patients admis en diabétologie pour un diabète décompensé présentent également d'autres facteurs de risque de complications (problèmes cardiovasculaires, cécité, amputation) et de stress oxydant.

Chez les patients diabétiques la pression artérielle visée est de 135/85 mmHg, 16 patients hospitalisés présentent une pression artérielle supérieure. Certaines études préconisent même une pression artérielle diastolique (PAD) proche de 80mmHg. L'étude HOT (Hypertension Optimal Treatment) a déterminé, dans une large population, l'objectif tensionnel diastolique permettant d'éviter les complications cardio-vasculaires. Il s'agissait d'une population âgée de 50 à 80 ans, en moyenne 61,5 ans, et une dihydropyridine était utilisée en première intention. En considérant seulement les 1 501 patients diabétiques, le nombre des événements cardio-vasculaires a été réduit de 51 % et la mortalité cardio-vasculaire de 66 % dans le groupe qui avait atteint une PAD moyenne de 81,1 mmHg que dans le groupe de contrôle moins « strict » (PAD moyenne = 85,2 mmHg) (Waeber B et al, 1997). L'hypertension artérielle est responsable d'une production anormale de ROS, notamment par activation des NAD(P)H oxydases et de la chaîne respiratoire mitochondriale, à une diminution de la biodisponibilité du monoxyde d'azote. Le déséquilibre pro-oxydant entraîne la formation de LDL oxydées et de multiples dysfonctionnements cellulaires : libération de facteurs pro-inflammatoires et de facteurs favorisant la prolifération cellulaire, processus d'apoptose et/ou de nécrose. De plus, le stress oxydant généré entretient cette hypertension artérielle (Beaudeux JL et al, 2006).

A l'entrée d'hospitalisation, les 26 patients sont pesés. 9 patients sont en surpoids (25 < IMC < 30), 4 patients présentent une obésité modérée (30 <IMC <35) et 13 patients présentent une obésité sévère ou morbide (IMC > 35).

La courte durée d'hospitalisation a tout de même permis de montrer une perte de poids en l'entrée et la sortie d'hospitalisation chez 17 patients sur 22. L'IMC moyen est passé de 33,9 ± 6,5 Kg/m² à l'entrée à 33,0 ± 6,1 Kg/m² à la sortie ($p<0,05$).

La lipotoxicité des cellules vasculaires, endothéliales et pancréatiques entre autres est responsable de stress oxydant, comme nous le montre l'étude d'Unger chez des

souris obèses diabétiques (Unger RH, 1997). L'hyperlipidémie entraine une baisse de l'insulinosécrétion, une activation des protéines inflammatoires, une majoration de l'apoptose et donc une augmentation du stress oxydant.

3.2.2. Interprétation des données biologiques et discussion

Après une durée d'hospitalisation de 5-10 jours selon les patients, les résultats montrent que la concentration urinaire moyenne de 8-IP a baissé de 20% (121 ± 82 à J0 et 105 ± 69 ng/mmol créatinine à la sortie ($p<0,0454$)). Ainsi chez 15 patients la concentration urinaire de 8-IP est nettement diminuée, chez 6 patients elle est sensiblement stable le temps de l'hospitalisation et chez 4 patients elle a une valeur supérieure à la sortie.

Tableau 8 : Valeurs du 8-IP (ng/mmol créatinine) et des glycémies (g/L) à l'entrée et à la sortie d'hospitalisation. Test apparié de Wilcoxon.

	8-IP (ng/mmol créatinine)		Glycémie (g/L)	
N°patient	admission	sortie	admission	Sortie
1	91	95	1,29	1,84
2	189	189	1,22	2,11
3	93	98	1,62	0,96
4	54	60	1,76	0,78
5	379	281	1,47	1,93
6	56	37	1,73	1,61
7	232	123	3,84	0,79
8	140	164	2,95	1,49
9	76	79	1,37	1,35
10	324	265	2,56	1,75
11	103	45	2,67	1,67
12	100	57	2,1	1,45
13	83	50	2,46	1,51
14	155	151	2,24	1,61
15	58	51	1,73	1,4
16	94	156	1,46	1,61
17	118	81	1,89	1,39
18	63	74	1,52	1,37

19	114	112	1,14	0,97
20	177	215	2,16	1,28
21	70	31	1,49	1,13
22	53	57	1,9	1,52
23	106	49	2,6	1,45
24	61	56	1,2	1,18
25	75	63	2,57	1,74
26	83	92	1,25	1,6
Moyenne	121	105	1,9	1,4
Ecart-type	82	69	0,7	0,3
p sortie versus entrée	0,0454		0,0025	

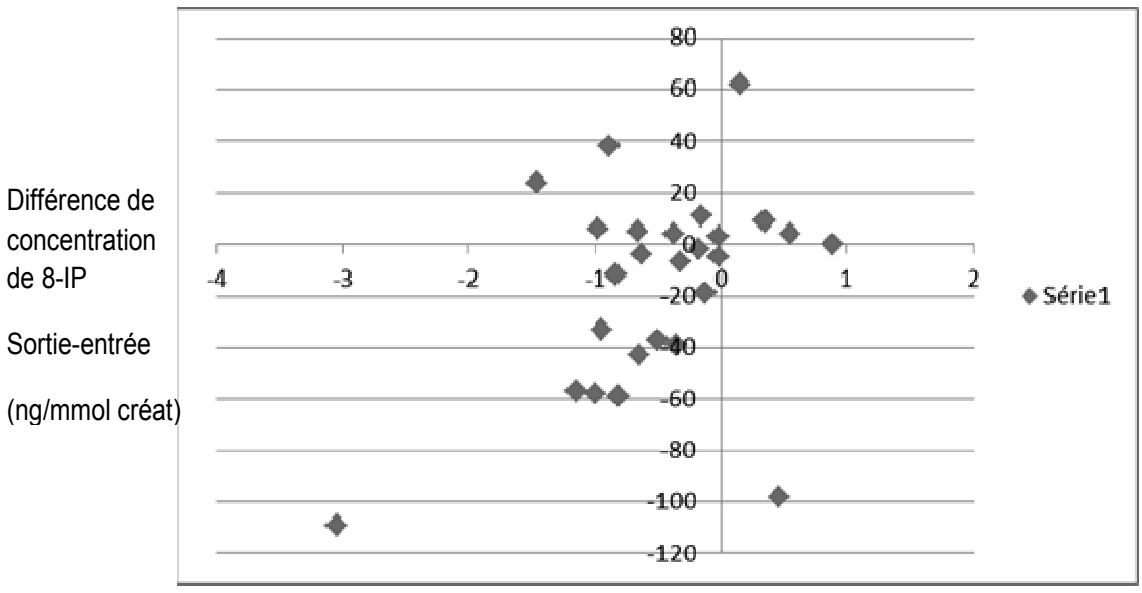
Lors de l'hospitalisation, pour 21 patients la glycémie a nettement diminuée, elle est même normalisée pour 6 patients d'entre eux. La glycémie moyenne a baissé, elle est passée de 1,9 ± 0,7 g/L à l'entrée à 1,4 ± 0,3 g/L à la sortie ($p<0,0025$).

5 patients ont une glycémie de sortie supérieure à celle de l'entrée. Sur ces 5 patients, 4 patients ont aussi le taux d'IP qui a augmenté pendant l'hospitalisation.

Chez 62% des patients, la tendance glycémique suit celle du 8-IP.

Par ailleurs on peut noter que les patients ayant des glycémies à jeun et un taux d'hémoglobine glyquée très élevés sont ceux qui ont des valeurs de 8-IP les plus hautes. Même si l'hospitalisation courte n'a pas permis de normaliser les valeurs de 8-IP, celles-ci ont diminuées presque de 20% chez ces patients.

La figure 38 montre la répartition des patients selon la variation des concentrations en 8-IP et en glycémie au cours de l'hospitalisation.



Différence de glycémie sortie-entrée (g/L)

Les points montrant une association entre 8-IP et glycémie se trouvent dans les quarts inférieurs gauche et supérieur droit. Il n'y a pas de corrélation entre la diminution de la 8-isoprostanurie et celle de la glycémie. Le quart supérieur gauche montre les patients chez qui une baisse de glycémie a été notée, sans diminution des concentrations en 8-IP. Le quart inférieur droit est la zone de non diminution de glycémie et de 8-IP. Cette zone ne concerne qu'un seul patient.

Un troisième paramètre, l'hémoglobine glyquée montre des valeurs élevée chez tous les patients (7,7 – 13,4 %). La moyenne de l'hémoglobine glyquée est de 10,2 ± 1,6 %). La courte durée d'hospitalisation n'a pas permis ici de percevoir une baisse mais qui peut être supposé par la prise en charge du diabète et du stress oxydant. L'étude de Griesmacher et al. portant sur 158 patients diabétiques (77 diabétiques de type 1 et 81 patients de type 2), a mis en évidence que les diabétiques de type 2 ont des taux plasmatiques en TBARS (marqueurs du stress oxydant) significativement plus élevés que les diabétiques de type 1. De plus les diabétiques ayant un bon contrôle de leur équilibre glycémique (HbA1c < 6,5 %) ont des valeurs plasmatiques en TBARS plus basses que ceux dont le contrôle de l'équilibre glycémique est moins bon (HbA1c > 6,5 %) (Greismacher A et al, 1995)

.

Dans une étude contrôlée chez 85 patients dont la majorité présentaient un diabète de type 2, une augmentation des concentrations en 8-IP a également été retrouvée, corrélée au déséquilibre glycémique (Davi G et al, 1999). Les auteurs suggèrent que l'existence du stress oxydant peut-être en lien avec la stimulation de l'agrégation plaquettaire stimulée par l'effet pro-inflammatoire de l'acide arachidonique (acide gras oméga-6) à l'origine de la production de 8-isoprostane. Il est suggéré qu'une prise en charge comprenant une supplémentation en anti-oxydants pourrait alors se justifier chez ces patients.

Dans une autre étude contrôlée chez 21 patients avec diabète de type 2, les auteurs ont montré que la cause principale de stress oxydant évalué par l'excrétion de 8-IP était l'existence de variations rapides de la glycémie entre les phases pré- et post-prandiale (Monnier L et al, 2006). Dans cette étude, la majoration de l'HbA1c était

moins spécifique de survenue de stress oxydant que les fluctuations aiguës de glycémie. Notre étude, réalisée sur une durée courte, avec par conséquent de très faibles variations attendues sur l'HbA1c, est en accord avec la suggestion d'un effet à court terme de la baisse de la glycémie sur l'amélioration du stress oxydant.

3.3. Conclusion

La situation de décompensation du diabète de type 2 est accompagnée par un stress oxydant. Celui-ci diminue après une hospitalisation de courte durée. Pendant cette période, la glycémie diminue, sans corrélation avec la diminution de l'excrétion urinaire de 8-isoprostane, suggérant que ces deux paramètres sont indépendants.
Le niveau encore élevé d'excrétion urinaire de 8-isoprostane après prise en charge suggère qu'une complémentation nutritionnelle en antioxydants pourrait faire partie de la prise en charge de ces patients.

CONCLUSION

Le diabète est une pathologie grave qui est liée au développement du stress oxydant. Le concept de « stress oxydant » décrit une situation dans laquelle la cellule est dépassée par la présence excessive des espèces oxygénées réactives toxiques, situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines (diabètes, cancers, inflammations, maladies neurodégénératives…).

L'étude du stress oxydant au cours du diabète de type 2 a fait l'objet de nombreux travaux chez l'animal mais peu de données sont disponibles chez l'homme. Il a été montré que se sont les phénomènes d'hyperglycémie chronique et d'hyperglycémie aigüe en cause dans le développement du stress oxydant et des complications diabétiques.

Le but de cette étude est d'évaluer le niveau de stress oxydant chez des patients admis en service d'endocrinologie pour décompensation de diabète de type 2, avec réévaluation de ce marqueur à la sortie. L'hypothèse d'une corrélation entre la baisse de la glycémie et celle du stress oxydant serait intéressante dans la prise en charge future de cette pathologie. Un marqueur spécifique est utilisé, le 8-isoprostane formé par l'action des radicaux libres sur l'acide arachidonique.

Cette étude a permis d'observer, la diminution de l'excrétion urinaire de 8-isoprostane et de celle de la glycémie chez les patients pris en charge, sans qu'il n'y ait de corrélation entre les deux. Par contre, la courte durée d'hospitalisation ne permet de suggérer cet effet régressif du stress oxydant à long terme, ni l'impact de la diminution du stress oxydant sur l'hémoglobine glyquée.

Les perspectives de cette étude seraient d'associer à la prise en charge du diabète chez ces patients, un antioxydant puissant du stress oxydant chez le patient diabétique. De nombreuses études animales sont d'ailleurs en cours sur la recherche d'un antioxydant actif sur le stress oxydant induit par l'hyperglycémie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adachi J, Matsushita S, Yoshioka N, Funae R? Fujita T, Higuchi S, Ueno Y. Plasma phosphatidylcholine hydroperoxide as a new marker of oxidative stress in alcoholic patients. *J Lipid Res* 2004 ; 45 : 967-71.

Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Lomri A. Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue de rhumatologie* 2007 ; 74 : 636-43.

Agence France Presse. La Sécu a dépensé 10 milliards d'euros pour le diabète en 2010. *Le Point* 29/06/2011.

Ahren B. Use of DPP-4 inhibitors in type 2 diabetes : focus on sitagliptin. *Diabetes metab syndr obes* 2010 ; 3 : 31-41.

Arab K, Steghens JP. Plasma lipid peroxides measurement by an automated xylenol orange method. *Anal Biochem* 2004 ; 325 : 158-63.

Astrup A. The role of dietary fat in obesity. *Semin. Vasc. Med*., 2005 ; 5 :40-7.

Astrup A.The role of dietary fat in obesity. *Semin Vasc Med* 2005; 28:664.

Avignon A, Picard S. Lipotoxicité et régulation glycémique. *Diabetes & Metabolism* 1999 ; 25 : 275-82.

Beaudeux JL, Delattre J, Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Legrand A, Peynet J. Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* 2006 ; 21 : 144-50.

Beljean-Leymarie M, Lemauviel L, Bruna E. Chromatographic determination of plasma malondialdehyde. *Ann Biol Clin* 1993 ; 51 : 436 (abstract).

Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseaume E, Hubert-Vidal MA, Rieusset J. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J Clin Invest* 2008 ; 118 : 789-800.

Bouzakri K, Koistinen HA, Zierath J. Molecular mechanisms of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes. *Curr Diab Rev* 2005 ; 1 : 167-74.

Brasseur L, Thérond P, Legrand A. Pouvoir antioxydant total du plasma. *Act Pharm Biol Clin* 1995 ; 8 : 239-44.

Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med* 1984 ; 101 : 527-37.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001 ; 414 : 813-20.

Cadenas E, Daries JA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free radical. Biol Med* 2000 ; 29 : 222-30.

Ceriello A, dello Russo P, Amstad P, Cerutti P. High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes* 1996 ; 45 : 471-7.

Cerellio A, Bortolotti N, Pirisi M, *et al.* Total plasma anti-oxidant capacity predicts thrombosis-prone status in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1997 ; 20 : 1589-93.

Cerellio A, Bortolotti N, Crescentini A, *et al.* Antioxidant defences are reduced during the oral glucose tolerance test in normal and non-insulin-dependent diabetic subjects. *Eur J Clin Invest* 1998 ; 28 : 329-33.

Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radc Biol Med* 2010 ; 48 : 749-62

Collège des enseignants d'endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques. Endocrinologie, *Diabétologie et maladies métaboliques,* 2007 : 252-7.

Dal S. Le stress oxydant, diabète et complications. *CEED* 2007.

Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006 ; 52 : 601-623.

Davi G, Ciabattoni G et al. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f2alpha and platelet activation in diabetes mellitus : effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 1999 ; 99 : 224-9.

Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT. Stable markers of oxidant damage to proteins and theirs application in study of human disease. *Free Radic Biol Med* 1999 ; 27 : 1151-61.

Davis TM, Stratton IM, Fox CJ, Holman RR, Turner RC. U.K. Prospective Diabetes Study 22. Effect of age at diagnosis on diabetic tissue damage during the first 6 years of NIDDM. *Diabetes Care* 1997; 20: 1435-41.

Del rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecue and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005 ; 15 : 316-28.

Deleve LD, Kaplowitz N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharm Ther* 1991 ; 52 : 287-305.

Dresner A, Laurent D, Marcucci M, *et al*. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* 1999 ; 103: 253-9.

Dröde W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 2002; 82: 47-95

Duron F, Heurtier A, 2005 : http://www.chusa.jussieu.fr/pedagogie/dcem2/endocrino/POLY_ENDOC_StA_Pitie/complic_diabete.doc

Elashoff M, Matveyenko AV, Gier B, Elashoff R, Butler PC. Pancreatitis, pancreatic, and thyroid cancer with glucagon-like peptide-1-based therapies. Gastroenterology 2011; 141: 150-6.

Etude Entred : suite de résultats. Les complications du diabète et le diabète du sujet âgé. *Bull Epidemiol Hebd* 2005; 12-13: 45-50.

Foretz M, Hebrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, Sakamoto K, Andreelli F, Viollet B. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. J Clin Invest 2010 ; 120 : 2355-69.

Franco R, Schoneveld OJ, Pappa A, Panayiotidis MI. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Arch Physiol Biochem* 2007 ; 113 : 234-58.

Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 97-112

Furtado de Souza C, Dalzochio MB, de Oliveira FJ, Gross JL, Leitao CB. Glucose tolerance status is a better predictor of diabetes and cardiovascular outcomes than metabolic syndrom : a prospective cohort study. *Diabetol Metab Syndr* 2012; 4: 4-25.

Gay CA, Gebicki JM. Measurement of protein and lipid hydroperoxydes in biological systems by the ferric-xylenol orange method. *Anal Biochem* 2003 ; 315 : 29-35.

Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. BLC-2 expression antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation endproducts in bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 1996 ; 97 : 1422-8.

Gillery P, Dumont G, Vassault A. Evaluation of glycohemoglobin assays in France by national quality control surveys. *Diabetes Care* 1998 ; 21 : 265-70.

Girard J. Rôle des acides gras libres dans l'insulino-résistance au cours du diabète non-insulino-dépendant. *Diabete Metab* 1995; 21: 79-88.

Girard J. Rôle des acides gras libres dans la sécrétion et l'action de l'insuline : mécanismes de la lipotoxicité. *M/S* 2003 ; 19 : 827-33.

Girard J. The incretins : from the concept to their use in the treatment of type 2 diabetes. Part A : Incretins : concept and physiological functions. *Diabetes Metabolism* 2008 ; 34 : 550-9.

Grassi D, Lippi C, Necozione S, Desideri G, Ferri C.
Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressues in healthy persons.
Am J Clin Nutr 2005 ; 81 : 611-4.

Greismacher A, Kindhauser M, Andert SE, et al. Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid reactive substances in diabetes mellitus. *Am J Med* 1995 ; 98 : 469-75

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase : role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000 ; 86 : 494-501.

Gutteridge JMC, Stocks J, Dormandy TL. Thiobarbituric acid-reactive substances derived from autoxiding linoleic and linolenic acids. *Anal Chim Acta* 1974 ; 70 : 107-11.

Gutteridge JMC. Invited review free radicals in diseases processes : a compilation of cause and consequence. *Free Rad Res Comm* 1992 ; 19 : 598-620.

Haddad JJ.Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. *Respiratory Research* 2002 ; 3 : 26.

Haffner SM, Lehto S, Ronnemaa T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998; 339: 229-34.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. *Second Edition. Clarenton Press, Oxford* 1989.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3rd edition. *Clarenton Oxford University Press* 1999.

Hare J. Nitroso-redox balance in the cardiovascular system. *N Engl J Med* 2004 ; 351 : 2112-14.

Haute Autorité de Santé, Comission de la transparence du Victoza 6mg/ml, solution injectable en stylo préremli. Avis du 2 décembre 2009.

Hodge JE. Chemistry of browning reactions in model systems. *J Agric Food Chem* 1953; 1: 928-43.

Hudson BI, Wendt T, Bucciarelli LG, et al. Diabetic vascular disease : it's all the

RAGE. *Antioxid Redox Signal* 2005 ; 7 : 1588-1600.

Hunt JV, Dean RT, Wolff SP. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J* 1988 ; 256 : 205-12.

INSERM, KANTAR HEALTH, ROCHE. Ob-Epi 2012. Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité.

International Diabetes Federation. Diabetes Atlas third edition chapitre 1. 2007.

Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990 ; 9 : 515-40.

Johanson L, Borg L. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem* 1988 ; 174 : 331-6.

Kennedy AL, Lyons TG. Glycation, oxidation and lipoxidation in the development of diabetic complications. *Metabolism* 1997 ; 46 : 14-21.

Kim JK, Gavrilova O, Chen Y, Reitman ML, Shulman GI. Mechanism of insulin resistance in A-ZIP/F-1 fatless mice. *J Biol Chem* 2000 ; 275: 8456-60.

King GL, Brownlee M. The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1996 ; 25 : 255-70.

Kukielka E, Dicker E, Cederbaum AI. Increased production of reactive oxygen species by rat liver mitochondria after chronic ethanol treatment. *Arch Biochem Biophys* 1994 ; 309 : 377-86.

Kusnik-Joinville O, Weill A, Salavane B, Ricordeau P, Allemand H. Diabète traité : quelles évolutions entre 2000 et 2005 ? *Pratiques et organisation des soins*, 2007, volume 38.

Kusnik- Joinville O, Weill A, Ricordeau P, Allemand H. Diabète traité en France en 2007 : un taux de prévalence proche de 4% et des disparités géographiques croissantes. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire,* 2008 ; 43 409-20.

Lapillonne A. Retard de croissance intra-utérin et devenir à l'âge adulte. *Bull Acad Natle Med* 2011 ; 195 : 477-85.

Le rôle des hormones intestinales dans l'homéostasie du glucose. *Drucker. J Clin Invest 2007 ; 117 : 24-32.*

Litherland GJ, Hundal HS. Protein kinase B (PKB/Akt) – a key regulator of glucose transport?. FEBS 2001; 492: 199-203.

Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F, Sener A, Hellerström C. Participation of endogenous fatty acids in the secretory activity of the pancreatic β-cell. *Biochem J* 1985 ; 227: 995-1002.

Mason TM, Goh T, Tchipashvili V, et al. Prolonged elevation of plasma free fatty acids desensitizes the insulin secretory response to glucose in vivo in rats. Diabetes 1999; 48: 524-30.

Massion P, Preiser JC, Balligand JL. Les espèces réactives de l'azote : bénéfiques ou délétères ? *Nutrition clinique et métabolisme* 2002 ; 16 : 248-52.

Milne GL, Sanchez SC, Musiek ES, Morrow JD. Quantification of F2-isoprostanes as abiomarker of oxidative stress. *Nature Protocols* 2007 ; 2 : 221-6.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide : physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991 ; 43 : 109-42.

Monnier VM. Toward a Maillard reaction theory of aging. *Prog Clin Biol Res* 1989 ; 304 : 1-22.

Monnier L, Mas E et al. Activation of oxidatve stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA* 2006 ; 295 : 1681-7.

Montushi P, Barnes PJ, Roberts LJ. Isoprostanes : markers and mediators of oxidative stress. *The FASEB journal* 2004 ; 18 : 1791-1800.

Morrow JD, Harris TM, Roberts 2nd LJ. Non cyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: Analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal Biochem* 1990 ; 181 : 1-10.

Mulder DJ, Water TV et al. Skin autoluorescence, a novel marker for glycemic and oxidative stress-derived advanced glycation endproducts : an overview of current clinical studies, evidence, and limitations. *Diabetes Technol Ther* 2006 ; 8 : 523-35.

Nakajima K, Nakano T, Tanaka A. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis : The comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clin Chim Acta*, 2006, 367, 36-47.

Nair V, Turner GA, Oferman RJ. Novel adducts from the modification of nucleic acid bases by malondialdehyde. *J Am Chem Soc* 1984 ; 106 : 3370-1.

Païta M, Weill A. Les personnes en Affection Longue Durée au 31 décembre 2007. *Point de repère* 20 ; novembre 2008.

Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne J. Evaluation du stress oxydant : une réalité pour le médecin généraliste. *Vaisseaux, Cœur, Poumon* 1999 ; 4 : 148-54.

Poitout V, Robertson RP. Secondary β-cell failure in type 2 diabetes. A convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 2002 ; 143 : 339-42.

Randle P, Garland P, Newsholme E. The glucose-fatty acid cycle : its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963 ; 1 : 785-789.

Ref Diabete Quebec. Alcool et diabète.
http://www.diabete.qc.ca/html/alimentation/alcool.html

Revue prescrire 2008; 28: 664.

Rigaud D, Giachetti T, Deheeger M, Boys JM, Volatier JL, Lemoine A, Cassuto DA. Enquête française de consommation alimentaire 1 : énergie et macronutriments. *Cahier de nutrition et de diététique* 1997 ; 32 : 379-89

Roberts 2nd LJ, Morrow JD. Measurement of F2-isoprostaness as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med* 2000 ; 28 : 505-13.

Saad A, Virella G, Chassereau Ch, et al. OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. *J Lipid Res*, 2006, 47, 1975-83.

Salas-Vidal E, Lomeli H, Castro-Obregon S, Cuervo R, Escalante-Alcalde D, Covarrubias L. Reactive oxygen species participate in the control of mouse embryonic cell death. *Exp Cell Res.* 1998; 238: 136-47.

IDF Montréal 2009. Sauvanet JP. Les Actus du diabète. *Diabetes Atlas*, four edition.

Site internet de l'OMS. Diabète aide-mémoire 312. Septembre 2011

Shin BC, Huggins JW, Carraway KL. Effect of pH, concentration and aging on the malondialdehyde reaction with proteins. *Lipids* 1972 ; 7 : 229-33.

Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. J Clin Invest 2000; 106: 171-6.

Slatter DA, Bolton CH, Bailey AJ. The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia* 2000 ; 43 : 550-7.

Stocker R, Keaney JF. Role of oxidative modification in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004 ; 84 : 1381-1478.

Suarez G, Rajaram R, Bhuyan KC, Oranshy AL, Goidl JA. Administration of an aldose reductase inhibitor induces a decrease of collagen fluorescence in diabetic rats. *J Clin Invest* 1988 ; 88: 624-7.

Summers SA. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prod Lipid Res* 2006 ; 45 : 42-72.

Suzuki K, Ito Y, Inoue T, Hamajima N. Inverse association of serum carotenoids with prevalence of metabolic syndrome among Japanese. *Clin Nutr* 2011 ; 30 : 369-75.

Tan AL, Forbes JM, Cooper ME. AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 2007 ; 27 : 130-43.

Thallas-Bonke V, Thorpe SR, Coughlan MT, Fukami K, Yap FY, Sourris KC, Penfold SA, Bach LA, Cooper ME, Forbes JM. Inhibition of NADPH oxidase prevents advanced, glycation end product-mediated damage in diabetic nephropathy through a protein kinase C-alpha-dependent pathway. *Diabetes* 2008 ; 57 : 460-9.

Thérond P, Couturier M, Demelier JF, Lemonnier F. Simultaneous determination of the main molecular species of soybean phosphatidylcholine or phosphatidylethanolamine and their corresponding hydropexides obtained by lipoxygenase treatment. *Lipids* 1993 ; 28 : 245-9.

Tsikas D, Schwedhelm E et al. Divergence in urinary 8-iso-$PGF_{2\alpha}$ levels from gas chromatography-tandem mass spectrometry quantification after thin-layer chromatography and immunoaffinity column chromatography reveals heterogeneity of 8-iso-$PGF_{2\alpha}$. Possible methodological, mechanistic and clinical implications. *J Chromatogr B* 2003 ; 794 : 237-55.

Tsimikas S. Measures of oxidative stress. *Clin Lab Med* 2006 ; 26 : 571-90.

Uchida K, Stadtman ER. Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 4544-8.

Unger RH. How obesity causes diabetes in Zucker diabetic fatty rats. Trends Endocrinol Metab 1997; 8: 276-82.

Vindis C. Etude de l'effet prolifératif du peroxyde d'hydrogène produit par les monoamines oxydases rénales. *Université P.Sabatier Toulouse*. 2000

Virally M, Blicklé JF, Girard J, Halimi S, Simon D, Guillausseau PJ. Type 2 diabetes mellitus : epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. Diabetes and metabolism 2007; 33: 231-44.

Virally M, Kevorkian JP, Guillausseau PJ. Incretines, incrétinomimétiques et inhibiteurs de la DPP-4 : homéostasie glucidique et diabète de type 2. *STV* 2008 ; 20 : 453-61.

Waeber B, Roth D. The HOT study : A new step in the management of hypertension? *Medecine et hygiene* 1997 ; 55 : 1589-90.

Wardman P, Candeias LP. Fenton chemistry : an introduction. *Radiat Res* 1996 ; 145 : 523-31.

Will C, Bodermann P, Ghali WA, Faris PD, Cornuz J. Active smoking and the risk of type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2007; 298 : 2654-64.
WWW.exobiologie.info/diabete/11insulinoresist.pdf.
www.empr.com/fda-warns-of-renal-failure-with-byetta/.../156938/FDA warns of renal failure with Byetta. 2009.
Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med Metab B* 1976 ; 15 : 212-6.
Ziech O, Franco R et al. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chem Biol Interact* 2010 ; 188 : 334-9.

UNIVERSITÉ DE ROUEN

UNIVERSITE de ROUEN
Faculté de Médecine et de Pharmacie

SERMENT DE GALIEN

Je jure d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.

COUAILLET Laure

Le stress oxydant au cours du diabète de type II. Application à la détermination de l'excrétion urinaire de 8-isoprostane chez le patient diabétique. Th. D. Pharm., Rouen, 2015, 109 p.

RESUME

Le diabète est une maladie considérée par l'OMS comme une épidémie et dont la prévalence a augmenté de façon très importante ces dernières années. Le diabète de type 2, se caractérise par une altération de la sécrétion d'insuline par le pancréas et par une insulinorésistance au niveau des tissus périphériques, et notamment du muscle squelettique. Des anomalies du métabolisme lipidique, comme une diminution de l'oxydation des acides gras et une accumulation de lipides intramusculaires ont été mises en évidence chez les patients diabétiques. L'hyperglycémie et l'hyperlipidémie retrouvées chez ces patients génèrent un stress oxydant. Une étude réalisée par Bonnard sur des souris diabétiques révèle que des altérations mitochondriales sont la conséquence d'un stress oxydant induit par ces phénomènes. L'objectif de notre travail au CHU de Rouen, est de mettre en évidence une relation directe entre stress oxydant et hyperglycémie chez des patients diabétiques de type 2 hospitalisés, ainsi qu'une baisse du stress oxydant par la prise en charge du diabète décompensé. Le stress oxydant est évalué par le dosage urinaire du 8-isoprostane, marqueur spécifique et stable du stress oxydant. L'étude a montré une diminution de l'excrétion urinaire de 8-isoprostane et une baisse de la glycémie sans qu'il y ait de corrélation entre les deux.

MOTS CLES : Diabète de type 2 – Stress oxydant – 8-isoprostane - Hyperglycémie

---

JURY

Président : **Mme DUBUS Isabelle, Professeur en biochimie**

Membres : **Mr ZIEGLER Frédéric, Maître de Conférences**

Mme OZENNE Geneviève, Diabétologue
Mme MABILAIS Caroline, Docteur en Pharmacie

DATE DE SOUTENANCE : 29 octobre 2015