

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Badji Mokhtar

Faculté des Sciences

Département de Biochimie



N° d'ordre

Année 2013-2014

N° de série

Thèse

Présentée pour l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences

Option : Biochimie

Par : BOUSSEKINE SAMIRA

Thème

**Contribution à l'étude de l'effet du
sélénium sur le mécanisme biochimique
chez le diabète expérimental**

Soutenu le : 26 Juin 2014

Devant le jury :

Président : Mr KECHRID Z.

Pr. Université Badji Mokhtar- Annaba-

Rapporteur : Mr BOUZERNA N.

Pr. Université Badji Mokhtar -Annaba-

Examineurs : - Mr MESSARAH M.

Pr. Université Badji Mokhtar- Annaba-

- Mr ROUABHI R.

Pr. Université Larbi Tebessi- Tebessa-

- Mme TADJINE A.

Pr. Université Taref

- Mr DJABRI B.

MCA. Université Larbi Tebessi- Tebessa-

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au CHU d'Annaba au sein de laboratoire central de Biochimie dirigée par le Professeur Sadek BENHARKET. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements pour son accueil bienveillant au sein du laboratoire, pour sa rigueur scientifique et ses encouragements ainsi que pour la confiance qu'il m'a constamment témoignée.

✓ *Je voudrais témoigner ma reconnaissance au Professeur Noureddine BOUZERNA pour avoir encadré cette thèse. Je le remercie particulièrement pour son exigence, sa disponibilité, ses encouragements, et ses conseils très précieux, je suis très reconnaissante de la confiance qu'il m'a témoignée.*

✓ *Je remercie le Professeur Zine KECHRID Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse, Hommages respectueux.*

✓ *Mes remerciements sincères et respectueux vont également au Professeur Mahfoud MESSARAH, pour avoir accepté de consacrer du temps, examiner et juger ce travail, et pour siéger dans ce jury en y apportant sa compétence et son expertise.*

✓ *Je remercie infiniment le Professeur Rachid ROUABHI pour sa précieuse pour avoir accepté d'examiner et de venir honorer de sa présence mon jury de thèse. Qu'il me soit permis de lui exprimer dans ces lignes toute ma reconnaissance et mon profond respect.*

✓ *Je remercie vivement le Professeur Aicha TAJINE, pour sa participation à mon jury de*

✓ *thèse et pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de juger ce travail, qu'elle trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance.*

✓ *Mes remerciements s'adressent aussi a Monsieur DJABRI Belgacem Maître de conférence au département de Biologie de l'université larbi tebessi de m'avoir accorder le privilège de participer à ce jury et d'examiner avec soin ce mémoire. Tout l'honneur lui en revient.*

✓ *Je souhaite exprimer mes sincères et profonds remerciements à tous les autres membres du laboratoire pour leur aide, leurs encouragements et l'ambiance amicale qu'ils ont su créer.*

Enfin, j'adresse mes remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce présent travail.

Résumé

Le stress oxydant joue un rôle prépondérant dans les complications du diabète. En raison de l'hyperglycémie, la glycosylation non enzymatique ou glycation des protéines est augmentée. Des travaux ont déjà mis en évidence la glycation de la glutathion peroxydase (GPx) chez les diabétiques de type 1 ce qui entraîne une diminution de l'activité enzymatique. De plus, la diminution du glutathion réduit (GSH) à cause de l'inactivation de l'enzyme glucose -6-phosphate déshydrogénase (G6PDH). Dans ce contexte, notre travail a porté sur l'étude de l'effet du sélénite de sodium sur l'état du stress oxydatif et l'apparition des complications chez le rat diabétique. Il s'agit d'une étude expérimentale menée au laboratoire sur 35 rats mâles de la souche Wistar répartis en cinq lots de sept rats chacun dont le premier lot sert de témoin (TS), le second est un lot traité par injection intra péritonéal du sélénium à raison de 1.89 mg/kg/j (TTSe), les 03 derniers lots sont rendus diabétiques par injection intra péritonéale de 150 mg/kg d'alloxane (dose unique). Un des lots diabétique est traité par injection intra péritonéale d'insuline à 3UI/100 g PC /J, un autre lot diabétique est traité par 1.89 mg/kg/j de sélénium par voie intra péritonéale et ceci pendant 21 jours (les deux lots traités par le sélénium ont subi un prétraitement par gavage de 2mg/kg/j pendant 10 jours par le même oligoélément). A partir de l'analyse des résultats, on a observé que les rats diabétiques non traités ont subi une chute significative du poids corporel. L'injection de l'alloxane a provoqué également une perturbation très claire du métabolisme glucidique, lipidique et protéique traduisant par une augmentation du taux sanguin de glucose, du cholestérol total, LDL-c, triglycérides, lipides totaux, bilirubine, urée, créatinine et l'activité enzymatique des transaminases, phosphatase alcaline, et une diminution de la magnésémie, l'insuline, HDL-c, et l'activité de l'amylose et G6PDH sérique. Une diminution de la défense antioxydante ; GSH, GPx et CAT, avec augmentation du taux de MDA et l'activité de la GST dans les tissus (foie, reins, cœur et testicules). L'étude histologique des organes (pancréas, reins foie, testicules) montre une destruction des cellules des îlots de Langerhans et aucune modification histologique concernant les autres tissus. Le traitement par le sélénium a presque normalisé les paramètres biochimiques étudiés, avec protection du tissu pancréatique des attaques radicalaires provoquées par l'alloxane. Enfin, la présente étude montre que le traitement des rats diabétiques par le sélénium prévient les complications et plus particulièrement les maladies cardiovasculaires induites par l'hyperglycémie.

Mots clés : Diabète, Stress oxydant, Sélénium, Paramètres biochimiques, Histologie.

Summary

Oxidative stress contributes to the pathogenesis and progression of complications in diabetes. One of the consequences of hyperglycaemia is oxidative stress, which accelerates glycation of proteins. The glycation of glutathione peroxidase (GPx) has been reported in type 1 diabetic and results in a decreased activity. Moreover, glutathione (GSH) concentration has been found to be lower. In this context, the effects of sodium selenite on the oxidative stress and progression of complications in diabetes were studied. In this study, thirty five male albino (wistar) rats randomly divided into five groups of seven each. Two groups were pre-treated for 10 days by sodium selenite (2 mg/kg.bw/d) via orogastric route. The first group was served as the control, the second as the normal treated intra peritoneally by selenium (1.89 mg/kg.bw/d). Three groups were intra peritoneally injected with alloxan (150 mg/kg.bw) to induce diabetes. One diabetic group treated intra peritoneally by insulin (3UI/100g .bw), another diabetic group (pre-treated by selenium 2 mg/kg.bw/d for 10 days) treated intra peritoneally by selenium (1.89 mg/kg.bw/d) for further three weeks. From the analysis of the results, one observed that the untreated diabetic rats have undergone a chute of the important corporal weight. The alloxan injection also invoked a disturbance of the glucidic, lipidic and proteic metabolism translating by increased of the content plasmatic in glucose, total cholesterol, LDL-c, triglycerides, total lipids, bilirubin, the activities of transaminases (TGO, TGP) and alkaline phosphatase (ALP). On the other hand the concentration of the magnesium, insulin, HDL-c and activities of amylase and glucose-6- phosphate deshydrogenase (G6PDH) were decreased. The content of glutathione (GSH) and activities of GPx and CAT were decreased in tissues (liver, kidney, heart and testicles), in contrast the content of MDA and activity of GST were increased in tissues studied. The histology of the pancreas showed a necrosis to the level of the islets of Langerhans driving to their total disappearance. Furthermore, treatment of diabetic rats with selenium showed a anti hyperglycemic effect improving all the biochemical parameters and especially cytoprotectrice activity on the pancreas while improving the capacity of the insulin secretion.

In conclusion; the present study shows that treatment of diabetic rats with sodium selenite prevented complications in diabetes and cardiovascular diseases induced by hyperlipemia and lipid peroxidation.

Key words: Diabetes, Oxidative stress, Selenium, Biochemical parameters, Histology.

الإجهاد التأكسدي يلعب دور هام في مضاعفات مرض السكر. بسبب ارتفاع نسبة السكر في الدم و الذي يؤدي الى عملية التسكير غير الانزيمي للبروتينات. عدت دراسات أجريت حول عملية تسكير انزيم الجلوتاثيون بيروكسيداز (GPx) 1 و الذي يؤدي الى تثبيط نشاطه. بالاضافة الى انخفاض كمية الجلوتاثيون (GSH) بسبب تثبيط انزيم جلوكوز 6 فوسفات ديهيدروجيناز (G6PDH) .

من هذا المنظار تهدف دراستنا الى البحث عن مدى تأثير عنصر السيلينيوم على عملية الاجهاد التاكسدي و ظهور

أجريت هذه التجربة في المخبر على 35 (5) : الشاهد (TS) الشاهد المعالج بالسيلينيوم (TTSe) / 150 ين (3) 100/ غ) يوميا، و مجموعة عولجت بحقن السيلينيوم (1,89 مغ/كغ/يوم) لمدة 21 يوم (المجموعتين المعالجتين بحقن السيلينيوم قد عولجت به عن طريق الفم لمدة 10 أيام).

النتائج أثبتت أن الحيوانات المصابة بالسكري غير المعالجة شهدت انخفاض في وزن الجسم بشكل كبير. حقن الألوكسان سبب كذلك اختلال واضح في استقلاب الجلوكوز، الدهون و البروتين حيث وجدنا فرط في نسبة السكر في الدم، الكولسترول الكلي، الكولسترول منخفض الكثافة، الجليسيريدات الثلاثية، الليبيدات الكلية، اليوريا، الكرياتينين، البيلبيروبين، انزيمات النقل الأمينية و الفوسفاتاز القاعدي، في المقابل انخفاض في نسبة المغنيزيوم، الأنسولين، نشاط انزيم جلوكوز 6 فوسفات ديهيدروجيناز، و الأميلاز في الدم. التحليل النسيجي للأعضاء (القلب، الكبد، الكليتين و الخصيتين)، بينت انخفاض شديد في نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة (GPx, CAT) و مستوى الجلوتاثيون، ارتفاع في نشاط (GST) المالونديالدهيد (MDA) في الأنسجة المذكورة. الدراسة النسيجية للأعضاء بينت انخفاض في عدد جزر لنجرهاتز للبنكرياس ناتج عن تنخر في هذه الجزر بسبب الجذور الحرة الناتجة عن حقن الألوكسان. أما بالنسبة للأعضاء (الكليتين و الخصيتين)، الدراسة النسيجية لم تبين أي تغيير.

علاج الجرذان المصابة بالسكري بمادة السيلينيوم أدى تأثير مضاد لهذا المرض معتمدا على تحسين جميع المعايير البيوكيميائية المدروسة و خصوصا نشاط خلوي محافظ تجاه النسيج البنكرياسي و من ثمة الحفاظ على الأنسولين.

و في الختام، تبين الدراسة لنا أن عنصر السيلينيوم ذو فعالية مضادة لداء السكري و تجنب مضاعفاته و بالخصوص أمراض القلب و الشرايين المتعلقة بمرض السكري.

: مرض السكري، الإجهاد التأكسدي، السيلينيوم، المعايير البيوكيميائية،

ABREVIATIONS ET CONSTANTES

μ mol	Micromoles
•OH	Radical hydroxyle
1O₂	Oxygène singulet.
4-HNE	4-hydroxy-2-nonéal.
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADN mt	Acide Désoxy ribo Nucléique mitochondrial.
ADP	Adénosine diphosphate
AG	Acide gras
AGE	Advanced Glycation End Products: (produits de glycation avancés)
ATP	Adénosine triphosphate
BHT	Butyl hydroxy toluene
BSA	Sérum albumine bovine
Ca²⁺	ion calcium
CAT	Catalase.
CDNB	1-chloro, 2,4-dinitrobenzène
CO₂	Dioxyde de carbone
Cu	Cuivre.
Cu/Zn-SOD	Superoxyde dismutase aux ions cuivre et zinc.
DNT	Diabétique non traité
DT ins	Diabétique traité par insuline
DTNB	Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman.
DTSe	Diabétique traité par sélénium
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique acid.
EOA	Espèces Oxygénées Activées.
ERN	Espèces Réactives de l'azote
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène.
FAS	Fatty acid synthase
G6PDH	Glucose-6-phosphate déshydrogénase.
GPx	Glutathion peroxydase
GRase	Glutathion réductase
Grx	Glutarédoxine

GSH	Glutathion réduit
GST	Glutathion –S- transférase
H2O2	Peroxyde d'hydrogène.
HDL	Hight density lipoproteins (lipoprotéines de haute densité)
HE	Hématoxyline éosine
HO	Hème Oxygénase
Hsp	Heat shock protein
L• :	Radical libre lipidique
LDL	Low density lipoproteins (lipoprotéines de basse densité)
LOO•	Radical peroxyde d'acide gras
LOOH	Lipopéroxyde d'acide gras
LPO	Lipides Peroxydés
MDA	Malondialdéhyde
MGO	Méthyl glyoxal
Mn-SOD	Superoxyde dismutase associée au manganèse.
NADPH	Nicotinamide-adéninedinucléotide- phosphate réduit.
NO	Monoxyde d'azote
NOX-2	NADPH oxidase 2
O2•-	Radical superoxyde (anion superoxyde).
PKC	Proteine Kinase C
Prx	Peroxy rédoxine
PTG	Produits Terminaux de Glycation
PUFA	Poly Unsaturated Fatty Acids
Se	Sélénium
SeCyst	Sélenocystéine.
SeMet	Sélenométhionine.
SOD	Superoxyde dismutase.
STZ	Streptozotocine
TBA	Thiobarbituric acid: L'acide thiobarbiturique
TCA	Trichloroacétique.
TS	Témoin sain
TTSe	Témoin traité par sélénium
U	Unité enzymatique.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 01 : Structure de l'alloxane tétra hydraté ou 5-5' acide di-hydroxy barbiturique tri hydraté	03
Figure 02 : Les six voies de production d'ERO par le glucose	04
Figure 03 : Principales sources des Espèces Réactives de l'Oxygène (endogènes et exogènes) et des systèmes antioxydants.....	06
Figure 04 : Production cellulaire des espèces réactives d'oxygénées (ERO) et défense antioxydante enzymatique	07
Figure 05 : Synthèse mitochondriale du NO	08
Figure 06 : Réactions de la peroxydation lipidique	09
Figure 07 : Structure chimique du MDA.....	13
Figure 08 : Structure chimique du 4-HNE	13
Figure 09 : Structure chimique du MGO.....	14
Figure 10 : Métabolisme du MGO	15
Figure 11 : Distribution des antioxydants dans la cellule	17
Figure 12 : Interaction entre les sélénoenzymes et autres enzymes antioxydantes pour l'élimination des radicaux libres	19
Figure 13 : Interaction entre les systèmes des thioredoxines, des glutaredoxines et du glutathion	21
Figure 14 : Rôles anti-stress des hèmes oxygénases (HO-1)	21
Figure 15 : Cycles réactionnels de régénération des antioxydants.....	25
Figure 16 : Métabolisme cellulaire du sélénium.....	27
Figure 17 :Schéma récapitulatif de protocole expérimental.....	33
Figure 18 : Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique	45
Figure 19(A et B) : Etude de l'évolution du poids corporel chez le lot témoin et les lots traités pendant 21 jours de	49
Figure 20 : Evolution du poids relatif du foie (g/100g PC) chez les rats témoins et traités après 21 jours du traitement.....	50

Figure 21 : Evolution du poids relatif du cœur (g/100g PC) chez les rats témoins et traités après 21 jours du traitement.....	50
Figure 22 : Evolution du poids relatif des reins (g/100g PC) chez les rats témoins et traités après 21 jours du traitement.....	50
Figure 23 : Evolution du poids relatif des testicules (g/100g PC) chez les rats témoins et traités après 21 jours du traitement.....	51
Figure 24 : Variation de la concentration sérique du glucose chez le lot témoin et les lots traités.....	52
Figure 25: Variation du taux de l'insulinémie chez le lot témoin et les lots traités.....	52
Figure 26 : Variation de l'activité enzymatique de la G6PDH chez le lot témoin et les lots traités.....	52
Figure 27 : Variation de la concentration sérique en urée et créatinine chez le lot témoin et les lots traités.....	53
Figure 28 : Variation du taux sérique de la bilirubine totale et directe chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours de traitement.....	53
Figure 29: Variation du taux de magnésium chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours de traitement.	54
Figure 30 : Variation de la cholestérolémie chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours du traitement.....	55
Figure 31 : Variation de la concentration sérique du cholestérol HDL chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours du traitement.....	55
Figure 32 : Variation de la concentration sérique du cholestérol HDL chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours du traitement.....	55
Figure 33: Variation de la concentration sérique des triglycérides chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours du traitement.....	56
Figure 34 : Variation de la concentration sérique des lipides totaux chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours du traitement.	56

Figure 35 : Variation de l'activité enzymatique des transaminases chez les rats témoins et traités après 21 jours de traitement	57
Figure 36 : Variation de l'activité enzymatique de la PALc chez les rats témoins et traités..	57
Figure 37 : Variation de l'activité enzymatique de l' amylase chez les rats témoins et traités après 21 jours de traitement.....	57
Figure 38 : Variation de la teneur hépatique en glycogggène chez les rats témoins et traités après 21 jours de traitement.....	58
Figure 39 : Variation de la teneur en glutathion (GSH) dans les organes (Foie, rein, cœur et testicules) chez les rats témoins et traités après 21 jours de traitement.....	60
Figure 40 : Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) dans les organes (Foie, rein, cœur et testicule) chez les rats témoins et traités après 21 jours de traitement.....	61
Figure 41 : Variation l'activité enzymatique de la glutathion -S- transférase (GST),dans les organes (Foie, rein, cœur et testicule) chez les rats témoins et traités après 21 jours de traitement.....	62
Figure 42 : Variation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) dans les organes (Foie, rein et cœur) chez les rats témoins et traités après 21 jours de traitement.....	63
Figure 43 : Variation de la teneur en Malondialdéhyde (MDA) dans les organes (Foie, rein, cœur et testicule) chez les rats témoins et traités après 21 jours de traitement....	64
Figure 44 : Coupes histologiques : (A) du foie d'un rat diabétique non traité (DNT) montrant les hépatocytes à l'état normale , (B) rein d'un rat DNT montrant les cellules rénales à l'état normal, (C) ; testicule d'un rat diabétique non traité (DNT) montrant les cellules à l'état normal (100X, 400X).....	66
Figure 45 : Coupes histologiques du pancréas du rat témoin (A), témoin traité par sélénium (B), diabétique non traité (C), diabétique traité par insuline (D) et diabétique traité par sélénium (E) coloration HE 100X et 400X.	67
Figure 46 : Formation d'adduit 4-HNE-Lysine de la G6PDH	71

TABLEAUX

Tableau 01: Composition de l'alimentation pour 1 kilogramme d'aliment (ONAB).....	30
Tableau 02: Variation du poids corporel PC (g) et du poids relatif PR (g/100g de poids corporel) des organes (foie,cœur, reins et testicules) chez les rats témoins et traités après 21 jours de traitement.....	48
Tableau 03 : Variation de la concentration sérique du glucose, insuline, urée, créatinine, bilirubine totale et directe, le magnésium et l'activité de l'enzyme glucose 6 phosphate déshydrogénase chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours de traitement.....	51
Tableau 04 : Variation de la concentration sérique du cholestérol T, HDL-C, LDL-C, triglycérides et les lipides totaux chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours de traitement.....	54
Tableau 05 : Variation de l'activité enzymatique des transaminases (TGO, TGP), phosphatase alcaline (PALc) et l' amylase sérique chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours de traitement.....	56
Tableau 06: Variation de la teneur hépatique en glycogène chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours de traitement.....	58
Tableau 07 : Variation de la concentration du glutathion (GSH), Malon di aldéhyde (MDA), l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx), glutathion -S- transférase (GST), catalase (CAT) dans les organes (Foie, rein, cœur et testicule) chez les rats témoins et traités après 21 jours de traitement.....	59

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	01
-------------------	----

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Diabète.....	03
1.1. Diabète induit par l'alloxane.....	03
1.2. Toxicité du glucose : glucotoxicité et radicaux libres.....	04
1.2.1. Formation d' céto aldéhyde.....	04
1.2.2. Activation de la voie des protéines kinases C.....	05
1.2.3. Formation des composés dicarbonylés et la glycation.....	05
1.2.4. Voie des polyols.....	05
1.2.5. Métabolisme des hexosamines.....	05
1.2.6. La phosphorylation oxydative	05
II. Rappel sur les radicaux libres et les systèmes antioxydants.....	06
2.1. Espèces réactives de l'oxygène.....	06
2.2. Espèces réactives de l'azote.....	07
2.3. Atteintes cellulaires.....	08
2.3.1. La peroxydation lipidique.....	08
2.3.2. Oxydation des protéines.....	09
2.3.3. Atteinte de l'ADN.....	10
2.4. Biomarqueurs du stress oxydant.....	11
2.4.1. Définition d'un biomarqueur.....	11
2.4.2. Différents types de biomarqueurs de l'oxydation cellulaire.....	12
2.4.2.1. Biomarqueurs de l'oxydation lipidique.....	12
a. Malondialdéhyde.....	13
b. 4-hydroxynonéanal.....	13
c. Méthylglyoxal.....	14
2.5. Défenses anti oxydantes.....	17
2.5.1. Défenses anti oxydantes enzymatiques.....	17
2.5.1. 1. Superoxyde dismutase.....	17
2.5.1.2. Catalase.....	18
2.5.1.3. Glutathion peroxydase.....	18
2.5.1.4. Glutathion réductase.....	19

2.5.1.5. Glutathion-S- transférase.....	19
2.5.1.6. Peroxyredoxine.....	19
2.5.1.7. Glutaredoxine.....	20
2.5.1.8. Thioredoxine réductase.....	20
2.5.1.9. Hème oxygénase.....	21
2.5.1.10. Cofacteurs réduits.....	22
2.5.2. Molécules anti oxydantes.....	22
2.5.2.1. Molécules anti oxydantes endogènes.....	23
A. Glutathion.....	23
B. Ubiquinol et cytochrome C.....	23
C. Autres composés endogènes.....	23
2.5.2.2. Molécules anti oxydantes exogènes.....	24
A. Vitamines A, E et C.....	24
B. Métaux.....	24
III. Sélénium	
3.1. Propriétés physico-chimiques.....	25
3.2. Utilisation industrielle du sélénium.....	26
3.3. Apports alimentaires et besoins en sélénium.....	26
3.4. Métabolisme du sélénium.....	26
3.5. Importance biologique de sélénium.....	27
3.5.1. Action anti oxydante du sélénium.....	28
3.5.2. Autres rôles biologiques.....	28
3.6. Toxicité du sélénium.....	29

DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

I. MATERIEL ET METHODES	
A. Animaux.....	30
B. Protocole.....	30
1. Conditions d'élevage.....	30
2. Traitement des rats.....	31
3. Sacrifice et prélèvement d'organes.....	31
C. Paramètres analysés et méthodes	34
1. Glucose.....	34

2.	Insuline.....	34
3.	Glucose-6- phosphate deshydrogénase.....	35
4.	Urée.....	35
5.	Créatinine.....	35
6.	Bilirubine totale & directe.....	36
7.	Magnésium.....	36
8.	Cholestérol total.....	37
9.	Cholestérol HDL.....	37
10.	Cholestérol LDL.....	38
11.	Triglycérides.....	38
12.	Lipides totaux.....	39
13.	Aspartate amino transférase.....	39
14.	Alanine amino transférase.....	40
15.	Phosphatase alcaline.....	40
16.	amylase.....	41
17.	Glycogène hépatique.....	41
18.	Préparation de l'homogénat et dosage des paramètres du stress oxydatif.....	42
19.	Glutathion.....	42
20.	Protéines tissulaires.....	43
21.	Glutathion peroxydase.....	43
22.	Glutathion-S- transférase.....	44
23.	Catalase.....	45
24.	Malondialdéhyde.....	45
D.	Etude histologique.....	46
E.	Etude statistique.....	47
II.	RESULTATS	
A.	Etude du poids corporel et poids relatif des organes.....	48
B.	Etude des paramètres biochimiques sanguins.....	51
C.	Etude des paramètres biochimiques tissulaires.....	58
D.	Etude histologique.....	65
III.	DISCUSSION.....	68
A.	Effet du sélénium sur le poids corporel et le poids relatif des organes	69
B.	Effet du sélénium sur les paramètres biochimiques sanguins.....	71
C.	Effet du sélénium sur les paramètres biochimiques tissulaires.....	75

D. Effet du sélénium sur l’histologie des organes.....	77
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	78
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	80
ANNEXES.....	100

INTRODUCTION

Depuis la découverte des radicaux libres et de leurs espèces dérivées, par les chimistes du caoutchouc du début des années 1940, l'existence de ces entités dans l'organisme vivant a amené la biologie à prendre en compte leurs rôles. Ces radicaux libres sont des espèces chimiques à très forte réactivité, capables d'oxyder une très grande variété de biomolécules dans l'organisme. (*Harman, 1956*),

Heureusement ! L'organisme est doté de défenses intrinsèques dites anti-oxydantes - complétées par l'apport alimentaire -, en charges de détruire les radicaux libres, car pas moins de 2 kg/an d'anion superoxyde (radical mitochondrial) sont générés chez l'individu sain (*Halliwell et Gutteridge, 1999*). On parle de stress oxydant lorsque la cellule ne parvient plus à gérer ces entités, c'est à dire lorsque le niveau de production des radicaux libres est excessif par rapport aux défenses, ou que les défenses sont insuffisantes par rapport à la quantité des radicaux libres. Selon l'intensité du stress oxydant et le type cellulaire, les conséquences biologiques du stress oxydant sont donc extrêmement variables : tandis que de légers stress augmentent la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens facilitent l'apoptose, et les stress massifs provoquent la nécrose voire la lyse cellulaire. Ce stress oxydant est impliqué dans presque toutes les grandes pathologies de notre siècle (cancer, diabète, maladies cardio-vasculaires, etc.) (*Gutteridge, 1993*).

Au cours de diabète l'hyperglycémie entraîne une production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN), laquelle induit un stress oxydant, altère l'expression génique, les signaux de transduction, et active les voies de mort cellulaire programmée ou apoptose (*Vishwanath et al., 1986*), ainsi que la glycation des protéines est accélérée et est impliquée dans la pathogénèse des complications chroniques (*Hunt, 1994*). Depuis la découverte de l'hémoglobine glyquée in vivo (*Bookchin et Gallop, 1968*), la glycation de nombreuses protéines (collagène, albumine...), et de plusieurs enzymes (SOD, GSSG-réductase, GPx1...) à été mise en évidence (*Adachi et al., 1991 ; Blakytyn et Harding, 1992 ; Muruganandam et al., 1994*). Une forte concentration de glucose conduit non seulement à la formation des ERO (*Guigliano et al., 1995*), mais aussi à l'altération des systèmes de défense cellulaire tels que la GSSG-réductase (*Blakytyn et Harding, 1992*), la GPx1 (*Muruganandam et al., 1994*)...par ailleurs, le taux de GSH est diminué chez les diabétiques (*Thomas et al., 1985 ; Coleman et Rystioni, 1999*). N'oublions pas les produits de la peroxydation lipidique qui peuvent réagir avec les macromolécules biologiques et plus

particulièrement les protéines ce qui provoque leurs modifications (**Esterbauer et al., 1991 ; Uchida et Stadtman, 1992**).

Partant de ce constat, l'idée originale de notre travail de thèse était d'étudier et d'évaluer, chez des rats de la souche wistar rendus diabétiques suite à l'injection de l'alloxane, l'effet de la supplémentation du sélénium sur l'état du stress oxydant et la prévention des complications diabétiques.

Nous allons pour cela mis au point le dosage des paramètres biochimiques sanguins « glucose, insuline, G6PDH, bilan rénal, bilan lipidique, bilan hépatique », glycogène hépatique ainsi que l'évaluation des paramètres du stress oxydant tissulaires « GSH, GPx, CAT, GST », et un produit de la peroxydation lipidique « MDA ». Nous avons réalisé une étude histologique des organes « foie, reins, pancréas et testicules ».

Afin de comprendre le but de cette étude, la 1^{re} partie de ce travail est consacrée tout d'abord à l'étude succincte du diabète, notamment leur différentes complications, puis aux effets des radicaux libres générés au cours de diabète et le stress oxydant, le système anti oxydant enzymatique et non enzymatique et finalement le sélénium entant qu'anti oxydant. La seconde partie s'intéresse au protocole mis en place et aux résultats obtenus.

PREMIERE PARTIE
RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le diabète

Aucune population n'échappe au diabète, maladie universellement répandue et reconnu comme un syndrome métabolique caractérisé par un trouble de la glycorégulation se manifestant par des hyperglycémies retrouvées à plusieurs reprises dans des conditions basales à jeun ou mises en évidence par des épreuves dynamiques (**Rambert & Forette, 1977**). Cependant, ce syndrome n'est pas défini simplement par l'hyperglycémie à jeun et il n'est pas une simple pathologie monofactorielle, il est plurifactoriel, polygénique lié à différentes altérations métaboliques de différents tissus. L'insulino-résistance du muscle squelettique est reconnue comme l'anomalie primitive au développement du diabète de type 2 et le risque cardio-vasculaire (**Gomila & Dallongeville, 2003**). Le diabète reste de nos jours une maladie chronique grave et à long terme elle devient invalidante par les complications dégénératives cardio-vasculaires qu'elle engendre. Le diabète sucré est de deux types, à savoir le type I dit insulinodépendant ou du jeune, est une maladie auto-immune conduisant à la destruction des îlots de Langerhans produisant l'insuline, par des lymphocytes T et par des auto-anticorps (**Atkinson & Maclaren, 1994**), et le type II dit non insulinodépendant ou de l'adulte, résulte d'une combinaison de différents facteurs héréditaires et acquis. Il est associé à un défaut de sécrétion insulinaire (insulinopénie), à une résistance accrue des cellules de l'organisme à l'insuline (insulino-résistance) (**Weyer & Bogardus, 1999**).

1.1. Diabète induit par l'alloxane :

L'alloxane ou (2, 4, 5,6-tetraoxypyrimidine, 5,6-dioxyuracil) est un agent exerçant une activité cytotoxique sur les cellules (**Lenzen & Panten, 1988**). Comme le produit de sa réduction nommé acide dialurique, l'alloxane établit un cycle d'oxydoréduction avec formation de radicaux superoxydes. Associé à de fortes doses de calcium cytosolique, il provoque la destruction rapide des cellules (**Szkudelski, 2001**). L'action de l'alloxane sur les enzymes peut se manifester par l'inactivation des cofacteurs ou par compétition avec les substrats des coenzymes respectives grâce à l'analogie structurale. Cette molécule est utilisée dans plusieurs espèces afin d'induire un diabète (Rat, Chien) et son utilisation peut être couplée à la streptozotocine, dont l'action est également cytotoxique (**Anderson & Stitt, 1993**).

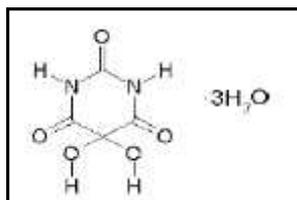


Figure 01. Structure de l'alloxane tétra hydraté ou 5-5' acide di-hydroxy barbiturique tri hydraté (**Mootz & Jeffrey, 1965**)

1.2.Toxicité du glucose : glucotoxicité et radicaux libres

Certaines voies de génération des radicaux libres de l'oxygène sont activées, lorsqu'il existe un trouble de la glycorégulation. Le stress oxydant ainsi engendré pourrait constituer le mécanisme final commun à l'origine des complications oxydatives associées à l'hyperinsulinémie et à l'hyperlipidémie.

Le glucose extracellulaire en excès va majorer la production de radicaux libres de l'oxygène (RLO) à l'origine de dommages au niveau des tissus. Six voies de production d'ERO à partir de ses métabolites sont possibles (**Robertson, 2004a**) (Figure. 2).

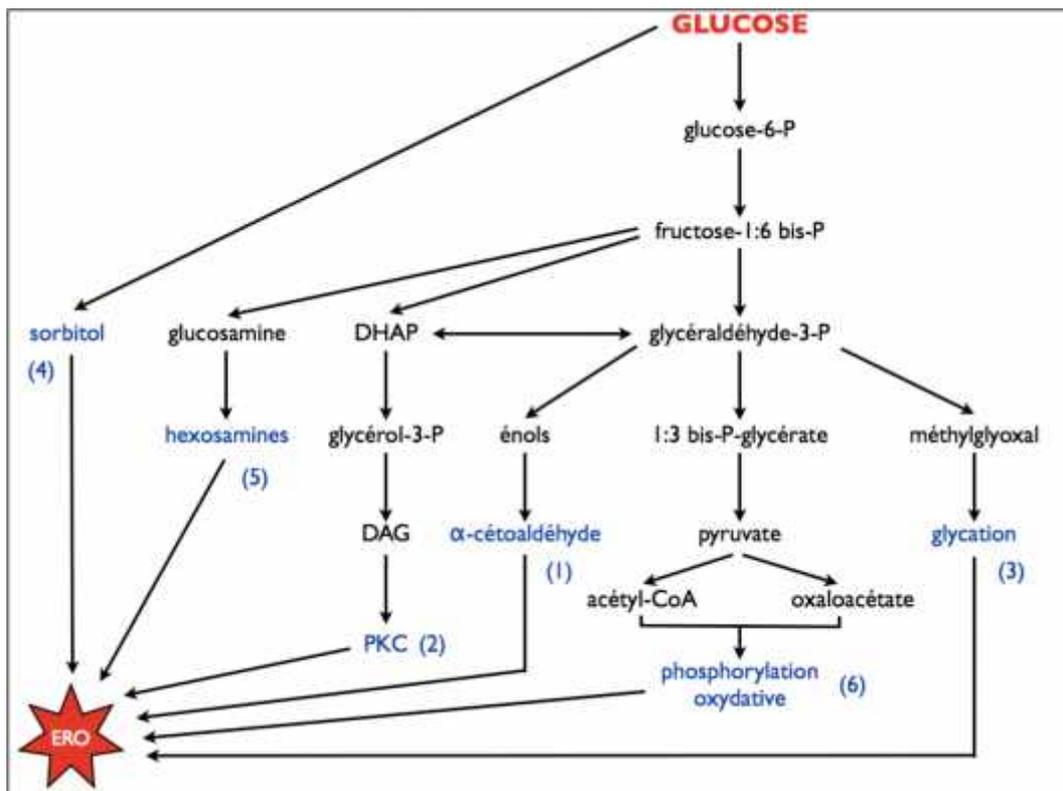


Figure 02. Les six voies de production d'ERO par le glucose (**D'après Robertson, 2004a**).

1.2.1. Formation d' céto aldéhyde

Une première voie alterne à la voie classique du métabolisme du glucose est l'auto oxydation du glycéraldéhyde (Figure. 2, *voie 1*), susceptible de produire des α -cétoaldéhydes qui contribuent à la glycosylation des protéines, et à la production d' H_2O_2 .

La glycation ou glycosylation des protéines est une des conséquences majeures de l'hyperglycémie. Lors de ce mécanisme, les produits d'Amadori et les α -cétoaldéhydes, intermédiairement formés, peuvent céder un électron à O_2 pour générer $O_2^{\bullet-}$ en présence de métaux de transition. D'autre part, ce phénomène de glycation se produit également au niveau des lipoprotéines de basse densité « LDL » ce qui entraîne une augmentation de leur durée de vie plasmatique et donc leur risque de subir une attaque oxydative. Cette susceptibilité des

LDL et des VLDL à l'oxydation en présence de Cu^{2+} a été récemment confirmée chez des patients diabétiques de type I dans le cas où ils présentent une hyperglycémie sévère et/ou des complications vasculaires (**Jain et al., 1998**).

1.2.2. Activation des PKC

Dans une deuxième voie, la di hydroxy acétone-phosphate (DHAP) (*voie 2*) peut être réduite en glycérol-3-phosphate et ainsi augmenter la synthèse *de novo* de diacylglycérol (DAG), lequel active les protéines kinase C (PKC), sources d'ERO.

1.2.3. Formation de composés dicarboxylés et la glycation

L'auto-oxydation du glucose en radical ènediol, catalysée par les ions métalliques entraîne également la formation des dérivés -dicarboxylés (**Wolff & Dean, 1987**). Ces réactifs dicarboxylés (méthylglyoxal, glyoxal, 3-dioxyglucosone) (figure 02, voie 3) réagissent avec les protéines pour former des protéines glyquées intra et extracellulaires (AGE ou produits de glycation avancée), elles-mêmes inductrices d'ERO.

En effet, il a été montré que cette réaction d'auto-oxydation du glucose n'est pas possible lorsque l'on ajoute des chélateurs de métaux (**Wells-Knecht et al., 1995**).

1.2.4. Voie des polyols

En effet, les voies habituelles de métabolisation du glucose (glycolyse et voie des pentoses phosphate) sont dépassées en situation d'hyperglycémie ce qui entraîne l'activation de la voie des polyols ou la formation du sorbitol (*voie 4*). Les conséquences de cette activation sont une baisse des défenses antioxydantes (consommation de NADPH et de GSH) et une accumulation d' H_2O_2 . Cette voie est notamment impliquée dans l'apparition de la cataracte chez le diabétique.

1.2.5. Métabolisme des hexosamines

Le fructose-6-phosphate est dévié vers la formation de glucosamine-6-phosphate puis d'UDP-*N*-acétylglucosamine, précurseur de protéoglycanes et de la formation de protéines glyquées (figure 2, voie 5).

1.2.6. Phosphorylation oxydative

La principale source de production des EROs dans les états hyperglycémiques est la respiration mitochondriale (figure 02, voie 6). En effet, il a été montré que l'hyperglycémie favorise le gradient électrochimique de la membrane interne mitochondriale suite à une activation des donneurs d'électrons Ceci induit en retour une forte production d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ par la cellule endothéliale (**Du et al., 2001**).

2. Rappel sur les radicaux libres et les systèmes antioxydants

Le stress oxydant apparaît dans une cellule quand l'équilibre entre les espèces pro-oxydantes et anti-oxydantes est rompu en faveur de l'état pro-oxydant (Sies, 1991).

Dans les systèmes vivants, une production physiologique d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) se fait de manière continue. Dans des conditions pathologiques ou provoquées par des facteurs exogènes, une surproduction de ces espèces réactives est possible. Les défenses anti-oxydantes, dont une partie est dépendante de l'alimentation, peuvent être insuffisantes pour empêcher les dégâts cellulaires que peuvent causer les radicaux libres oxygénés (Figure 3).

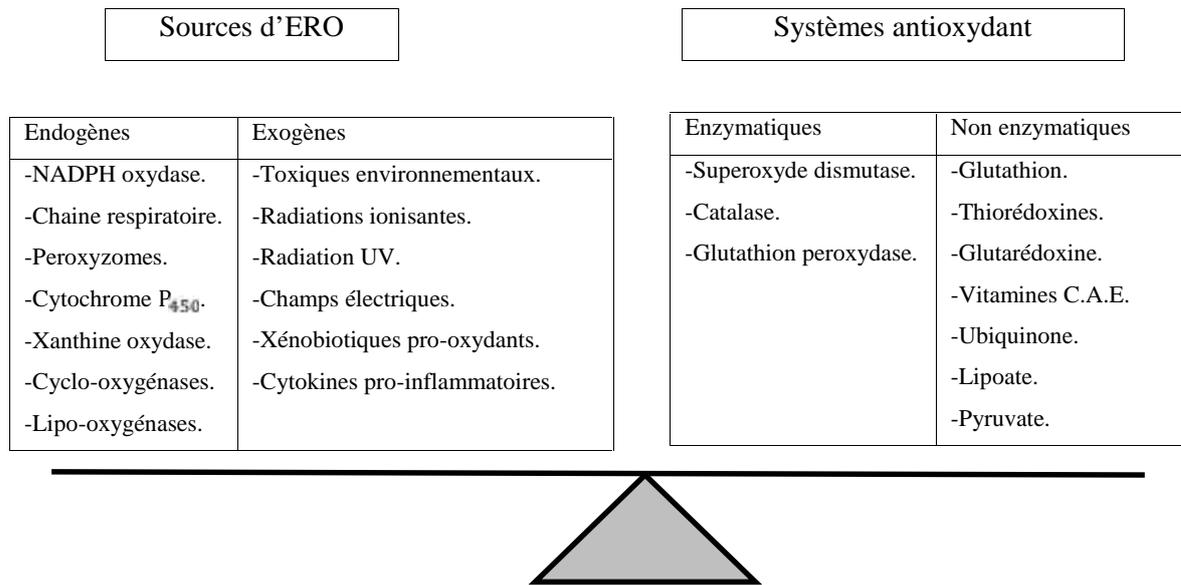


Figure 03. Principales sources des Espèces Réactives de l'Oxygène (endogènes et exogènes) et des systèmes antioxydants (Beaudeau & Vasson, 2005)

2.1. Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO)

Les radicaux libres sont des espèces chimiques possédant un électron célibataire (ou non apparié) sur leur couche périphérique. Le champ magnétique créé par la rotation de cet électron, ou spin, n'est pas compensé par la rotation en sens inverse d'un électron apparié. Cette propriété rend les radicaux libres aptes à réagir avec différentes molécules, dont les composés cellulaires : lipides, protéines et acides nucléiques, notamment lors de réaction en chaînes dont l'exemple le plus connu est celui de la peroxydation des lipides. Les radicaux libres issus de la réduction monovalente de l'oxygène constituent les espèces réactives de l'oxygène.

Les Espèces Réactives Oxygénées (ERO) sont des molécules contenant de l'oxygène, mais dont la réactivité est bien supérieure à celle de la molécule de dioxygène(O₂). Les ERO comprennent des radicaux tels le superoxyde (O₂^o), l'hydroxyle (OH^o), l'oxyde nitrique (NO^o),

et des espèces non radicalaires telles le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , l'oxygène singulet (1O_2) et le peroxyde nitrite ($ONOO^-$) (Figure 4). Le superoxyde et l'hydroxyle sont très instables, au contraire d' H_2O_2 , qui diffuse librement et a une durée de vie plus longue. De nombreux facteurs, tels que des perturbations métaboliques dont l'insulinorésistance et l'hyperglycémie, l'inflammation, des agents physiques, la présence d'oxydants exogènes, peuvent conduire à la formation accrue des radicaux libres (Morel & Barouki, 1999).

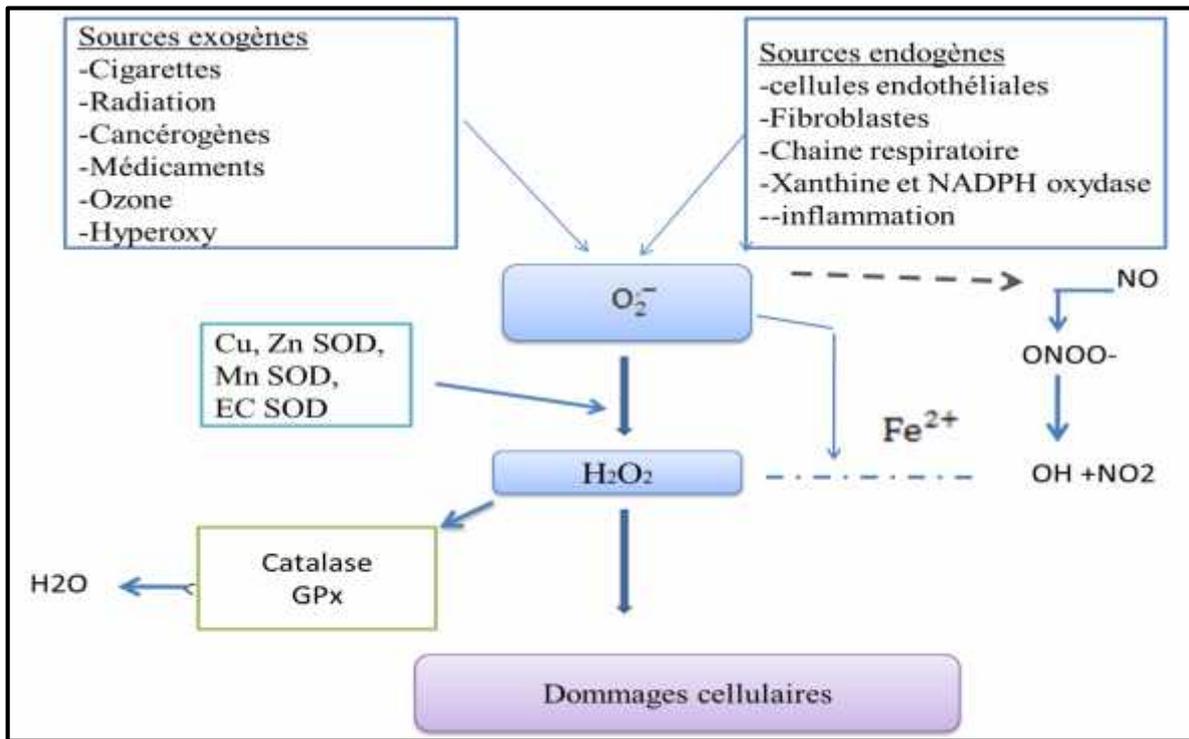


Figure 04. Production cellulaire des espèces réactives d'oxygénées (ERO) et défense anti-oxydante enzymatique (D'après Rahman *et al.*, 2006)

2.2. Espèces réactives de l'azote (ERNs)

Les espèces réactives de l'azote issues du métabolisme de l'azote (via les NO synthases) sont représentées principalement par l'oxyde nitrique (NO^\bullet) qui est un radical, les oxydes de l'azote, comme l'anhydride nitreux N_2O_3 et l'ion peroxyde nitrite ($ONOO^-$). La présence en excès de ces ERNs semble avoir des effets carcinogènes (Cooke *et al.*, 2006).

Le NO^\bullet provient notamment de la réaction catalysée par la NO-synthase mitochondriale (mtNOS) entre l'atome d'azote appartenant à la L-Arginine et une molécule d'oxygène (Ghafourifar & Cadenas, 2005) (voir figure 5).

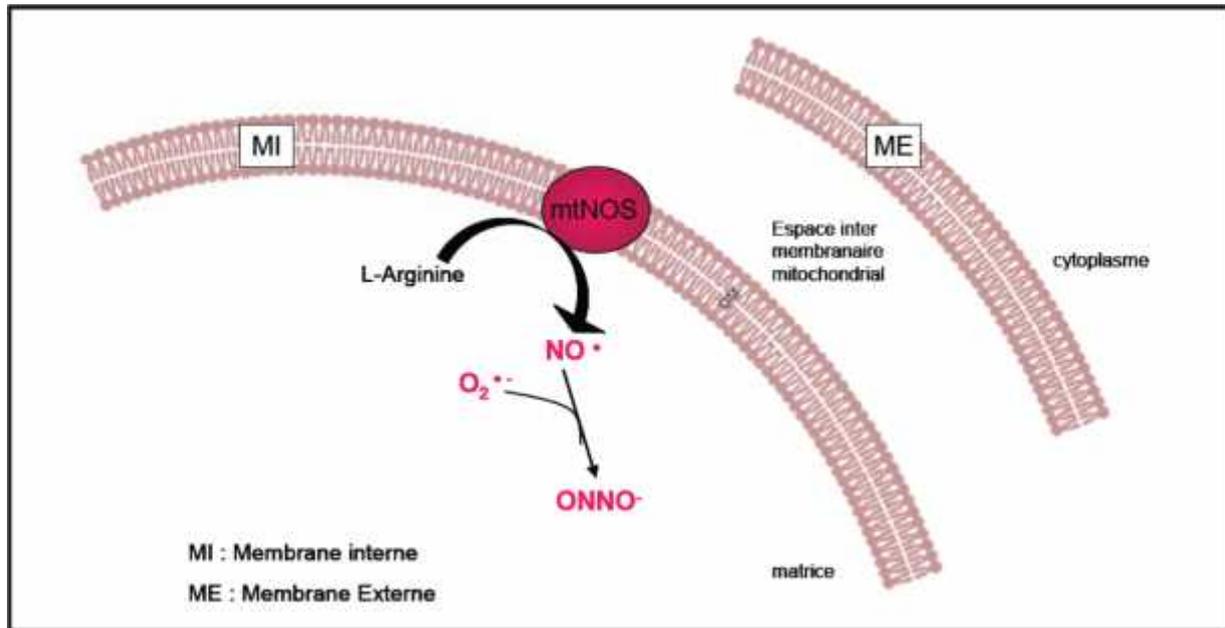


Figure 05. Synthèse mitochondriale du NO (Ghafourifar & Cadenas, 2005).

2.3. Atteintes cellulaires

2.3.1. Peroxydation lipidique

Le stress oxydant concerne tous les constituants cellulaires mais ce sont les lipides qui sont les plus touchés par ce phénomène. La peroxydation lipidique concerne les acides gras polyinsaturés ou estérifiés des membranes cellulaires (ou PUFAs pour « Poly Unsaturated Fatty Acids », exemple des esters de cholestérols, phospholipides et triglycérides), cibles des EROs. Ce phénomène de peroxydation lipidique peut se produire dans des conditions physiologiques et il se trouve exacerbé dans des conditions pathologiques comme l'athérosclérose. La peroxydation lipidique débute par une phase d'**initiation** qui implique l'attaque des espèces réactives (hydroxyles, alcoxyles, peroxydes, oxygène singulet, peroxydinitrite) entraînant l'arrachement d'un hydrogène du PUFA (**LH**). Ceci aboutit à la formation d'un radical pentadiényl qui après addition avec O₂ donne le radical peroxyde (LOO•). Ensuite, ce radical peut réagir avec un autre PUFA et former un hydroperoxyde (**LOOH**), c'est la phase dite de **propagation** de la peroxydation lipidique. Ces hydroperoxydes appartiennent à la famille des peroxydes lipidiques : les LPO. La réaction en chaîne de la peroxydation lipidique peut être prévenue par la vitamine E (- tocophérol) intercalée dans la bicouche lipidique des membranes qui joue le rôle de donneur d'hydrogène. En effet, la vitamine E transforme les radicaux peroxydes en hydroperoxydes et met fin à la

réaction en chaîne de peroxydation des PUFAs. Cette dernière étape est alors désignée comme phase de **terminaison**. Ces réactions sont résumées dans la figure 6.

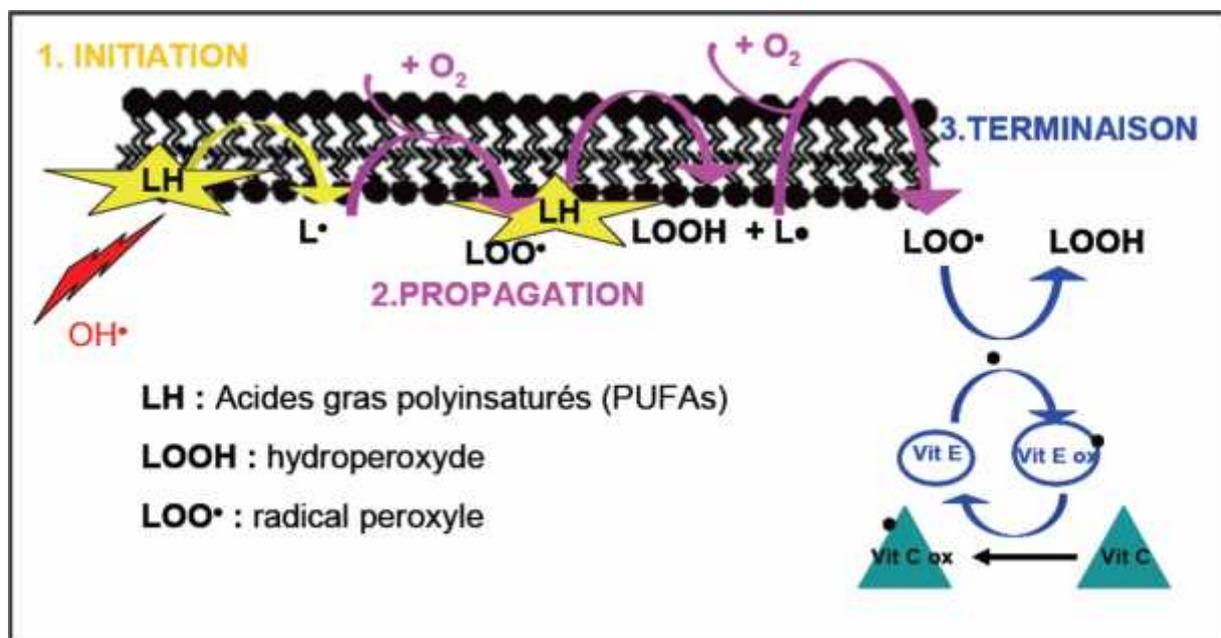


Figure 06. Réactions de la peroxydation lipidique (Niedernhofer *et al.*, 2003).

Les LPO sont susceptibles de se décomposer en produits secondaires c'est-à-dire en aldéhydes très réactifs pouvant être considérés comme des messagers secondaires toxiques qui augmentent les dommages initiaux dus aux radicaux libres. Les plus réactifs vis à vis des bases de l'ADN sont représentés par le malondialdéhyde (MDA), le trans-4-hydroxy-2-nonéanal (4-HNE) et le crotonaldéhyde. Le MDA et le 4-HNE peuvent former des adduits avec l'ADN. D'autre part, le MDA et le 4-HNE réagissent avec des antioxydants comme le GSH entraînant une diminution de la concentration de ce dernier, se traduisant ainsi par une diminution des défenses cellulaires (Niedernhofer *et al.*, 2003).

2.3.2. Oxydation des protéines

Les protéines, au même titre que les lipides, sont également sensibles aux attaques radicalaires. Les plus à risque portent un groupement sulfhydryle (ou thiol : SH) et sont largement répandues dans les familles enzymatiques. L'oxydation induit l'introduction d'un groupement carbonyle dans la protéine (Peng *et al.*, 2000 ; Levine, 2002). Modulées par la présence de métaux de transition (Fe^{2+} , Cu^{2+}) et, selon l'intensité du stress oxydant, les réactions oxydatives peuvent engendrer des modifications des chaînes protéiques de deux types : des coupures de liaisons peptidiques et des ajouts de sous-produits réactionnels

d'oxydation (peroxydation lipidique). Associées au stress oxydant, les nitrosylations sont des phénomènes répandus, et une ERO de type peroxydant est capable de convertir la tyrosine en 3-nitrotyrosine, et d'agir au niveau des résidus tyrosine contenus dans les protéines (**Van der Vliet et al., 1996**).

Lors d'atteintes oxydatives, les altérations structurales occasionnées sur les protéines engendrent leur inactivation et affectent leurs propriétés biologiques. Les protéines peuvent également subir des phénomènes de réticulations, dans lesquels elles tendent à s'agglutiner anormalement au sein des cellules ou à leur périphérie, en raison de leur forte hydrophobie. Notons, enfin, que les protéines oxydées, y compris les enzymes antioxydantes (**Pigeolet et Remacle, 1991**) sont beaucoup plus vite dégradées, car plus sensibles aux actions des protéases et du protéasome (**Dean et al., 1997**). Cytoprotectrices et pouvant intervenir en fonction support aux défenses antioxydantes lors de stress oxydant ; les protéines de stress de type Hsp70 (Heat Shock Protein) aident justement, de part leur rôle de protéines chaperonnes, à la prise en charge des protéines ayant subi des dommages oxydatifs (**Welsh, 1992 ; Essig & Nosek, 1997**).

2.3.3. Atteintes de l'ADN

Avec ses quelques $4 \cdot 10^9$ Paires de bases, l'acide désoxyribonucléique ou ADN, bien que matrice de la composition biochimique de la cellule, est hautement sensible aux ERO ($\bullet\text{OH}$, HNO_2 , ONOO , dérivés d' HOCl). En effet, parmi les milliers d'attaques quotidiennes sur l'ADN, de nombreuses proviennent des radicaux libres (environ 10^4) qui engendrent de multiples altérations génomiques, réparties en au moins cinq grandes classes. Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaires, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines (**Cadet et al., 2002**). Toutes les bases de l'ADN peuvent être endommagées par l'attaque des ERO, mais la plus étudiée est la 8-hydroxy-2' déoxyguanosine (8-OHdG), formée à partir de l'attaque de l'hydroxyle sur la déoxyguanosine. L'attaque radicalaire peut être directe au niveau des bases, selon deux mécanismes : (a) dirigée contre le sucre lui-même, responsable de coupure de chaîne simple brin ; ou (b) dirigée contre les liaisons base/désoxyribose, générant un site abasique. L'attaque radicalaire peut aussi procéder de manière indirecte lorsqu'elle met en jeu des dérivés de peroxydation lipidique tels que les aldéhydes mutagènes, responsables de bases MDA-guanine ou éthéno-dérivées sur l'ADN. Notons que les attaques radicalaires sur les nombreuses protéines en contact avec l'ADN, en charge des processus de lecture (enzymes/facteurs de réplication ou de transcription) ou de défense (histones), entraînent des pontages des protéines ou des adduits sur des bases.

Il est intéressant de se focaliser sur l'ADN mitochondrial (ADNmt) dans le cadre du stress oxydant. En effet, moins équipé en systèmes de réparation (absence d'histone) que ne l'est l'ADN nucléaire, et à proximité directe des sites de production radicalaire, l'ADNmt est un matériel bien exposé au stress oxydant, comme l'atteste la présence 10 à 20 fois plus élevée de marqueurs mutagènes (McCord & Fridovich, 1988). Même si 95% des protéines mitochondriales sont encodées par l'ADN nucléaire, l'ADNmt code pour des protéines de première importance au plan du métabolisme (complexe I, cytochrome oxydase, cytochrome *b*) ou des réparations mitochondriales. Dans une cellule, on compte des centaines de mitochondries et des milliers d'ADNmt ; ainsi, des altérations du génome mitochondrial auront des répercussions dramatiques au plan de la fonction et de l'intégrité tissulaire (Wallace *et al.*, 2008).

Heureusement, le jeu de processus de réparation assure la conservation des séquences respectives des ADN nucléaire et mitochondrial (Turrens, 2003 ; Evans *et al.*, 2004), bien que ces systèmes soient limités en cas de stress oxydant trop important. Dans le cas de dommages irréversibles de l'ADN, on assiste à des perturbations dans les mécanismes de réplication capables de retentir en terme d'erreurs sur la lecture et la synthèse de l'ADN et avec pour conséquences : des mutations génomiques spontanées (de type transversion GC vers TA). Dans les cas d'impossibilité complète de réplication de l'ADN, il y aura initiation de l'apoptose. En conclusion, on admet que les dommages de l'ADN reflètent essentiellement une saturation des systèmes de défenses antioxydantes endogènes et des systèmes de réparation spécifique (Hutter *et al.*, 2007 ; Maiese *et al.*, 2007 ; Rachek *et al.*, 2007).

2.4. Biomarqueurs du stress oxydant

2.4.1. Définition d'un biomarqueur

Le terme de biomarqueur a été transposé de l'épidémiologie moléculaire par les biologistes des radicaux libres pour décrire un changement moléculaire dans une molécule biologique provenant d'une attaque des espèces réactives de l'oxygène, de l'azote et de composés halogénés. Il peut être défini comme toute molécule biologique de l'organisme susceptible de servir de marqueur d'un phénomène physiopathologique (ex : l'inflammation).

Les critères d'un bon biomarqueur peuvent être définis comme suit :

- Un produit majeur de modification oxydative qui peut être directement impliqué dans le développement de la maladie.
- Un produit stable non susceptible d'induction artéfactuelle ou de perte durant la conservation des échantillons.

- Représentatif de la balance entre la génération des dommages oxydatifs et leur élimination.
- Déterminé par une analyse spécifique, sensible, reproductible et robuste.
- Libre des facteurs confondants venant d'une prise alimentaire.
- Accessible dans un tissu cible comme les lymphocytes et cellules mononucléées.
- Mesurable dans les limites de détection d'une procédure analytique fiable.

Ce terme de biomarqueur concerne aussi bien les produits dérivés des lipides que ceux impliquant l'ADN ou les protéines. Les biomarqueurs peuvent apporter des informations sur trois niveaux de progression d'une maladie ; comme des **marqueurs d'exposition** : ex des produits finaux des dommages aux protéines, aux acides aminés, aux lipides oxydés, aux bases oxydées de l'ADN ; comme des **marqueurs fonctionnels** par exemple du flux sanguin ou de l'agrégation plaquettaire ou encore comme des **marqueurs spécifiques** d'une maladie. Il reste encore une étape parfois difficile à établir qui est de définir une association entre le biomarqueur et la maladie (**Griffiths et al., 2002**).

2.4.2. Différents types de biomarqueurs de l'oxydation cellulaire

Lorsqu'une cellule subit une attaque oxydative, ses différents constituants sont touchés de façon plus ou moins importante selon leur localisation. Ainsi, il semble raisonnable d'envisager que les lipides de la membrane seront les premières cibles et que l'ADN enfermé dans le noyau sera le plus protégé.

2.4.2.1. Biomarqueurs de l'oxydation lipidique

Les triglycérides dans les LDL (Low Density Lipoproteins) et les phospholipides des membranes sont fortement sensibles aux attaques des radicaux libres. Le processus de peroxydation lipidique est initié par la formation d'un radical peroxy et se termine finalement par la formation d'aldéhydes (**De Zwart et al., 1999**) Les deux principaux aldéhydes sont le malondialdéhyde (MDA) et le 4- hydroxynonenal (4-HNE).

Durant ce processus de peroxydation, d'autres produits sont formés comme le pentane et l'éthane, les 2-3 diènes conjugués, les isoprostanes et les cholesteroxydes.

Une des méthodes utilisées pour déterminer la quantité de MDA est représentée par le test des « TBA reactive substance » (TBARS) dans lequel l'acide 2-thiobarbiturique (TBA) forme un adduit avec le MDA. Le désavantage de ce test est son manque de spécificité qui entraîne une surestimation du dommage dû aux radicaux libres car d'autres substances réagissent facilement avec le TBA (comme la biliverdine, la méthionine etc...). La spécificité de cette technique a été améliorée depuis par l'utilisation d'une séparation chromatographique

permettant de séparer les différents adduits des autres substances avec le TBA de celui du MDA avec le TBA.

a. Malondialdéhyde (MDA)

Le MDA fait partie des aldéhydes réactifs issus de la décomposition des LPO. En raison de son caractère mutagène et athérogène, il est le produit le plus étudié de la dégradation des LPO (Douki *et al.*, 1996).

Il a été proposé comme biomarqueur du stress oxydant dans l'urine des rats traités avec des agents toxiques pour le foie. Il est sans doute le plus mutagène des produits de la peroxydation lipidique. C'est pourquoi il est considéré comme ayant une implication dans l'initiation des cancers (Cadet *et al.*, 1998). Sa structure chimique est représentée dans la figure 7.

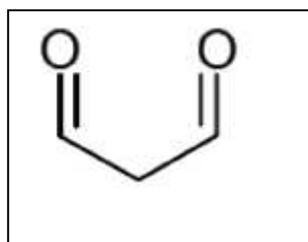


Figure 07. Structure chimique du MDA (Cadet *et al.*, 1998).

Les principales origines du MDA dans les échantillons biologiques proviennent de la peroxydation des acides gras polyinsaturés avec au moins 3 doubles liaisons C=C adjacentes comme par exemple dans l'acide arachidonique (20:4) ou l'acide docosahexaénoïque (22:6). Le MDA peut aussi provenir de la décomposition des LPO plaquettaires ou de la biosynthèse des eicosanoïdes (Helbock *et al.*, 1998).

b. 4-hydroxynonéal (4-HNE)

Le 4-HNE est le produit de la peroxydation lipidique le plus génotoxique (Ravanat, 1998). Dans l'organisme, il se forme en quantités plus importantes que le MDA. Sa structure chimique est représentée dans la Figure 8.

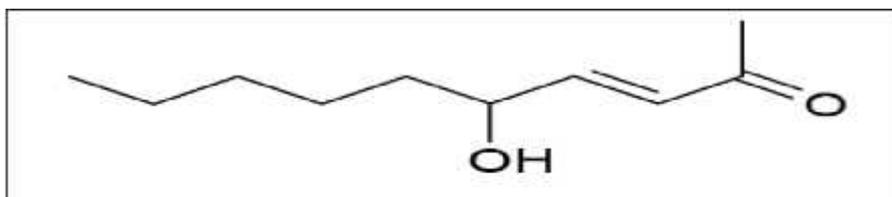


Figure 08. Structure chimique du 4-HNE (Ravanat, 1998)

Le 4-HNE est majoritairement produit lors de la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés en 6, comme les acides gras linoléique (18:2) et arachidonique (20:4). On peut également trouver le 4-HNE dans la nourriture après oxydation des acides gras. Sa méthode

de dosage fait appel à une détection par une méthode colorimétrique. Le 4-HNE est une molécule électrophile qui peut réagir avec de nombreuses protéines (ESCODD, 2002) :

Les effets biochimiques du 4-HNE sont principalement liés à sa réaction avec les groupements thiol et amine. En effet, le 4-HNE peut réagir en milieu neutre avec les groupements thiols comme par exemple ceux du GSH, modifiant ainsi l'état redox de la cellule. D'autre part, il peut activer la voie des MAP Kinases, les mécanismes de détoxification, la réponse inflammatoire ou encore inactiver certaines enzymes (ESCODD, 2003).

c. Méthylglyoxal

D'autres aldéhydes réactifs sont présents dans l'organisme, c'est notamment le cas du méthylglyoxal (MGO). Il appartient à la catégorie des dérivés α -dicarbonylés réactifs. Sa structure chimique est présentée dans la figure 9.

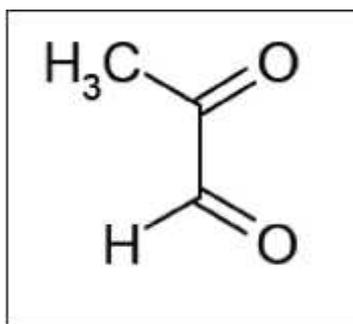


Figure 09 : Structure chimique du MGO

Le MGO peut provenir de nombreuses réactions cellulaires. Il est formé majoritairement lors de la métabolisation du glucose par la voie des trioses-phosphates ou provient du métabolisme des corps cétoniques dans le foie. Il est présent dans de nombreux constituants comme le tabac, le pain grillé, le café ou le whisky.

La littérature rapporte différentes méthodes de dosage du MGO dans le plasma. Parmi ces dernières, une mesure a été effectuée par chromatographie liquide associée à une détection par ultraviolet ; les niveaux de MGO ainsi déterminés sont respectivement de 708 +/- 125 nM (n=29 diabétiques) et de 520 +/- 41,8 nM (n=10 contrôles) (Odani *et al.*, 1999 ; Nemet *et al.*, 2004).

Un récapitulatif des différentes voies de formation du MGO est présenté dans la figure 10.

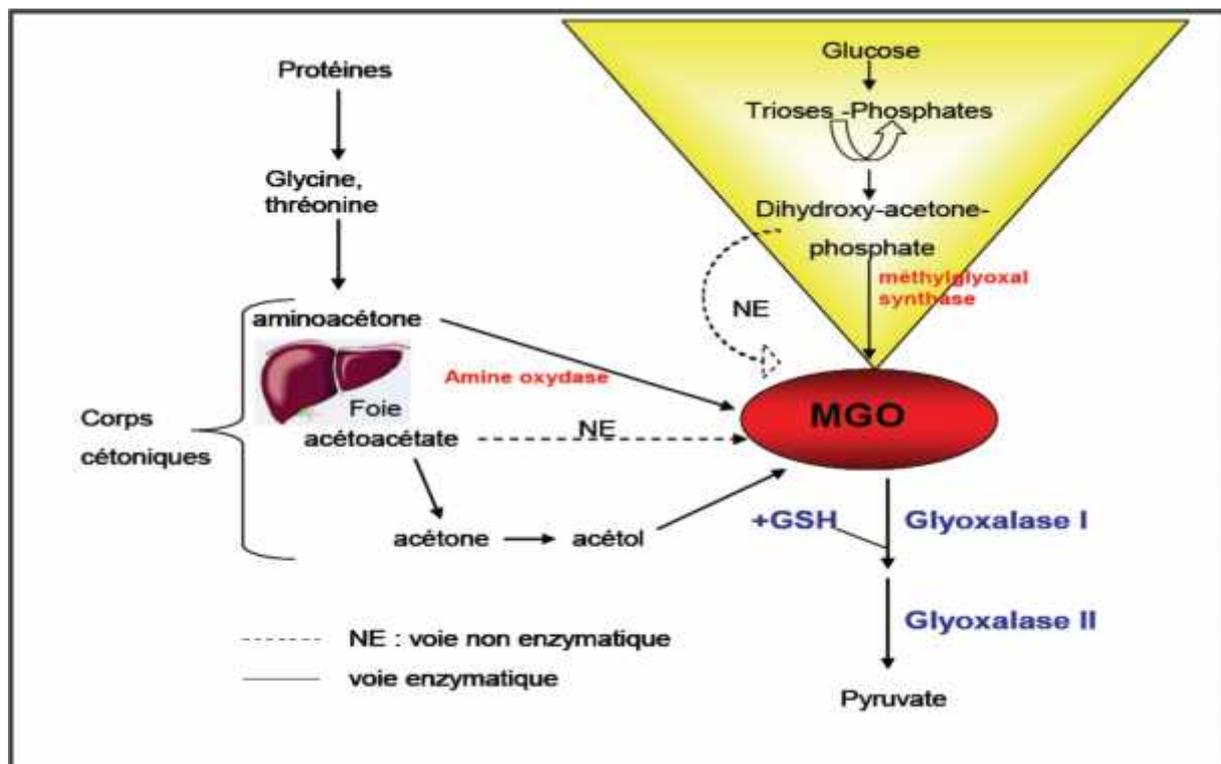


Figure 10. Métabolisme du MGO (Odani *et al.*, 1999 ; Nemet *et al.*, 2004).

Le MGO, tout comme le 4-HNE, peut réagir avec le GSH et le produit de sa réaction est ensuite dégradé par la voie des glyoxalases I et II (enzymes à cofacteur métallique Zn^{2+}). De nombreux microorganismes du tractus gastro-intestinal (comme *Helicobacter pylori*) sont capables de produire la triade MGO/Glyoxalases et GSH.

Lors de l'hyperglycémie, la vitesse de formation du MGO chez les diabétiques dépasse les capacités de détoxification de ce produit par les cellules, via le système des glyoxalases, ce qui explique qu'il se retrouve en excès dans le sang circulant. Chez l'homme, deux études ont permis de mettre en évidence un taux plus élevé de MGO plasmatique chez un groupe de patients diabétiques par rapport à des individus sains (Odani *et al.*, 1999 ; Nemet *et al.*, 2004). De plus, il semblerait que cette augmentation soit plus importante dans le cas du diabète de type I que pour le type II (McLellan *et al.*, 1994). Cette étude a également montré que l'activité des glyoxalases des érythrocytes circulants était augmentée dans le cas des patients diabétiques (type I et II) par rapport à un groupe d'individus sains.

Le MGO participe à la formation des produits de la glycation puisqu'il est l'un des intermédiaires de cette réaction. Une des conséquences principales de l'hyperglycémie observée au cours du diabète est la glycosylation non enzymatique ou glycation des protéines. Celle-ci consiste en une modification post-traductionnelle ubiquitaire. Ce processus se déroule selon trois étapes. La première étape aboutit à la formation d'une base de Schiff par réaction de la fonction aldéhyde d'un sucre réducteur, comme le glucose, avec les résidus aminés de la

protéine, principalement la lysine et la fonction *N*-terminale. Un réarrangement d'Amadori se produit ensuite, atteignant un équilibre après quelques semaines, ces deux étapes aboutissant à la formation des produits de glycation dits précoces ou produits d'Amadori, comme l'hémoglobine glyquée HbA1c. Ces adduits possèdent un groupement cétole, qui, en présence de métaux de transition, peuvent céder un électron à l' O_2 pour générer des radicaux $O_2^{\bullet-}$. Il existe une hypothèse suggérant que les α -oxoaldéhydes seraient formés avant et après la formation des produits d'Amadori (**Thornalley et al., 1999**). Ceci laisse à penser que de courtes périodes d'hyperglycémie seraient suffisantes pour faire augmenter le taux de ces α -oxoaldéhydes.

Une dégradation des produits d'Amadori est possible conduisant à la formation de composés α -dicarbonylés et de désoxyglucosones. Finalement, une série de réarrangements par transfert d'hydrogène, aboutit à la formation des produits terminaux de glycation (PTG) dits produits de Maillard et encore désignés sous le terme d'AGEs "Advanced Glycation Endproducts". Ces derniers ont une durée de vie longue, une pigmentation brune et une fluorescence importante. La pentosidine est une de ces molécules actuellement les plus étudiées.

La formation des produits de Maillard, outre le cas du diabète, est un phénomène accru dans diverses pathologies comme l'insuffisance rénale terminale ou au cours du vieillissement. De plus, d'autres sucres peuvent participer à ces réactions comme le galactose ou le fructose. Les conséquences fonctionnelles de la glycation des protéines peuvent concerner par exemple une altération de leurs activités enzymatiques.

Afin de mieux comprendre les conséquences de cette glycation, il a été proposé de quantifier certains produits pour disposer de marqueurs *in vivo*. C'est pour cette raison que certains PTG sont quantifiés par fluorescence au niveau de prélèvements tissulaires, sériques ou urinaires.

L'implication des PTG dans la pathologie du diabète concerne plus particulièrement ses complications cardiovasculaires (**Bourajjaj et al., 2003**). L'aminoguanidine (pimagedine) est un agent thérapeutique prototype qui empêche la formation des AGEs par réaction avec les dérivés α -dicarbonylés (**Thornalley, 2003**). Ainsi, le MGO serait impliqué indirectement dans les complications cardiovasculaires du diabète. Il a été montré le rôle prépondérant du MGO dans la pathologie du diabète, de part sa possible implication dans la « résistance à l'insuline » évoquée dans le cas du diabète de type II. En effet, **Potier et al (2005)** ont montrés que la réaction de l'insuline avec le MGO donnait lieu à la formation d'un dérivé possédant une activité hypoglycémiant de 40% inférieure à l'insuline. D'autre part, il semble jouer un rôle également dans la cicatrisation des plaies. En effet, l'application d'une crème à base de metformine (un antidiabétique capable de diminuer la formation des AGEs en complexant le

MGO) permet d'obtenir une meilleure cicatrisation, notamment au niveau des lésions du «pied diabétique» (**Ruggiero-Lopez et al., 1999**) D'autre part, comme le MGO est un aldéhyde réactif, sa réaction est donc envisageable avec les bases de l'ADN (**Schneider et al., 1998**).

2.5. Défenses antioxydantes

L'organisme dispose de différents types de défenses antioxydantes face aux EROs générées. Nous considérons d'une part les molécules non enzymatiques représentés par les vitamines C et E, les caroténoïdes, les polyphénols et les oligo-éléments (comme le Zn ou le Se). D'autre part, un système enzymatique endogène détoxifiant composé des superoxyde-dismutases (SOD), des catalases (CAT), des glutathion peroxydases (GPX), des protéines de transport des métaux (ferritine, etc...) et aussi de substances endogènes comme le glutathion (GSH) (**Ham & Liebler, 1995**) (voir figure 11).

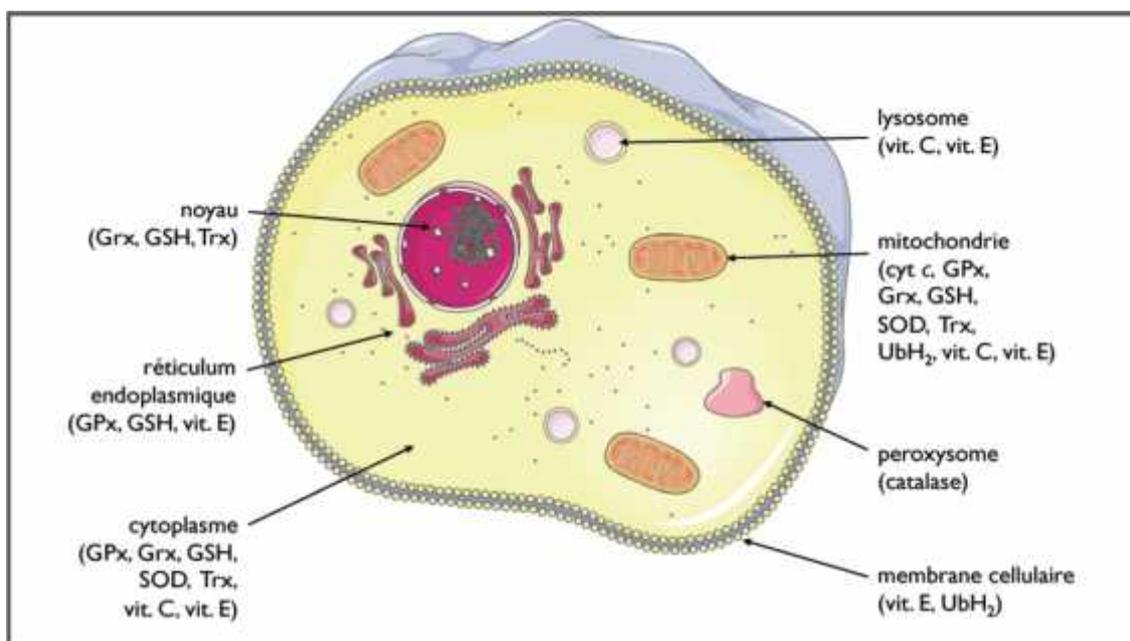
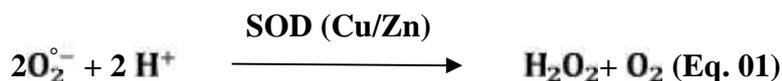


Figure 11. Distribution des antioxydants dans la cellule (**Ham & Liebler, 1995**).

2.5.1. Défenses antioxydantes enzymatiques

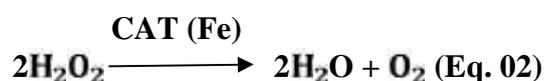
Plusieurs enzymes et systèmes antioxydants endogènes agissent en synergie pour protéger les cellules des dommages oxydatifs. Leur fonction première est d'abaisser la quantité d'ERO ou des produits d'oxydation dans les cellules. Ces enzymes requièrent un ou plusieurs éléments trace (Zn, Cu, Mn, Se, Fe) comme cofacteurs pour leur activité catalytique :

2.5.1.1. Superoxyde dismutases (SOD) : sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et d'oxygène (Eq. 01) (**Zelko et al., 2002**).

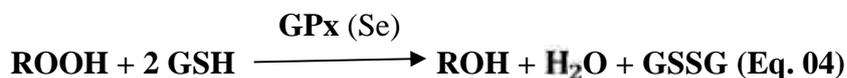
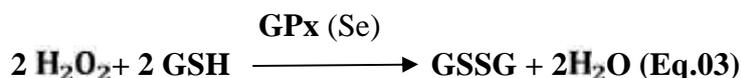


Trois formes de SOD existent chez les mammifères : une forme extracellulaire (Ec-SOD), une forme mitochondriale utilisant le manganèse comme cofacteur (Mn-SOD), et une forme cytosolique utilisant le cuivre et le zinc comme cofacteurs (Cu/Zn-SOD) (Fridovich, 1995).

2.5.1.2. Catalase (CAT) : est une enzyme héminique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Eq. 02). Avec le fer comme cofacteur, la catalase est essentiellement présente dans les peroxysomes hépatiques, mais aussi dans les hématies et les mitochondries de cellules cardiaques (Putnam *et al.*, 2000).



2.5.1.3. Glutathion peroxydase (GPx) : est une séléno-enzyme présente dans le sang, les membranes et le cytosol. En présence de glutathion réduit (GSH), elle réduit l' H_2O_2 en H_2O (Eq 03), les hydroperoxydes (ROOH) en alcools (ROH) (Eq 04), et la dégradation peroxy-nitrite (Eq 05).



Ce qui confère à la GPx une place de choix dans la ligne de défense antioxydante. La GPx, principale enzyme à sélénium (Rotruck *et al.*, 1973), utilise le GSH à titre de cofacteur. Il en existe plusieurs isoformes (Ursini *et al.*, 1995). Elles sont présentes dans le cytosol et la matrice mitochondriale (GPx-1), ou uniquement dans le cytosol (GPx-2), avec toutefois moins d'affinité pour l' H_2O_2 (Mullenbach *et al.*, 1988). D'autres isoformes peuvent être extracellulaires (GPx-3), ou spécifiques de la membrane cellulaire (GPx-4) (Takahashi *et al.*, 1987). La GPx-4 est impliquée spécifiquement dans la réduction des peroxydes lipidiques (Ursini *et al.*, 1999). Il existe aussi une isoforme spécifique des cellules digestives (GIGPx).

2.5.1.4. Glutathion réductase (GRase)

La capacité à régénérer le GSH est cruciale dans le processus de défense antioxydante, elle permet de prévenir une déplétion trop importante en composés thiols dans la cellule (Heffner

& Repine, 1989). L'efficacité de la GPx est liée à un flux constant de GSH, et elle est couplée à l'oxydation du glucose-6 phosphate en 6-phospho gluconate, source de NADPH qui est utilisé comme cofacteur par la glutathion réductase (GRase) pour régénérer le GSH (Eq 06, figure 12).

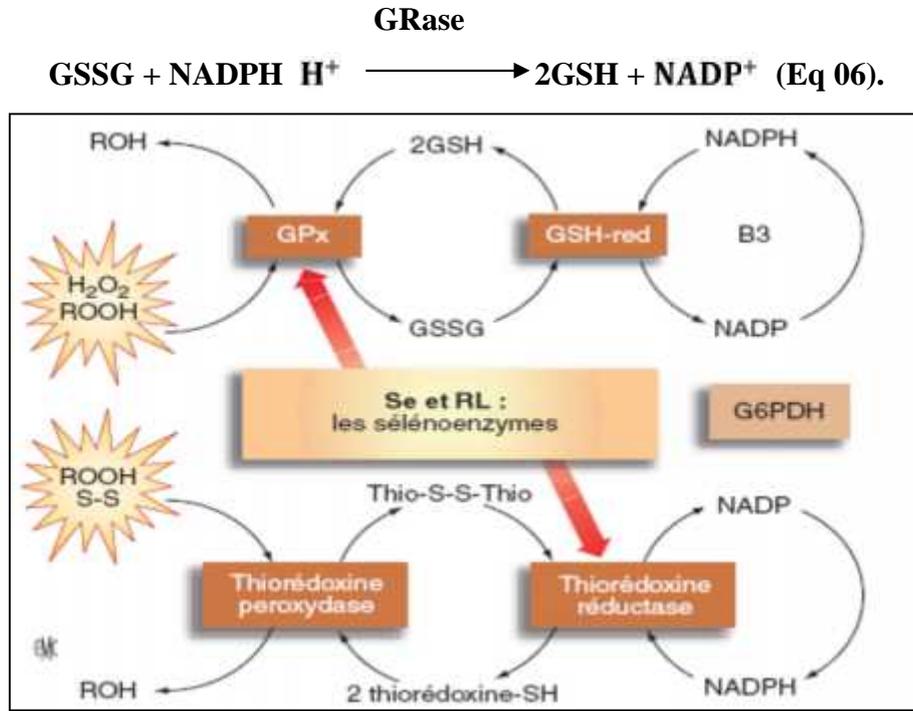
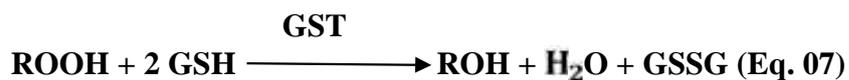


Figure 12. Interaction entre les sélénoenzymes et autres enzymes antioxydantes pour l'élimination des radicaux libres (Roussel & Hininger-Favier, 2009)

2.5.1.5. Glutathion S-transférase (GST) : réduit les hydroperoxydes en alcools (Eq 07), mais ne réduit pas H_2O_2 .



2.5.1.6. Peroxyredoxine (Prx)

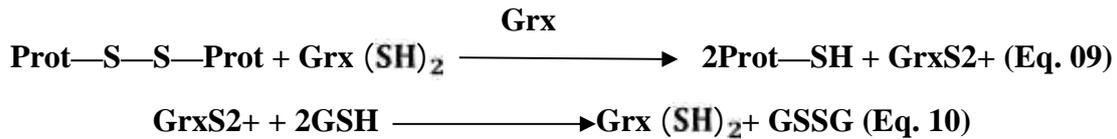
Les peroxyredoxines (Prx) constituent une autre famille de peroxydases constituée de six membres, dont cinq (Prx I-V) possèdent deux sites catalytiques à base de cystéines. Non-séléniques, ces peroxydases réduisent un grand nombre de molécules comme l' H_2O_2 et utilisent la thioredoxine (Trx) comme réducteur (Eq 08). Ces enzymes réduisent également les petites alkyl hydroperoxydes, le peroxydinitrite et les hydroperoxydes dérivés de phospholipides ou d'acides gras. Leurs rôles physiologiques incluent à la fois des fonctions dans la lutte antioxydante et dans la signalisation intracellulaire (Rhee, 2005).



2.5.1.7. Glutaredoxine

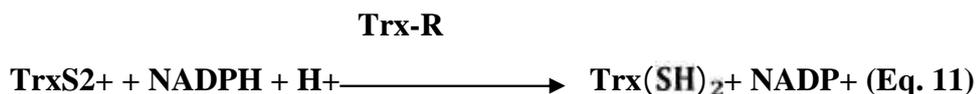
Les glutaredoxines (Grx) sont aussi des dithiols[(SH)₂]-disulfides oxydoréductases dont les fonctions catalytiques requièrent la présence de GSH. Elles catalysent la réduction des protéines disulfures en leurs formes sulfhydryles respectives (Eq. 09). La forme oxydée de la Grx est alors réduite de nouveau grâce aux équivalents réduits du GSH (Eq 10).

La Grx-1 est spécifique du noyau et du cytosol, alors que la Grx-2 est présente dans la mitochondrie (**Rouhier et al., 2001**).



2.5.1.8. Thioredoxine réductase (Trx_{red})

Le système thioredoxine comprend la Trx, la Trx réductase (Trx_{red}) et le NADPH (**Watson, 2004**). Les Trx sont des dithiols[(SH)₂]-disulfides oxydoréductases catalysant la réduction des disulfures en leurs formes sulfhydryles correspondantes (Eq 11) (figure 12). La Trx_{red} est une sélénoenzyme ubiquiste participant au maintien de l'état réduit de la Trx et des autres protéines disulfures. Les Trx interviennent dans bon nombre de phénomènes cellulaires comme la prolifération, l'échange thiol-dithiol entre les résidus cystéine de certains facteurs de transcription clés. La Trx-1 est spécifique du noyau et du cytosol, alors que la Trx2 est présente dans la mitochondrie En faible concentration dans la cellule, comparativement aux autres antioxydants, la Trx exerce probablement ses effets en intervenant comme molécule de signalisation (plutôt que comme agent de détoxification), notamment dans des modulations transcriptionnelles. Les Trx de mammifères sont fonctionnellement associées à la glutarédoxine (Grx_{red}), et des interactions Trx-GSH ont récemment été décrites (figure 13), comme la formation de ponts disulfures entre les deux molécules (**Casagrande et al., 2000**), mécanisme probablement pivot dans la signalisation cellulaire au cours du stress oxydant (**Cummings, 2004**).



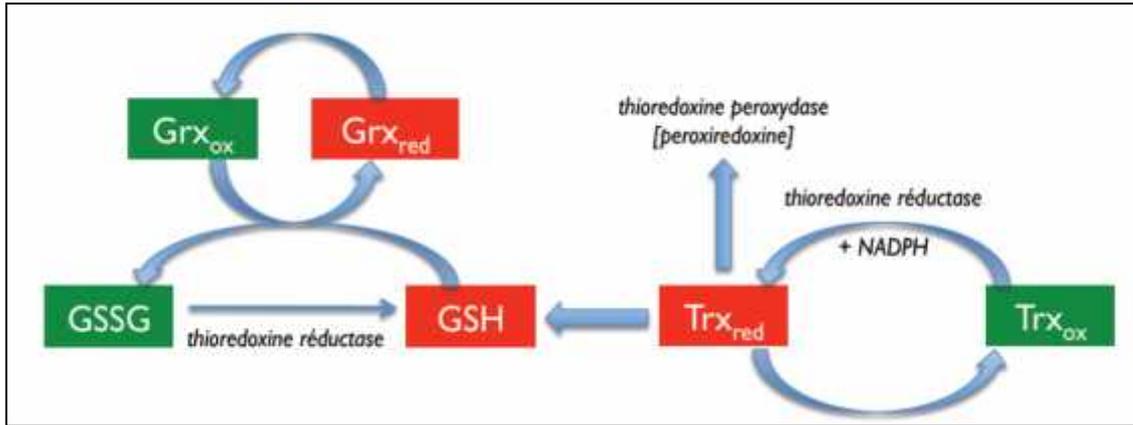


Figure 13. Interaction entre les systèmes des thioredoxines, des glutaredoxines et du glutathion (Casagrande *et al.*, 2000).

2.5.1.9. Hème oxygénase

Protéines redox de petits poids moléculaires, les hèmes oxygénases (HO) sont des membres de la famille des protéines de stress heat shock proteins (HSP, HO-1 est d'ailleurs anciennement appelée heat shock protein 32) (Ryter, 2006 ; Abraham, 2008). Trois isoformes d'HO ont été caractérisées (HO-1, -2, et -3), seule l'isoforme 1 est inductible, les isoformes 2 et 3 étant constitutives. L'HO-1 est fortement activée dans la rate et les autres tissus qui dégradent les globules rouges sénescents. Les HO catalysent la dégradation de la molécule d'hème, potentiellement oxydante, en biliverdine, dans une réaction générant du fer et du monoxyde de carbone (CO) (Figure. 14). La biliverdine est alors réduite en bilirubine aux propriétés antioxydantes en tant que *scavenger* d'ERO. Le CO est quant à lui un vasodilatateur dont les propriétés anti-inflammatoires ont été rapportées récemment.

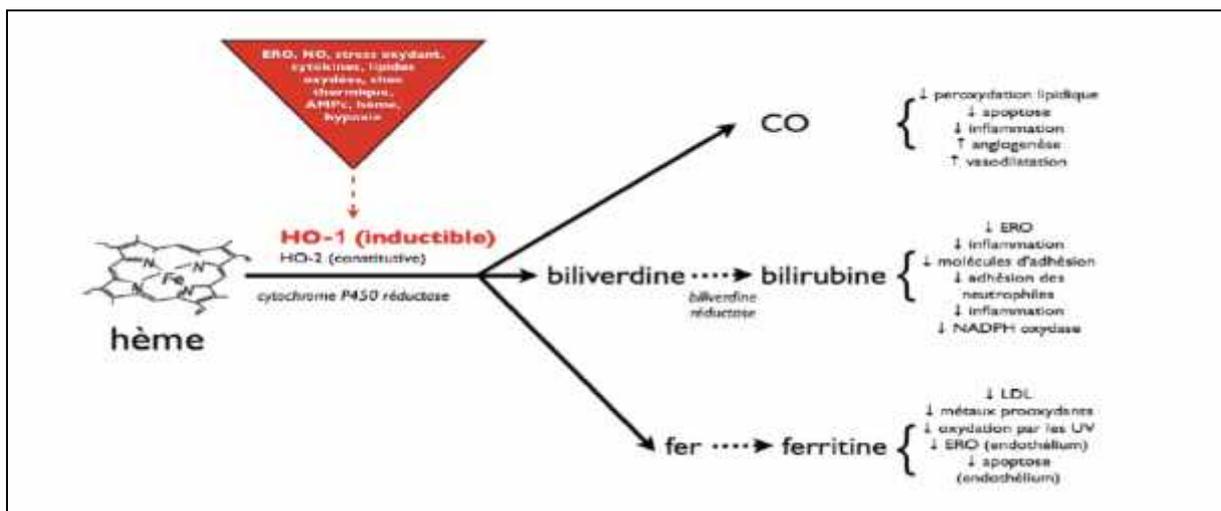


Figure 14. Rôles anti-stress des hèmes oxygénases (HO-1)(Lautier *et al.*, 1992).

Les HO jouent donc un rôle protecteur contre une grande variété de stress impliquant le stress oxydant induit par les ERO, les modulateurs des niveaux de glutathion intracellulaire (**Lautier et al., 1992**), ainsi que l'hyperglycémie (**Jonas et al., 2003**).

2.5.1.10. Cofacteurs réduits

Au travers des systèmes antioxydants décrits ci-dessus (recyclage du GSH et des Trx), nous avons vu que l'équivalent réducteur NADPH occupe une place de choix comme cofacteur des réactions ; il constitue donc un substrat enzymatique extrêmement important dans la lutte antioxydante. Le niveau de NADPH est maintenu par la coopération de quatre systèmes enzymatiques, dont deux dans la matrice mitochondriale :

L'isocitrate déshydrogénase NAD⁺ dépendante et une pyridine nucléotide transhydrogénase ; et trois dans le cytosol : l'enzyme malique, l'isocitrate déshydrogénase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase (**Leverve, 2003**).

2.5.2. Molécules anti-oxydantes :

Les antioxydants non enzymatiques, sont des micronutriments exogènes apportés par l'alimentation ou des constituants endogènes. On distingue les antioxydants hydrosolubles comme le glutathion, l'acide ascorbique (vitamine C), l'acide urique, l'albumine et les antioxydants liposolubles : l'alpha tocophérol (vitamine E), l'ubiquinone (CoQ10), les caroténoïdes.

2.5.2.1. Molécules anti-oxydantes endogènes

A. Glutathion : D'autres composés de petits poids moléculaires, non fournis exclusivement par l'alimentation mais aussi synthétisés par l'organisme, assurent un rôle antioxydant. L'un des plus importants est le glutathion. La cystéine, (acide aminé limitant), ainsi que le glutamate et la glycine sont mobilisés par la sous unité catalytique de la glutamylcystéine ligase (GCLC) et la glutathion synthétase, les deux enzymes limitantes dans la biosynthèse *de novo* de GSH (**Soltaninassab et al., 2000**).

Les principales propriétés biochimiques du GSH lui sont conférées par sa fonction thiol (**Del Corso et al., 2002**). Couplé à sa forme disulfure/oxydée GSSG, le GSH représente le tampon redox le plus important de la cellule, et son équilibre redox (ratio GSSG/2GSH) (Eq. 12) constitue le meilleur indicateur de l'environnement redox de la cellule (**Ostergaard et al., 2004**). Ce ratio est déterminé par les enzymes glutathion peroxydase (GPx) et GRase.



Le potentiel antioxydant du glutathion lui vient de sa capacité à protéger les cellules de presque toutes les ERO (OH[•], 1O₂, H₂O₂, HOCl, ONOO), RO[•], RO₂[•]), en les réduisant

directement, ou indirectement en tant que substrat de la réaction couplée à la GPx (**Evans, 1999 ; Griffith & Mulcahy, 1999**). Outre sa capacité à prévenir la propagation des ERO, le GSH peut réparer les attaques oxydatives sur les groupements thiol de la cystéine (**Dalle-Donne, 2003**).

Dans les conditions physiologiques, l'état redox intracellulaire des thiols est très réduit. La concentration intracellulaire de GSSG avoisine les 1% du pool de glutathion total. En augmentant transitoirement ce ratio, des élévations éphémères d'ERO pourraient jouer sur la signalisation cellulaire (reflétant ainsi un rôle indirect des ERO dans cette fonction) ; des modulations importantes de GSSG seront quant à elles davantage symptomatiques d'état de stress oxydant avéré, plus que des facteurs de signalisation redox physiologiques (**Bunnell & Pacht, 1993**). En dysrégulant l'homéostasie du glutathion (augmentation excessive du rapport GSSG/GSH), diverses sources de stress oxydant modulent, d'ailleurs, les voies de signalisation connectées au statut redox (**Haddad, 2000**). Le glutathion occupe donc une place de pivot cellulaire dans la mise en jeu de voies adaptatives et de défenses.

B. Ubiquinol et cytochrome *c*

À l'instar du cytochrome *c*, l'ubiquinone (ou coenzyme Q10), outre son rôle de transporteur électronique, joue le rôle d'antioxydant dans sa forme totalement réduite (ubiquinol) (**Beyer, 1990 ; Ernster & Dallner, 1995**) ; elle est présente dans toutes les membranes cellulaires (essentiellement dans l'appareil de Golgi et les membranes lysosomales) (**Pobezhimova & Voinikov, 2000**). Cette petite molécule, mobile au niveau de la membrane lipidique, est située dans la région hydrophile de la couche des phospholipides, où elle contribue à l'élimination des peroxydes lipidiques en les inactivant ou en régénérant la vitamine E (**Bindoli et al., 1982; Eto et al., 1992**). Le contenu en ubiquinol dans la membrane interne est très élevé, il excède largement celui des autres transporteurs (d'où la notion de pool d'ubiquinone). Bien que présent dans l'alimentation, l'ubiquinol est lui aussi biosynthétisé par l'organisme. Le cytochrome *c* est présent dans l'espace intermembranaire mitochondrial, il y assure un rôle de *scavenger* en convertissant le superoxyde en oxygène (l'action inverse de la semi ubiquinone)

(**Pereverzev, 2003**). L'électron capté par le cytochrome *c* nouvellement réduit est transféré à l'oxygène *via* la cytochrome oxydase (complexe IV) pour former de l'eau.

C. Autres composés endogènes

Les métallothionéines sont des dérivées métalliques d'une protéine riche en soufre : la thionéine. Ces protéines régulent les concentrations intracellulaires en métaux (cuivre, zinc, cadmium, mercure) en les séquestrant, prévenant ainsi leur circulation sous leur forme libre

pro-oxydante. Induites lors d'intoxications aux métaux notamment, les métallothionéines préviennent donc la mise en place de processus oxydatifs.

Nettement moins connu, l'acide lipoïque est pourtant un coenzyme liposoluble ubiquitaire aux puissantes propriétés antioxydantes. Il est à la fois capable de neutraliser diverses entités radicalaires ($1O_2$, HOCl, ONOO⁻), de chélater les métaux, de régénérer plusieurs types d'antioxydants (vitamines E et C, GSH et ubiquinol), mais aussi de protéger/réparer l'ADN des atteintes oxydatives. Enfin, notons l'acide urique capable d'éliminer un grand nombre d'ERO ($1O_2$, •OH, HOCl, O₃, ONOO⁻, ROO⁻) (**Petersen et al., 2008**).

2.5.2.2. Molécules anti-oxydantes exogènes

A. Vitamines A, E, et C

Nombre de composés antioxydants contenus dans les aliments ont pour caractéristique de piéger les ERO. Ainsi la vitamine E (ou α -tocophérol), la vitamine C (acide ascorbique), l'ubiquinol, les caroténoïdes (β -carotènes, pro-vitamine A), les polyphénols, les alcaloïdes et les phytates stabilisent les radicaux en captant leur électron célibataire (**Kinsky, 1989 ; Bors et al., 1990**). Parmi les ERO inactivés pris en charge par la vitamine C, mentionnons: $O_2^{\bullet-}$, •OH, $1O_2$, HO₂, HOCl, ONOO⁻RO•, RO₂[•] (**Halliwell, 1996**). Malgré son rôle pro-oxydant, en présence d'ions métalliques libres, la vitamine C possède une action antioxydante prédominante dans les conditions basales (**Halliwell, 1990**). La vitamine E est un antioxydant intra et extracellulaire, localisé dans les membranes et les lipoprotéines. Elle élimine les radicaux peroxyles intermédiaires, dérivés de la peroxydation lipidique (**Mukai, 1993**).

Une fois activées, ces "molécules piègeuses" sont dégradées ou réutilisées comme substrats dans des cycles réactionnels de régénération. Cette dernière option cellulaire assure un réapprovisionnement de *scavenger* après destruction des molécules radicalaires, et offre une véritable synergie de défense. Par exemple, la vitamine C et l'ubiquinol recyclent - par réaction de réduction - la vitamine E radicalaire (α -tocophéryl) en vitamine E active (α -tocophérol) (**Packer, 1991**). La vitamine C radicalaire (radical ascorbyl ou acide ascorbique semi-réduit) est quand à elle régénérée de façon purement enzymatique par du glutathion sous sa forme réduite (GSH), lui même régénéré à l'aide de NADPH et de l'enzyme glutathion réductase (GSH-R) (Figure 15).

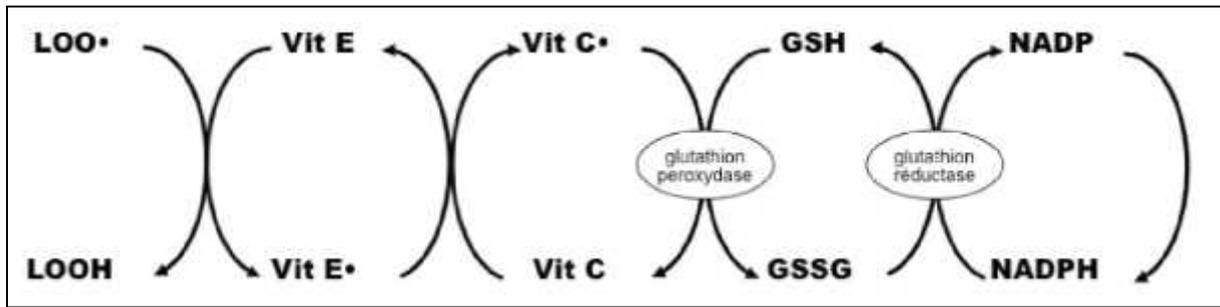


Figure 15. Cycles réactionnels de régénération des antioxydants.

B. Métaux

Malgré leur potentiel pro-oxydant, sous leur forme libre, les métaux se comportent indirectement comme des antioxydants en vertu de leurs propriétés au sein des métallo-enzymes, c'est à dire des enzymes possédant dans leur structure, ou fixant sur certains de leurs sites actifs, des ions métalliques. Par exemple :

Le sélénium est un cofacteur enzymatique essentiel de deux systèmes redox de la cellule, à savoir le glutathion et les thioredoxines (**Ganther, 1999**).

Le stress oxydant peut être considéré comme une réponse biologique entre nos cellules à une agression externe. La production de radicaux libres est présente dans de nombreux phénomènes physiopathologiques : exemple dans le cas de la maladie d'Alzheimer, du diabète, de cancers, de l'athérosclérose, de l'ischémie reperfusion, etc.... De plus, certains médicaments ou traitements thérapeutiques comme la radiothérapie entraînent la formation des radicaux libres. Au cours de notre travail on va étudier l'effet du sélénium en tant qu'antioxydant sur les radicaux libres générés suite à l'hyperglycémie prolongée dans le contexte de diabète de type I.

3. Sélénium

3.1. Propriétés physicochimiques :

Le sélénium (symbole Se, numéro atomique 34) est un métalloïde qui appartient au groupe VI (oxygène, soufre, polonium, tellurium) de la classification périodique. Il ressemble étroitement au soufre (S) par ses propriétés physicochimiques (**Tinggi, 2003; Johansson et al., 2005**).

C'est un élément rare, présent très souvent à l'état de traces et sous plusieurs formes isotopiques. Ses propriétés physicochimiques sont intermédiaires entre celles d'un métal et d'un non métal. Il existe dans les mêmes états de valences que ces éléments (-2, 0, +4, +6) c'est-à-dire sous forme de séléniure (Se⁻), sélénium élémentaire, sélénite (SeO₃⁻), sélérate (SeO₄⁻), ainsi que sous des formes organiques comme séléno di glutathion (G-S-Se-S-G).

Dans l'organisme, le sélénium est présent sous forme de séléniol (R-SeH) ou de sélénoéther (R-Se-R). Il peut également se combiner au soufre (R-S-Se-H ou R-S-Se-S-R) ou s'y substituer pour former de nombreux composés analogues séléniés : sélénométhionine (SeMet) et sélélocystéine (SeCyst) (**Reddy & Massaro, 1983 ; Ducros & Favier, 2004**).

3.2. Utilisation industrielle du sélénium :

Les applications industrielles du sélénium sont nombreuses. Il est utilisé dans la fabrication du verre en tant que colorant rouge sous forme de sélénite d'ammonium, mais également comme agent de décoloration pour neutraliser la coloration des oxydes de fer. Ses propriétés pigmentaires sont également utilisées dans l'industrie des peintures et des plastiques. Dans l'industrie des pneumatiques, il est utilisé pour augmenter la résistance du caoutchouc lors du processus de vulcanisation mais aussi en métallurgie dans la préparation d'alliages et le traitement de surfaces. Ses propriétés photoélectriques sont largement exploitées en électricité et en électronique (fabrication de cellules photo-électriques, de semi-conducteurs, de tambours de photocopieurs...) (**Fishbein, 1991 ; Haygarth, 1994**).

3.3. Apports alimentaires et besoins en sélénium

Le sélénium est essentiellement apporté à l'homme et l'animal par la nourriture et La teneur en sélénium dans l'alimentation dépend de la disponibilité et de l'abondance de cet élément dans l'environnement d'origine (**Tan et al., 1994**). En général ceux sont les aliments protéiques (viandes, poissons, crustacés, abats, œufs, céréales, etc.) qui sont les plus riches en sélénium mais leur biodisponibilité est variable : 20 à 50 % pour les produits de la mer contre plus de 80 % pour les céréales ou la levure de bière. Cependant, pour les céréales, leur teneur en sélénium est très dépendante du contenu en sélénium des sols où elles ont été cultivées. En effet, la teneur de la chaîne alimentaire en cet oligoélément est très géodépendante, selon la nature des sols, leur pH et les techniques de fertilisation (**Dukros et al., 1997**). Les apports nutritionnels conseillés en sélénium définis aux États- Unis en 2000 sont de 55 µg/j quel que soit le sexe, apport qui a été considéré comme suffisant, bien que plusieurs études considèrent qu'un apport de 90 µg soit nécessaire pour obtenir une activité maximale de la glutathion peroxydase plasmatique (**Duffield et al., 1999**).

3.4. Métabolisme du sélénium

L'absorption intestinale du sélénium est élevée (50-95%) et dépend de la forme chimique. Le sélénium absorbé est transporté par des protéines plasmatiques de la circulation pour être distribué dans l'organisme. Certains organes, comme le foie (15%), les reins (5%),

le cerveau (1%) et le pancréas (0,5%), accumulent spécifiquement le sélénium (**Thomson et Stewart, 1974**). Dans le métabolisme du sélénium, le foie constitue une réserve d'échange rapide avec le sang alors que les réserves dans le muscle constituent un stockage d'échange lent (**Simonoff & Simonoff, 1991**).

Le métabolisme du sélénium dépend de la forme chimique ingérée. Le sélénite entre dans les cellules par transport anionique et est rapidement conjugué au glutathion sous forme de sélénodiglutathion. Une partie du sélénium (sous forme de SeCys) va être utilisée pour produire des sélénoprotéines.

L'excrétion du sélénium absorbé se fait sous forme de dérivés méthylés (méthylséléniol, diméthylséléniure et triméthylsélénonium) ou de sélénosucres excrétés principalement dans les urines (60%) et/ou par les poumons (**Ganther, 1999; Ducros & Favier, 2004**) (voir figure16).

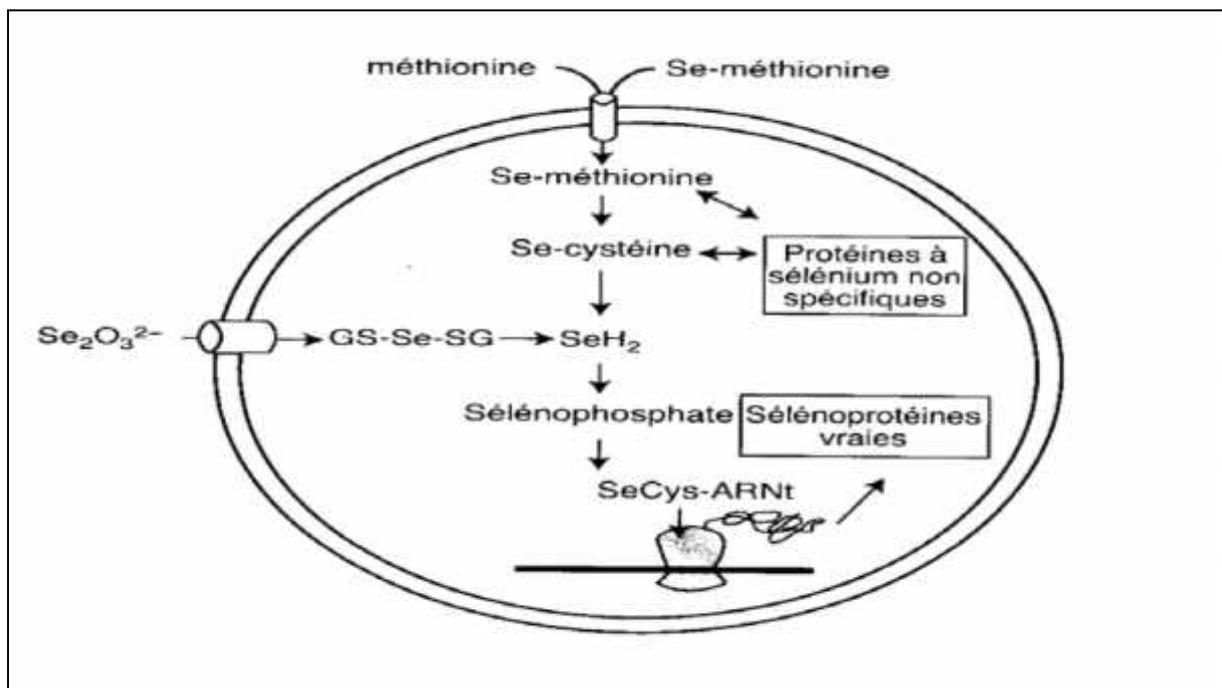


Figure 16. Métabolisme cellulaire du sélénium (**Ducros & Favier, 2004**)

3.5. Importance biologique du sélénium :

Le sélénium est une molécule ambivalente car sa présence en faible concentration est indispensable à la vie pour l'homme, les animaux, les végétaux et les micro-organismes. Des données récentes confirment le rôle majeur que joue le sélénium dans de nombreuses situations physiopathologiques. Une carence modérée en sélénium, surtout lorsqu'elle est

associée à un statut en vitamine E bas, semble accroître la sensibilité à diverses maladies dans lesquelles le stress oxydant est impliqué : maladies cardiovasculaires, maladies inflammatoires, infections virales, maladies neurodégénératives et cancers (**Roussel & Hininger-Favier, 2009**).

3.5.1. Action anti-oxydante du sélénium :

Le sélénium est essentiel pour le fonctionnement d'enzymes antioxydantes tel que :

3. La glutathion peroxydase (GPx) :

La glutathion peroxydase (GPx) contient de sélénium (chaque molécule de glutathion peroxydase contient 4 molécules de sélénium) dans son site actif sous la forme d'un résidu sélénocystéine.

4. Thiorédoxine réductase :

Le sélénium présent également au niveau du site actif de la thiorédoxine réductase sous forme de groupement séléniol (-SeH) où le sélénium joue un rôle fondamental dans la protection contre les radicaux libres (**Tapiero et al., 2003**).

5. Sélénoprotéine P :

Elle est principalement localisée dans le plasma et a la particularité de posséder 10 atomes de Se par polypeptide. Sa fonction n'a pas encore été élucidée (**Ducros & Favier, 2004**). On lui attribue plusieurs rôles : un rôle antioxydant extracellulaire et une activité peroxydase spécifique des phospholipides. La sélénométhionine, acide aminé présent en faible quantité dans les protéines à la place de la méthionine, pourrait également catalyser la réduction du peroxy-nitrite à la place du glutathion, intervenant ainsi dans le stress oxydant (**Klotz et al., 2003**).

3.5.2. Autres rôles biologiques :

- Le Se pourrait inhiber la carcinogénèse, par augmentation de la réponse immunitaire primaire, en protégeant les cellules contre les oxydations aberrantes, et en diminuant la formation de métabolites cancérogènes. (**Simonoff & Simonoff, 1991**).
- Le sélénium est un immuno-modulateur. A dose faible il stimule le système immunitaire, mais à dose élevée, il l'inhibe. A dose physiologique il stimule la formation des anticorps et l'activité de nombreuses cellules immunocompétentes telles que les lymphocytes T auxiliaires, T cytotoxiques, les cellules NK, ... (**Burk, 1994**).
- Le sélénium intervient également dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes. C'est en effet une protéine contenant du sélénium qui catalyse la transformation de la thyroxine T4 en

une T3, laquelle est la forme hormonale active au niveau tissulaire (**Kohrle, 1999 ; Kohrle, 2000**).

3.6.Toxicité du sélénium :

Les cas de sélénose (excès de sélénium) sont moins répandus que ceux liés à une déficience en sélénium. La valeur précise de la dose nocive en sélénium pour les humains est encore incertaine mais cependant, l'organisation mondiale de la santé (OMS) préconise un apport maximum de 400 µg/j par adulte (**World Health Organization et al., 1996**). Il a été proposé en France que la dose limite de sécurité soit réduite à 150 µg/j (**Martin 2000**).

La toxicité du sélénium chez l'homme dépend de sa forme chimique. Mais il n'existe pas à ce jour de consensus sur le degré de toxicité des différentes formes de sélénium. Cependant, d'après l'OMS, les formes inorganiques seraient plus toxiques que les formes organiques. De plus, au sein des formes inorganiques, le sélénite serait plus néfaste que le séléniate (**Dodig & Cepelak 2004**).

Lors d'une intoxication aiguë, la dose létale 50 (entraînant la létalité de 50 % de la population) est estimée entre 0,5 et 1 g sous forme de sélénite ou séléniate de sodium (**Théron et al. 1997**). Ce type d'intoxication entraîne des irritations bronchiques et dermiques, des troubles intestinaux (vomissements, diarrhée, douleur), des troubles cardiaques, une odeur spécifique de la peau et de l'haleine (odeur alliagée), des anomalies des cheveux et ongles, des neuropathies périphériques ainsi qu'une irritabilité et une fatigue exacerbées.

DEUXIEME PARTIE
PARTIE EXPERIMENTALE

I. MATERIEL ET METHODES

L'étude suivante a été menée dans le but de vérifier l'hypothèse suivante : la supplémentation du sélénium sous la forme minérale à un effet positif sur l'élimination des radicaux libres générés au cours de l'hyperglycémie prolongée et qui sont à l'origine des complications de diabète.

Le but de cette étude est d'évaluer, chez des rats de la souche Wistar, les variations des paramètres biochimiques sanguins, enzymes anti oxydantes tissulaires, les produits de la peroxydation lipidique, ainsi que les variations histologiques et ce ci au cours de diabète ; sans traitement, avec traitement par insuline, avec traitement par sélénium.

A. Animaux

Les animaux utilisés dans cette expérience sont des rats mâles *Rattus rattus* de la souche Wistar en nombre de 35 rats provenant de l'institut pasteur, âgés de 04 à 06 semaines d'un poids vif moyen de 160 gr. ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs. Largement utilisés dans divers domaines de la recherche.

B. Protocole

1. Conditions d'élevage :

Ces rats ont été soumis à une période d'adaptation d'un mois environ, aux conditions de l'animalerie; à une température de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ et une photopériode naturelle.

Les rats sont élevés dans des cages en polyéthylène qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée tous les jours jusqu'à la fin de l'expérimentation. Ils ont été nourris avec un concentré énergétiquement équilibré, dont la composition est détaillée dans le tableau 01.

Tableau 01 : Composition de l'alimentation pour 1 kilogramme d'aliment (ONAB).

Matière alimentaire	Quantité en g/kg d'aliment	Pourcentage (%)
Mais	620	62
Soja	260	26
Phosphate	16	1.6
Cellulose	10	1.0
Minéraux	10	1.0
Vitamines	10	1.0

2. traitement des rats

Ces rats ont été répartis en cinq (05) lots égaux à raison de sept (07) rats par lot, il s'agit :

Lot I ou Témoin sain (TS) : rats témoins ont reçu une eau physiologique par injection intra-péritonéale par jour pendant 21 jours.

Lot II ou Témoin Traité par Sélénium (TTSe) : rats témoins ont reçu le sélénite de sodium (Na_2SeO_3) par voie orale à une dose de 2 mg/ kg/j pendant 10 jours, puis par voie intra-péritonéale à une dose de 1.89 mg/kg/j pendant 21 jours (Berg et al., 1995).

Lot III ou Diabétique Non Traité (DNT) : rats ont reçu une dose unique d'alloxane ($\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_5$), de 150 mg/kg par injection intra-péritonéale (Rotruck et al., 1973).

Lot VI ou Diabétique Traité par insuline (DTins) : rats ont reçu une injection intra-péritonéale d'alloxane à une dose de 150 mg/kg (Rotruck et al., 1973), puis un traitement quotidien par insuline ordinaire (3UI/100g) par voie intra-péritonéale (Suthagar et al., 2009).

Lot V ou Diabétique Traité par Sélénium (DTSe) : rats ont reçu un prétraitement par sélénite de sodium par voie orale (2mg/kg/j) pendant 10 jours, ensuite une injection intra-péritonéale d'alloxane (150 mg/kg), puis un traitement par le sélénium (1.89 mg/kg/j) pendant 21 jours par voie intra-péritonéale.

3. Sacrifices et prélèvements d'organes :

3.1. Prélèvement sanguin :

Après 21 jours de traitement les 5 lots ont été sacrifiés (par décapitation), le sang est immédiatement recueilli dans deux tubes polyéthylènes étiquetés. L'un contient l'anticoagulant EDTA et l'autre étant sec, ce dernier est centrifugé à 3000 tours/min pendant 10 minutes, les échantillons obtenus ont été stockés au congélateur à -20°C jusqu'à l'analyse. Alors que les tubes à EDTA sont immédiatement transportés dans une glacière au laboratoire d'analyse (Laboratoire d'Analyse Médicale – KACI, Annaba) pour déterminer l'activité enzymatique de l'enzyme Glucose-6-phosphate deshydrogénase (G6PDH).

3.2. Prélèvement des organes :

Les animaux sacrifiés ont été pesés puis disséqués pour le prélèvement de certains organes :

- Le cœur a été pesé puis stocké au congélateur pour le dosage des paramètres du stress oxydant.

- Le foie, reins et testicules ont été stockés selon deux méthodes : la moitié au congélateur pour le dosage des paramètres du stress oxydant, et l'autre moitié fixée dans le formol afin de réaliser des coupes histologiques.
- Le pancréas a été fixé dans le formol pour réaliser des coupes histologiques.

La Figure 17 schématise les différentes étapes du protocole expérimental utilisé.

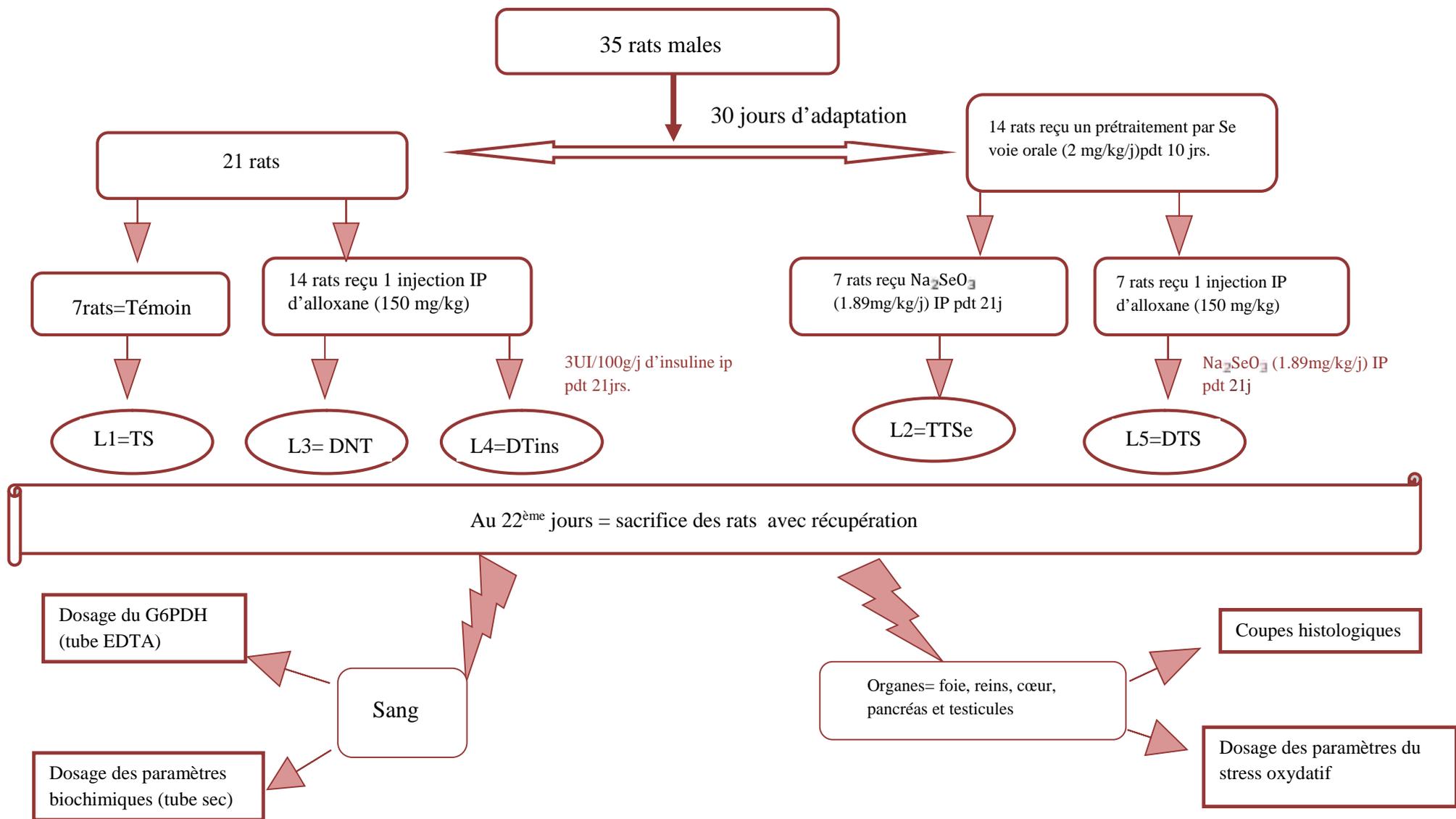
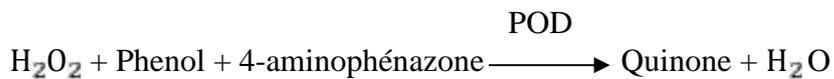


Figure 17. Schéma récapitulatif de protocole expérimental.

A. Paramètres analysés et méthodes

1. Glucose

Les mesures sont réalisées sur du sérum par la méthode à la GOD et la fiche technique Spinreact .Le glucose est transformé par la glucose oxydase (GOD) en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce dernier, en présence de peroxydase (POD), oxyde le chromogène incolore (4-aminophénazone) en un composé coloré en rouge (quinoneimine) (**Kaplan, 1984 ; Trinder, 1969**), selon les réactions suivantes :



Dans un tube sec 10 µl d'échantillon sont ajoutés à 1ml de réactif de glucose [(GOD : 1500 U/L, POD : 1000 U/L , 4 aminophénazone : 2.6 mmol/l) dissout dans un tampon tris pH7.4 contenant 3mmol/l du phénol], incubation à 37°C pendant 10 minutes, lecture contre un blanc réactif à 500 nm avec utilisation d'un étalon.

$$[\text{Glucose}] \text{ (mg/dl)} = \frac{\text{(A) Echantillon}}{\text{(A) Etalon}} \times 10 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

2. Insuline

Le dosage est réalisé sur du sérum par la méthode « sandwich », l'analyseur cobas e 411 et la fiche technique cobas.

Dans une prise d'essai de 20 µl, l'échantillon est mis en présence d'un anticorps monoclonal anti-insuline spécifique biotinylé et d'un anticorps monoclonal anti-insuline spécifique marqué au ruthénium. Il se forme un sandwich. Les microparticules tapissées de streptavidine sont ajoutés dans la cuvette réactionnelle. Le complexe immun est fixé à la phase solide par une liaison streptavidine-biotine. Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant . L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage de ProCell. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur. Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration, celle-ci est générée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en 2 points et une courbe de référence mémorisée dans le code-barres du réactif (**Sapin, 2003**).

3. Glucose -6- phosphate déshydrogénase

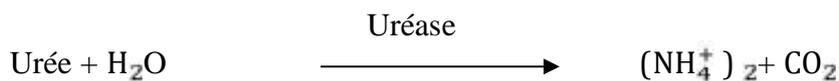
Les mesures sont réalisées sur le sang total sur EDTA selon la fiche technique RANDOX.

L'activité enzymatique de la glucose-6- phosphate déshydrogénase (G6PDH), dans les érythrocytes est déterminée par la production de NADPH à 340 nm et à 37°C en utilisant l'analyseur Monza(Lohr & Waller, 1974).

4. Urée

Le dosage est réalisé sur le sérum par la méthode colorimétrique utilisant l'uréase selon la fiche technique Spinréact.

L'uréase hydrolyse l'urée en ammoniacque (NH_4^+) et le dioxyde de carbone (CO_2). Les ions NH_4^+ réagissent avec le salicylate et l'hypochlorite (NaClO), en présence de nitroprusside pour former l'indophénol de couleur verte(Kaplan *et al*, 1984),selon les réactions :



Dans un tube sec 10µl d'échantillon sont additionnés à 1ml de réactif 1 [uréase 30000 U/L dissoute dans un tampon phosphate pH=6.7 : 50mmol/l contenant (EDTA : 2mmol/l, salicylate de sodium : 400mmol/l, nitroprusside de sodium : 10mmol/l) , agitation, incubation à 37°C pendant 5 minutes , ensuite 1ml de réactif 2 (hypochlorite de sodium : 140mmol/l, hydroxyde de sodium : 150 mmol/l) est ajouté au mélange, , agitation, incubation à 37°C pendant 5 minutes, lecture contre un blanc réactif à 580 nm avec utilisation d'un étalon.

$$[\text{Urée}] (\text{mg/dl}) = \frac{(\text{A}) \text{Echantillon}}{(\text{A})\text{Étalon}} \times 50 (\text{concentration de l'étalon})$$

5. Créatinine

Ce dosage est basé sur la réaction de la créatinine avec l'acide picrique en milieu alcalin (NaOH) pour donner un composé coloré en rouge selon la réaction de Jaffé (Murray *et al*, 1984) et la fiche technique Spinreact.

100 µl d'échantillon (sérum) sont ajoutés à 1ml de réactif de travail [V/V : R1 : 17.5 mmol/l d'acide picrique + R2 :0.29 mmol/l d'hydroxyde de sodium], agitation, lecture de

l'absorbance (A1) après 30 secondes et après 90 secondes (A2), à une longueur d'onde 492 nm. $A = A_2 - A_1$

$$[\text{Créatinine}] (\text{mg/dl}) = \frac{A \text{ échantillon}}{A \text{ Etalon}} \times 2 (\text{concentration de l'étalon})$$

6. Bilirubine Totale et Directe

La bilirubine réagit avec l'acide sulfanilique diazoté à pH acide pour produire l'azobilirubine. Cette réaction est instantanée avec la bilirubine directe (la bilirubine conjuguée), par contre avec la bilirubine totale (bilirubine non conjuguée) elle est indirecte nécessite la solubilisation par le diméthylsulfoxyde (DMSO). (En absence de DMSO, seule la bilirubine directe réagit). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de la bilirubine dans l'échantillon (**Malloy et al., 1937 ; Kaplan et al., 1984**), selon la fiche technique Spinreact.

R1(BD) : 30mmol/l d'acide sulfanilique + 150 mmol/l d'acide hydrochlorique. R2 (BT) : 30mmol/l d'acide sulfanilique + 150 mmol/l d'acide hydrochlorique + 7mmol/l DMSO. R3 : 29 mmol/l de nitrite de sodium.

Pour les deux dosages la réaction se fait en présence d'un blanc échantillon contenant le réactif de travail (R1 ou R2) avec 100 µl d'échantillon. Alors que le tube essai contient en plus de réactif 1 ou 2 et échantillon (sérum) le R3 (50µl). Agitation, incubation pendant 05min à Température ambiante, lecture à une longueur d'onde = 555nm.

$$[\text{Bilirubine}] (\text{mg/dl}) = \frac{(A) \text{Echantillon} - (A) \text{ blanc échantillon}}{(A) \text{ étalon} - (A) \text{ blanc étalon}} \times [\text{étalon}]$$

Facteur de conversion : $\text{mg/dl} \times 17.1 = \mu\text{mol/L}$

7. Magnésium

Les mesures sont réalisées sur le sérum par une méthode colorimétrique selon la fiche technique Spinreact .Ce dosage est basé sur la réaction du magnésium avec le Magon sulfonate en milieu alcalin formant un complexe coloré(**Farrell &Kaplan, 1984**).

Dans un tube sec 10µl d'échantillon (sérum) sont additionnés à 1ml de réactif de travail (bleu de xylidyl : 0.1 mmol/l, acide thioglycolique : 0.7 mmol/l, DMSO : 3mol/l), agitation,

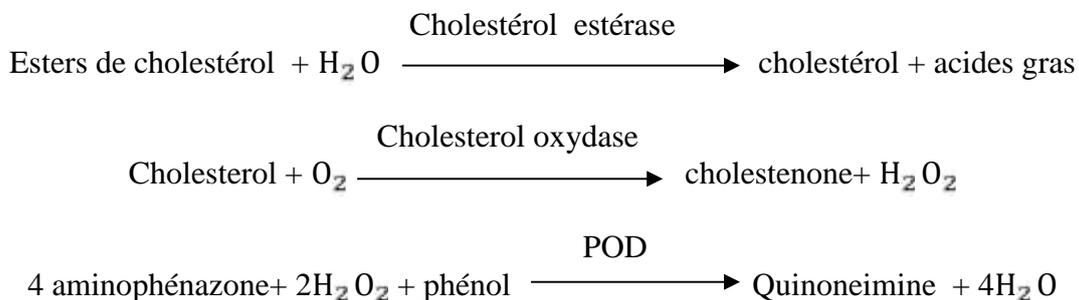
incubation à température ambiante pendant 05minutes. Lecture de la densité optique à $\lambda = 546$ nm contre un blanc réactif avec utilisation d'un étalon.

$$[\text{Mg}^{++}] \text{ (mg/dl)} = \frac{\text{(A) Echantillon}}{\text{(A) Etalon}} \times 2 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

8. Cholestérol

Méthode colorimétrique selon la fiche technique Spinreact .

Le cholestérol présent dans le sérum se transforme en composé coloré selon les réactions suivantes (Naito & Kaplan, 1984) :



Dans un tube sec 10 μ l d'échantillon (sérum) sont additionnés à 1ml de réactif de travail [R2 (Cholestérol estérase: 300 U/L, Cholestérol oxydase: 300 U/L, Peroxydase (POD) : 1250U/L, 4- aminophénazone: 0.4 mmol/l) dissout dans le tampon ; R1(PIPESpH6.9 : 96 mmol/l, phénol : 26 mmol/l)], agitation, incubation à 37°C pendant 05minutes. Lecture de la densité optique à $\lambda = 505$ nm contre un blanc réactif en utilisant un tube étalon.

$$[\text{Cholestérol}](\text{mg/dl}) = \frac{\text{(A) échantillon}}{\text{(A) étalon}} \times 200 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

Facteur de conversion : mg/dl x 0.0258 = mmol/L

9. Cholestérol HDL

Les lipoprotéines de très basse densité (VLDL), et de basse densité (LDL) présentent dans le sérum ou le plasma sont précipitées par le phosphotyngstate en présence des ions magnésium. Après centrifugation le surnageant contient les lipoprotéines de haute densité (HDL). Cette fraction (HDL-C) est déterminée en utilisant le réactif et le protocole de dosage du cholestérol total(Naito & Kaplan, 1984 ; Grove, 1979).

Dans un tube sec 100 μ l de réactif de précipitation des LDL et VLDL (acide phosphotyngstique :14 mmol/l, magnésium chloride : 2 mmol/l) sont additionnés à 1ml de

sérum. Agitation puis incubation pendant 10min à température ambiante, centrifugation à 4000 t/min (rpm) pendant 20 min. le surnageant est utilisé comme échantillon pour le dosage du cholestérol T = HDL-c.

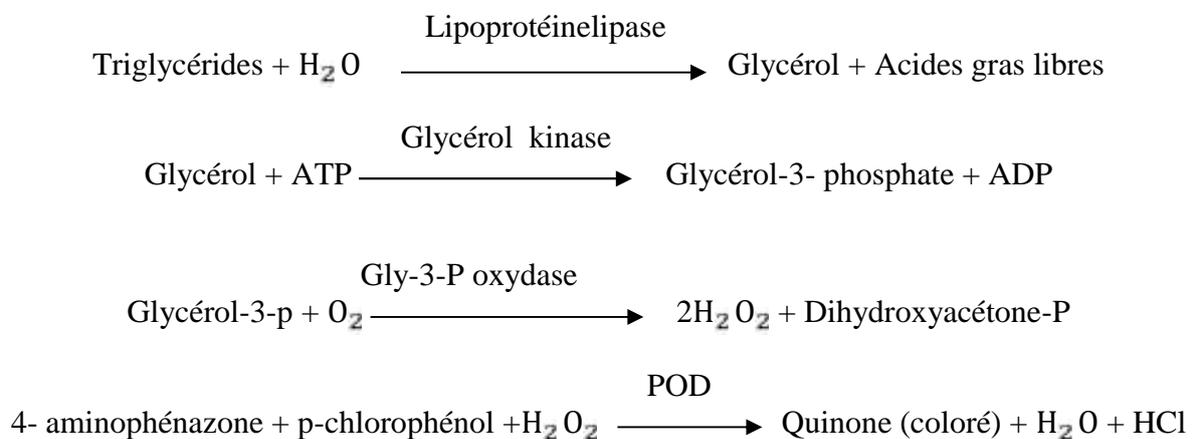
10. Cholestérol LDL

Le calcul de LDL-Cholestérol est effectué par la formule de Friedewald (Friedewald *et al.*, 1972).

11. Triglycérides

Détermination quantitative des triglycérides sériques par une méthode enzymatique colorimétrique à la GPO- POD selon la fiche technique Spinreact.

Hydrolyse des triglycérides par les lipoprotéinelipases (LPL) avec libération du glycérol et acides gras libres. Le glycérol est converti en glycérol-3- phosphate et adénosine di phosphate ADP par la glycérol kinase et l'ATP. Le G3P est converti par GPDH en dihydroxyacétone phosphate et H_2O_2 . Ce dernier réagit avec le 4- aminophénazone et p-chlorophénol en présence de peroxydase (POD) pour donner une coloration rouge selon les réactions (Buccolo, 1973) :



Dans un tube sec 10µl d'échantillon (sérum) sont additionnés à 1ml de réactif de travail [R2 (Lipoprotéine lipase (LPL) :150 000U/L, Glycérokinase (GK) : 500 U/L, Glycérol-3P-oxydase (GPO) : 2500 U/L, Peroxydase (POD) : 440 U/L, 4- aminophénazone (4-AP) : 0.1 mmol/l, ATP : 0.1 mmol/l) dissout dans le tampon ; R1(GOODpH7.5 : 50 mmol/l, p-chlorophénol : 2 mmol/l)], agitation, incubation à 37°C pendant 05minutes. Lecture de la densité optique à =505 nm contre un blanc réactif en utilisant un tube étalon

$$[\text{Triglycérides}] \text{ (mg/dl)} = \frac{\text{(A) échantillon}}{\text{(A) étalon}} \times 200 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

Facteur de conversion : mg/Dl x 0.0258 = mmol/L.

12. Lipides totaux

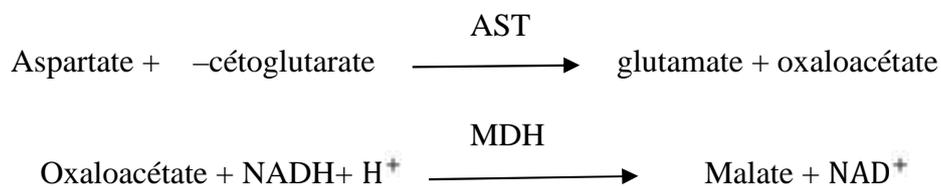
Dosage des lipides sériques par une méthode colorimétrique selon la fiche technique Spinreact. Les lipides insaturés réagissent avec l'acide sulfurique pour former les ions carbonium. Ces derniers réagissent avec le phosphovanilline pour donner une couleur **(Kaplan, 1984)**.

Dans des tubes à essai en verre 100 µl d'échantillon (sérum) sont ajoutés à 2.5 ml d'H₂SO₄. Incubation dans un bain marie à 100°C pendant 10 minutes. Après refroidissement, 50 µl de cet échantillon sont additionnés à 1 ml de réactif (phosphovanilline : 235 mmol/l). Agitation, incubation pendant 15 min à 37°C. Lecture de l'absorbance contre un blanc réactif avec utilisation d'un calibrant.

$$[\text{Lipides T}] \text{ (mg/dl)} = \frac{\text{(A) échantillon}}{\text{(A) calibrant}} \times 750 \text{ (concentration du calibrant)}$$

13. Aspartate aminotransférase (AST)

Méthode cinétique de dosage des transaminases sériques selon la fiche technique Spinreact. L'aspartate aminotransférase (AST) appelée aussi Transaminase glutamate-oxaloacétate (TGO) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH, H⁺ **(Murray, 1984)**:



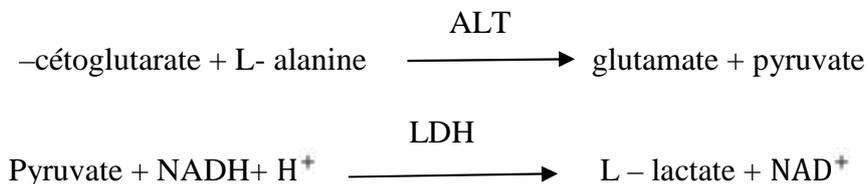
Dans un tube sec 100µl d'échantillon (sérum) sont additionnés à 1ml de réactif de travail [R2 (NADH : 0.18mmol/l, Lactate deshydrogénase : 800 U/L, Malate deshydrogénase(MDH) : 600 U/L, -cétoglutarate: 12 mmol/l) dissout dans le tampon ; R1(TRIS pH7.8 : 80 mmol/l, L-

Aspartate: 200 mmol/l)], agitation, incubation pendant 01 minutes. Lecture de l'absorbance (A) à $\lambda = 340$ nm chaque minute pendant 03 minutes.

$$A/\text{min} \times 1750 = \text{U/L de TGO}$$

14. Alanine aminotransférase (ALT)

Méthode cinétique de dosage des transaminases sériques selon la fiche technique Spinreact. Alanine aminotransférase (ALT) ou Glutamate pyruvate transaminases (TGP) catalyse le transfert réversible de groupement aminé de l'alanine à l' α -cétoglutarate formant le glutamate et pyruvate. Ce dernier est réduit en lactate par l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) et le NADH selon les réactions (Murray, 1984) :



Dans un tube sec 100 μ l d'échantillon (sérum) sont additionnés à 1ml de réactif de travail [R2 (NADH:0.18mmol/l, Lactate deshydrogénase :1200 U/L, α -cétoglutarate: 15 mmol/l) dissout dans le tampon ; R1 (TRIS pH7.8 : 80 mmol/l, L-Alanine: 500 mmol/l)], agitation, incubation pendant 01 minutes. Lecture de l'absorbance (A) à $\lambda = 340$ nm chaque minute pendant 03 minutes.

$$A/\text{min} \times 1750 = \text{U/L de TGP}$$

15. Phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline (PAL) catalyse l'hydrolyse de p-nitrophenyl phosphate à pH 10.4, en libérant p-nitrophenol et le phosphate (Wenger *et al*, 1984), selon la réaction :



La formation de p-nitrophénol est mesurée photométriquement, où elle est proportionnelle à l'activité catalytique de la phosphatase alcaline dans le sérum selon la fiche technique Spinreact.

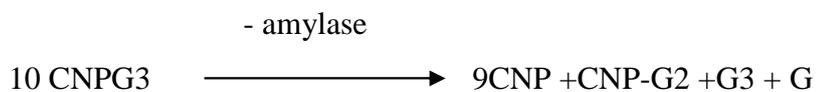
Dans un tube sec 20 μ l d'échantillon (sérum) sont additionnés à 1.2 ml de réactif de travail [R2 (Nitrophénylphosphate : 10 mmol/l), dissout dans le tampon ; R1 (Diethanolamine pH10.4 : 1 mmol/l, Chloride se magnésium :0.5 mmol/l)], agitation, incubation pendant 01

minutes. Lecture de l'absorbance (A) à $\lambda = 405$ nm chaque minute pendant 03 minutes.

$$A/\text{min} \times 3300 = \text{U/L de ALP}$$

16. amylase

L' amylase hydrolyse la 2-chloro-4-nitrophenyl- β -D-maltotrioside (CNPG3) pour libérer 2-chloro-4-nitrophénol (CNP) et 2-chloro-4-nitrophenyl- β -D-maltotrioside, (CNPG2), maltotriose(G3) et glucose(G) correspondant (**Ying Foo, 1998**) selon la fiche technique Spinreact , et la réaction suivante :



CNP- G2: 2- Chloro- nitrophényl- β D maltoside, **G3:** Trimaltose , **G:** Glucose

Dans un tube sec 20 μ l d'échantillon (sérum) sont additionnés à 1 ml de réactif de travail (MES pH 6.0 : 100 mmol/l, CNPG3 : 2.25 mmol/l, Chloride de sodium : 350 mmol/l, acétate de calcium : 6 mmol/l, thiocyanate de potassium : 900 mmol/l, azide de sodium : 0.95 g/l) agitation, incubation pendant 01 minutes. Lecture de l'absorbance (A) à $\lambda = 405$ nm chaque minute pendant 03 minutes.

$$A/\text{min} \times 3954 = \text{U/L d'amylase}$$

17. Glycogènehépatique

Le dosage du glycogène dans le tissu hépatique est réalisé selon la méthode colorimétrique de l'antrone- acide sulfurique(**Hassid & Abraham, 1957**).

100mg de foie de chaque rat sont homogénéisés dans 2 mL de solution de potasse (KOH à 30%).Le mélange est mis dans des glaçons et broyé à l'aide d'un pilon en porcelaine. La suspension résultante est mise dans un bain-marie à 100 $^{\circ}$ C pendant 20min. Après refroidissement, elle est filtrée, puis on ajoute à chaque tube 5ml d'éthanol à 95% ensuite le mélange est gardé à 4 $^{\circ}$ C pendant une nuit. Le précipité est récupéré par centrifugation à 1000 tours/min pendant 15 minutes puis lavé avec de l'éthanol à 80%. Le glycogène ainsi obtenu est séché puis dissous dans 2 ml d'eau distillée.2ml de l'échantillon est additionné à 5 ml de réactif (antrone-acide sulfurique), agitation, incubation au bain marie à 100 $^{\circ}$ C pendant 10 minutes puis refroidissement. Lecture de la densité optique à $\lambda = 620$ nm contre un blanc

réactif contenant de l'eau distillée, la valeur de l'absorbance est calculée puis convertie en équivalent de concentration glycogène à l'aide d'une courbe d'étalonnage établie, avec du glucose, dans les mêmes conditions expérimentales.

18. Préparation de l'homogénat pour le dosage des paramètres du stress oxydatif

Un gramme de foie, rein, cœur ou de testicule de chaque rat des différents groupes étudiés, a été utilisé. Après broyage et homogénéisation des tissus dans le TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4), on a procédé à une centrifugation de la suspension cellulaire (9000 tours/min, 4°C, 15 min), puis le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorfs puis conservés à -80°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydatif.

19. Glutathion

Le dosage du glutathion est réalisé selon la méthode de **Weekbeker & Cory (1988)**. Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercapturique qui résulte de la réduction de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Pour cela on réalise une déprotéinisation (par l'acide sulfosalicylique 0.25%) afin de garder uniquement les groupements (-SH) spécifique du glutathion.

Les échantillons (200mg de foie de chaque animal) sont mis séparément en présence de 8 ml de solution d'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique) à 0.02 M. Le mélange est mis alors dans des glaçons et broyé à l'aide d'un pilon en porcelaine. Une fois préparé, l'homogénat doit subir une déprotéinisation : 0.8 ml de l'homogénat auquel est ajouté 0.2 ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) à 0.25% . agitation, incubation dans un bain de glace pendant 15 minutes. Centrifugation 1000rpm pendant 5 minutes. 0.5 ml de surnageant au quel est ajouté 1 ml de tampon Tris-HCl + EDTA(0.02M) pH 9.6. agitation et addition de 0.025 ml de DTNB à 0.01M dissout dans le méthanol absolu. incubation 5 minutes à température ambiante puis lecture de la DO à $\lambda = 412$ nm.

$$[GSH] = \frac{Do \times 1 \times 1.525}{131000 \times 0.8 \times 0.5} \text{ nM } GSH / mg \text{ Pr } t$$

DO : Densité optique.

1 : Volume total des solutions utilisées de la déprotéinisation (0.8 ml homogénat + 0.2 ml SSA).

1.525 : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant + 1 ml Tris –EDTA + 0.025 ml DTNB)

13100 : Coefficient d'absorbance (contenant le groupement –SH à 412 nm).

0.8: Volume de l'homogénat après déprotéinisation trouvé dans un 1 ml.

0.5 : Volume du surnageant trouvé dans un 1.525 ml.

On note que la concentration de GSH est mesurée par apport à 1 mg de protéine. C'est pour cela que ce dosage doit être accompagné par le dosage des protéines.

20. Protéines tissulaires

La concentration des protéines est déterminée selon la méthode de **Bradford (1976)**. Les protéines réagissent avec un réactif coloré contenant de l'acide ortho-phosphorique, de l'éthanol ainsi que le bleu de coomassie (BBC). Ce réactif réagit avec le groupement (-NH₂) des protéines. L'intensité de la couleur reflète la concentration des protéines. Dans un tube sec 50 µl de l'homogénat sont ajoutés à 2.5 ml de réactif de Bradford. Agitation, incubation 5 minutes à température ambiante puis lecture de l'absorbance à = 595 nm contre un blanc réactif. La densité optique obtenue est rapportée sur la courbe d'étalonnage préalablement tracé (0 – 1mg/ml de sérum albumine de bovin), (Courbe d'étalonnage : voir annexe).

21. Glutathion peroxydase

L'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de **Flohe et Gunzler (1984)**. Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :



Dans un tube sec, 0.2 ml de surnageant est additionnée à 0.4 ml de GSH a 0.1 mM (réaction enzymatique) + 0.2 ml de KNaHPO₄ à 0.067 M (tampon d'extraction pH 7.8). Le tube blanc contient 0.4 ml de GSH + 0.2 ml de KNaHPO₄ (réaction non enzymatique). Incubation au bain marie à 25° C pendant 05 min puis addition de 0.2 ml d H₂O₂(1.3mM) pour initier la réaction. Incubation 10 min. addition de 1ml de TCA 1% T pour arrêter la réaction. Le mélange se met dans la glace pendant 30 min. Centrifugation durant 10 min a 3000t/min. 0.48 ml de surnageant sont placés dans une cuve est additionnés de 2.2 ml de Na₂HPO₄ à 0.32 M + 0.32 ml de DTNB à 1mM. Mesure de la densité optique à 412 nm dans les 05 min. La détermination (calculé) de l'activité de la GPx se fait de la façon suivante :

Activité de GSH consommée / min / gr de protéine

Blanc = 0.04 micro mole de GSH réduit ----- DO_b

Extrait = 0.04 // // -----DOe

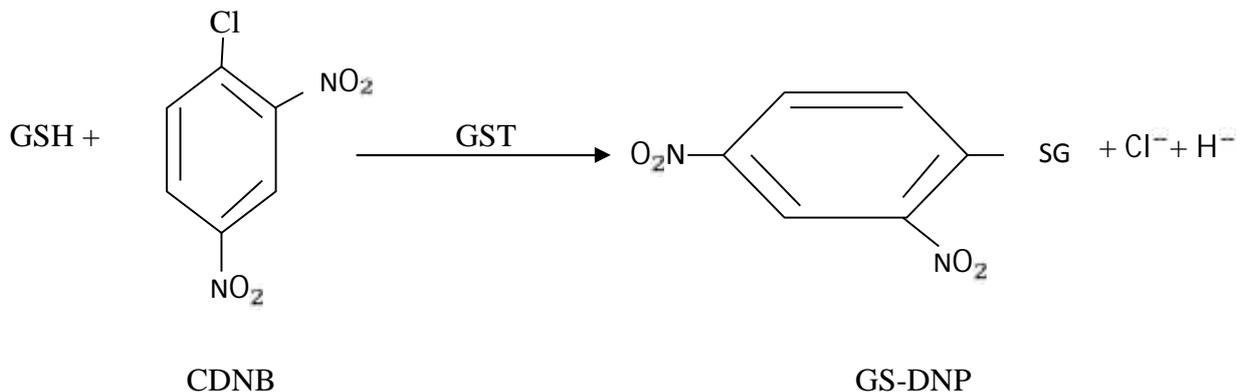
Donc la concentration de GSH réduit qui sera oxydée (disparue) = DOe -DOb

$$X = \frac{(DOe-DOb) \times 0.04}{DOb} = \text{quantité de GSH réduite disparue (oxydée)}.$$

$$\text{L'activité de la GPx} = \frac{\text{La quantité de GSH réduit disparue } X \times 5}{\text{La concentration de protéine}}$$

22. Glutathion-S- transférase

La mesure de l'activité de la glutathion-S- transférase (GST) est déterminée selon la méthode de **Habig et al (1974)**. Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-Chloro 2,4 di nitrobenzène) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH), la conjugaison entraîne la formation d'une molécule nouvelle ; 1-S-Glutathionyl 2-4 Di nitrobenzène permettant de mesurer l'activité de GST selon la réaction suivante :

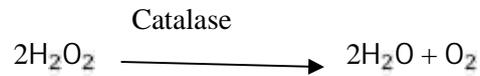


La valeur de la densité optique mesurée est directement proportionnelle à la quantité de conjugué formé elle-même liée à l'intensité de l'activité GST. Les échantillons sont homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate (0.1 M, pH 6). L'homogénat est centrifugé à 1400 t/min pendant 30 min et le surnageant récupéré servira comme source d'enzymes. Le dosage consiste à faire réagir 200 µl du surnageant avec 1.2 ml du mélange CDNB (1mM), GSH (5mM) [20.26 mg CDNB, 153.65 mg GSH, 1 ml éthanol, 100 ml tampon phosphate (0.1M, p H 6)]. La lecture des absorbances est effectuée pendant une minute et chaque 15 secondes à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant.

23. Catalase

Les catalases sont présents dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tétramériques, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent

dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les espèces réactives et en accélérant la réaction spontanée de l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) toxique pour la cellule en eau et en oxygène (Aebi., 1984).



L'activité de la catalase (CAT) est mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pendant 1 min à un intervalle de 15 seconde, en faisant réagir dans 780 μ l (100 mM) de tampon phosphate pH 7.4, 200 μ l d' H_2O_2 (500mM) sur 20 μ l de l'homogénat. les résultats ont été exprimés en μ moles d' H_2O_2 par minute et par mg de protéines.

24. Malondialdéhyde (MDA)

Le MDA peut être détecté par une réaction colorimétrique à l'acide thiobarbiturique (TBA). La détection du MDA issue de la dégradation des acides gras polyinsaturés à 3 ou 4 doubles liaisons peroxydées, constitue une méthode très sensible pour déterminer une lipoperoxydation in vitro. Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode **d'Esterbauer et al (1992)**.

Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique, pour former un pigment (rose). Ce chromogène peut être donc mesuré par spectrophotométrie à 530 nm (voir figure 18).

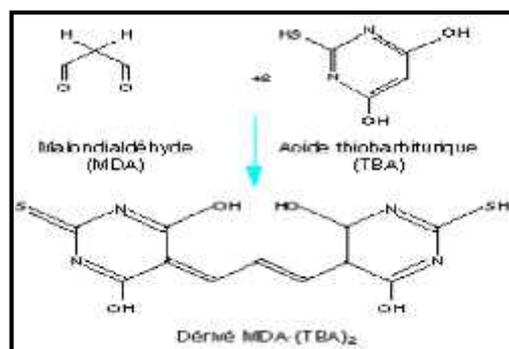


Figure 18. Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique.

Dans un tube sec ,375 μ l de l'homogénat (surnageant), sont additionnés à 150 μ l de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4) plus 375 μ l de la solution TCA BHT (TCA 20%, BHT 1%), agitation puis centrifugation à 1000 tours/min pendant 10 min. Prélèvement de 400 μ l du surnageant auquel est ajouté 80 μ l d'HCl 0.6M plus 320 μ l de

la solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120 mM), agitation puis incubation au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes. Lecture de la densité optique à $\lambda = 530$ nm.

La concentration du MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert ($DO = E.C.L$) :

$$C(\text{nmol/mg de protéine}) = \frac{DO \cdot 10^6}{\epsilon \cdot L \cdot Fd}$$

- C : Concentration en nmoles /mg de protéines ;
- DO : Densité optique lue à 530 nm ;
- ϵ : Coefficient d'extinction molaire du MDA = $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;
- L : Longueur du trajet optique = 0.779 cm ;
- X : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml) ;
- Fd : Facteur de dilution : Fd = 0.2083.

B. Etude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées à l'hôpital Ibn Roched d'Annaba, Service d'Anatomie Pathologique. La technique utilisée est celle décrite par (Houlot ,1984) qui comporte les étapes suivantes :

La fixation des échantillons (fragment de chaque organe) dans le formole, puis mise de ces échantillons tissulaires dans des cassettes spéciales à parois tournées afin de permettre le passage des liquides. **Déshydratation** des échantillons à l'aide d'un appareil automatique qui permet le passage automatiques et progressif des échantillons dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70%, 95% et 100%). **Inclusion** et réalisation des blocs : Les pièces sont alors plongées dans des bains de paraffine liquide. Les tissus étant maintenu et imbibés de paraffine, viennent alors l'étape de l'enrobage qui consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc de paraffine qui, en se solidifiant, va permettre sa coupe. Cette opération fait appel à des appareils « dits à inclusion » refermant un réservoir de paraffine maintenue à l'état liquide par un système de chauffage, un petit robinet et une plaque métallique réfrigérée pour obtenir la solidification rapide du bloc de paraffine contenant le tissu. La réalisation des coupes minces de quelques microns (5 μm en moyenne) est possible grâce à des appareils spéciaux appelés « Microtomes ». Ces coupes sont étalées sur des lames porte-objet, dépliées et fixés sur la lame par l'utilisation d'une eau gélatineuse chauffée. **La coloration** : Pour la coloration, la technique utilisée est celle à l'Hématoxyline-Eosine ou (Hématéine-Eosine) ; qui nécessite la présence de l'alcool acide (100 ml d'alcool éthylique à 70% + 50 ml d'acide HCl), eau

ammoniacale (100 ml d'eau distillée + 2 ml Ammoniaque) et solution d'Eosine (100ml Eosine solution aqueuse à 3%, 125 ml alcool éthylique à 95%, 375 ml d'eau distillée et 2 gouttes d'acide acétique).la coloration suit les étapes suivantes :

Déparaffinage et hydratation des lames à l'eau du robinet puis rinçage à l'eau distillée. Puis sont misent dans un bain d'Héματοxyline de Harris (15 minutes) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux).Les lames sont plongées dans l'alcool acide (1 à 2 plongées) ; ensuite dans un bain d'eau du robinet avec vérification de la différenciation au microscope. Misent dans un bain d'eau ammoniacale, puis dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasme). Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet.Les préparations ont ensuite été séchées puis observées au microscope optique et photographiées à l'aide d'un appareil photo.

C. Etude statistique

- Ces calculs ont été effectués à l'aide du logiciel MINITAB d'analyse et de traitement statistique des données (Version13, 31).

- Les résultats sont représentés sous la forme : moyenne \pm écart type moyenne, et les différences ont été considérées significatives à P 0.05.

- Nous avons déterminé, grâce aux statistiques élémentaires; les paramètres statistiques de base pondérale, biochimiques et hépatiques, pour chaque lot expérimental. Les données ont été analysées par l'analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA).

- A l'aide du test t du Student, nous avons comparé les moyennes deux à deux des différents lots.

RESULTATS

II. Résultats

A. Etude du poids corporel et poids relatif des organes

1. Effet sur le poids corporel et le poids relatif des organes

Les résultats obtenus par cette étude sur l'évolution du poids corporel et du poids relatif des organes sont mentionnés sur le tableau 02

Tableau 02 : Variation du poids corporel PC (g) et du poids relatif PR (g/100g de poids corporel) des organes (foie, cœur, reins et testicules) chez les rats témoins et traités après 21 jours de traitement.

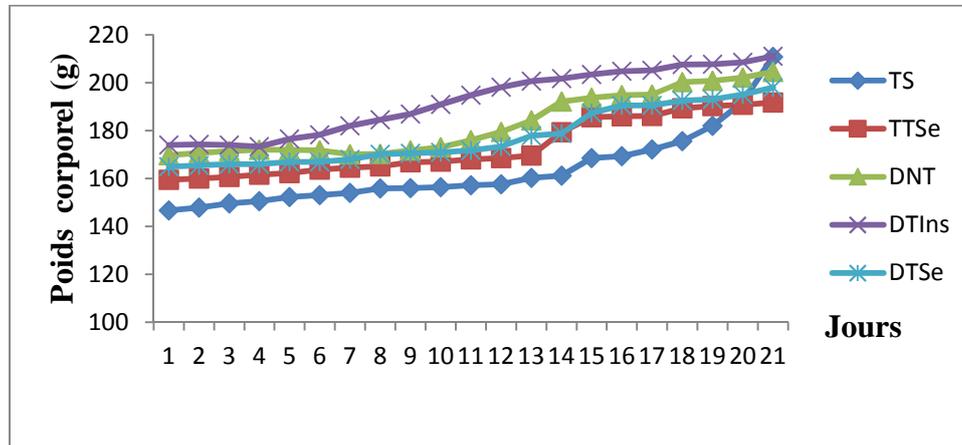
Paramètres	Lots expérimentaux				
	TS (n=7)	TTSe (n=7)	DNT (n=7)	DTInsuline (n=7)	DTSe (n=7)
Poids initial (g)	146.6 ± 7.75	159.5 ± 0.43	169.7 ± 0.99	174 ± 0.86	165 ± 2.31
Poids final (g)	210.7 ± 11.8***	191.8 ± 2.83**	204.7 ± 8.13**	211.2 ± 6.99**	198 ± 8.85 **
Gain du poids (g)	64.1	32.3	35	37.2	33
Poids relatif du foie (g/100g)	3.84 ± 0.25	3.68 ± 0.17	4.57 ± 0.17 ^{ab}	4.22 ± 0.18	4.00 ± 0.14 ^c
%	-	0.52%	19.01%	10.18%	4.16%
Poids relatif du cœur (g/100g)	0.31 ± 0.005	0.308 ± 0.0013	0.357 ± 0.01 ^{ab}	0.333 ± 0.009	0.312 ± 0.01 ^c
%	-	- 64%	+ 15.16%	+7.42 %	+0.64 %
Poids relatif des reins (g/100g)	0.718 ± 0.006	0.746 ± 0.003	0.771 ± 0.006	0.753 ± 0.002	0.721 ± 0.003
%	-	+3.4 %	+ 7.38%	+4.87 %	+ 0.42 %
Poids relatif des testicules (g/100g)	1.431 ± 0.064	1.434 ± 0.057	1.563 ± 0.043	1.457 ± 0.048	1.454 ± 0.064
%	-	0.21 %	9.22 %	1.81 %	1.61 %

a: comparaison avec le groupe TS (p 0.05), b : comparaison avec le groupe TTSe (p 0.05), c : comparaison avec le groupe DNT (p 0.05), *** (p 0.001) : comparaison avec le PI, ** (p 0.01).

1.1. Poids corporel

En mesurant ce paramètre, nous voulions savoir est ce que le sélénium à un effet sur l'évolution du poids corporel des sujets sains et des sujets diabétiques.

A



B

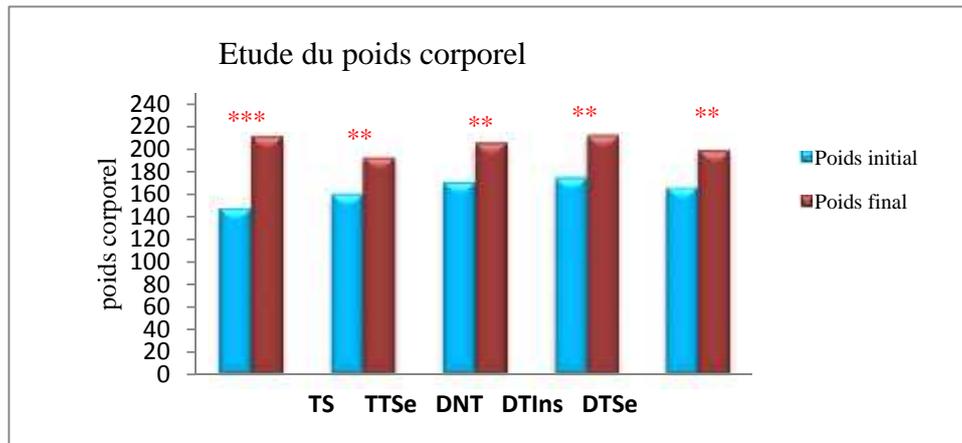
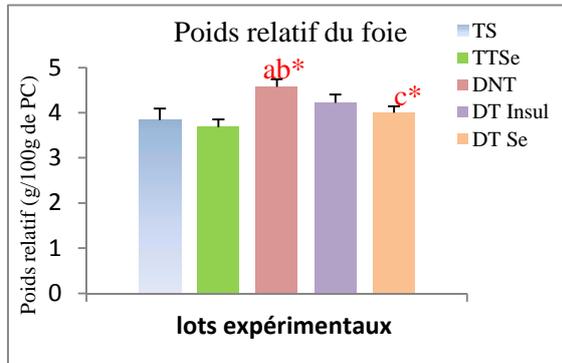


Figure 19 (A et B). Etude de l'évolution du poids corporel chez le lot témoin et les lots traités pendant 21 jours de traitement.

La figure 19A montre une diminution du poids corporel chez les lots : DNT, TTSe et DTSe et ceci à partir du 6^{ème} jour jusqu'au 13^{ème} jour en suite récupération du poids, alors que pour les lots : TS et DTIns aucune diminution n'a été enregistrée. Mais il existe toujours une différence significative entre le poids initial et final chez les différents lots de traitement (fig 19B).

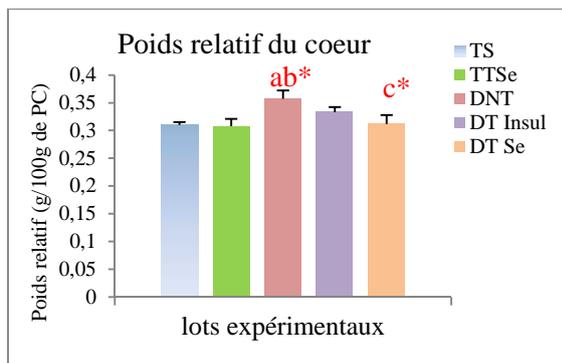
1.2. Poids relatif des organes

Le bon fonctionnement de l'organe peut être mesuré par son poids. Une hypertrophie d'un organe signifie un début de dysfonctionnement.



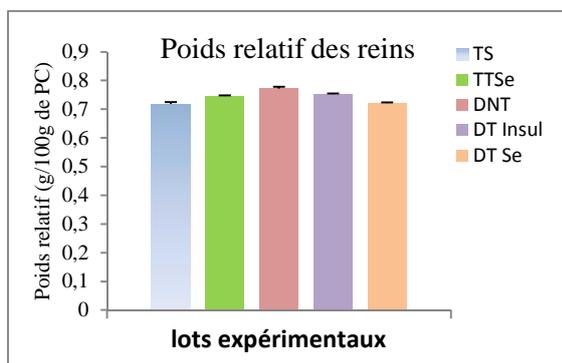
-Une augmentation significative ($p < 0.05$) du poids relatif du foie est observée chez le lot diabétique non traité comparé au témoin sain, témoin traité par le sélénium et diabétique traité par le sélénium.

Figure 20. Evolution du poids relatif du foie (g/100g PC) chez les rats témoins et traités après 21 jours du traitement.



-Les résultats obtenus montrent une augmentation du poids relatif du cœur chez le lot diabétique non traité comparé au témoin sain, témoin traité par le sélénium et diabétique traité par sélénium.

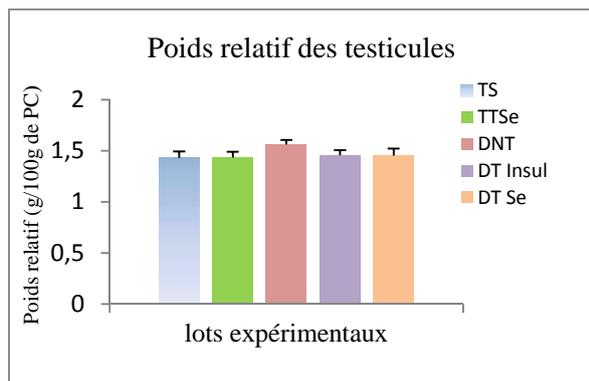
Figure 21. Evolution du poids relatif du cœur (g/100g PC) chez les rats témoins et traités après 21 jours du traitement.



-Aucune différence significative du poids relatif des reins n'est observée entre les 05 lots de traitement.

Figure 22. Evolution du poids relatif des reins (g/100g PC) chez les rats témoins et traités après 21 jours du traitement.

a : comparaison avec le lot TS, b : comparaison avec le lot TTSe, c : comparaison avec le lot DNT, d : comparaison avec DT Insuline.



- L'étude du poids relatif des testicules ne montre aucune différence significative entre les lots traités.

Figure 23. Evolution du poids relatif des testicules (g/100g PC) chez les rats témoins et traités après 21 jours du traitement.

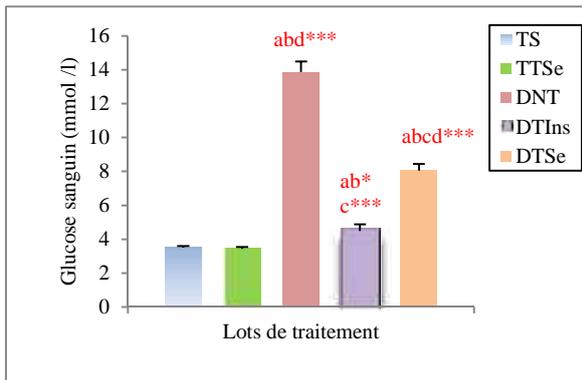
B. Etude des paramètres biochimiques sanguins

Tableau 03 : Variation de la concentration sérique du glucose, insuline, urée, créatinine, bilirubine totale et directe, le magnésium et l'activité de l'enzyme glucose 6 phosphate déshydrogénase chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours de traitement.

Paramètres & traitements	Lots expérimentaux				
	TS (n=7)	TTSe (n=7)	DNT (n=7)	DTInsuline (n=7)	DTSe (n=7)
Glucose (mmol/l)	3.5±0.11	3.44±0.11	13.87 ± 0.62 ^{abd}	4.49 ± 0.24 ^{abc}	8.04 ± 0.4 ^{abcd}
Insuline (µ UI/ml)	2.34 ± 0.048	2.41 ± 0.04	0.64 ± 0.06 ^{abd}	2.06 ± 0.06 ^{abc}	1.90 ± 0.038 ^{abcd}
G-6-PDH (m UI/10GR)	141.9±2	143.5±1	109.8 ± 3 ^{abd}	130.4 ± 2.2 ^{abc}	136 ± 1.3 ^{abcd}
Urée (mmol/l)	6.81 ±0.2	6.69 ± 0.2	10.58 ± 0.59 ^{ab}	9.74 ± 0.59 ^{ab}	7.91 ± 0.2 ^{abcd}
Créatinine (µmol/l)	53 ± 1	52 ± 1.1	64 ± 1.3 ^{ab}	64 ± 1.8 ^{ab}	61 ± 1.1 ^{ab}
Bilirubine T (µmol/l)	3.6 ± 0.3	3.8 ± 0.5	5.6 ± 0.3 ^{abd}	3.4 ± 0.3 ^c	4.0 ± 0.6 ^c
Bilirubine D (µmol/l)	0.71 ± 0.14	0.86± 0.14	0.86± 0.14	0.85 ± 0.14	0.71 ± 0.18
Magnésium (mmol/l)	0.618 ± 0.007	0.645± 0.016	0.53 ± 0.014 ^{abd}	0.608 ± 0.01 ^c	0.651 ± 0.015 ^{cd}

a : comparaison avec le lot TS, b : comparaison avec le lot TTSe, c : comparaison avec le lot DNT, d : comparaison avec DT Insuline.

- Glucose

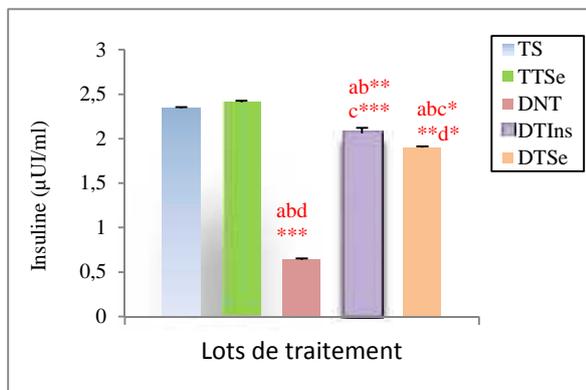


-Une augmentation de la glycémie est observée chez le lot DNT par rapport aux témoins et les autres lots traités avec une différence très hautement significative (p 0.001).

Figure 24. Variation de la concentration sérique du glucose chez le lot témoin et les lots traités.

(* : p 0.05, ** : p ≤ 0.01, *** : p 0.001)

- Insuline

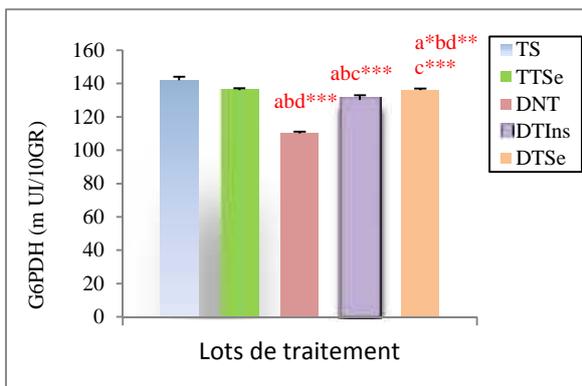


-L'augmentation du taux de l'insulinémie chez le lot DTSe explique la diminution de la glycémie par rapport au DNT.

Figure 25. Variation du taux de l'insulinémie chez le lot témoin et les lots traités.

(* : p 0.05, ** : p 0.01, *** : p 0.001)

- Glucose -6- phosphate déshydrogénase



Nos résultats montrent une diminution de l'activité enzymatique de la G6PDH chez le lot DNT avec une différence très hautement significative (p 0.001) par rapport au lot témoin et aux lots traités.

Figure 26. Variation de l'activité enzymatique de la G6PDH chez le lot témoin et les lots traités.

traités.

a : comparaison avec le lot TS, b : comparaison avec le lot TTSe, c : comparaison avec le lot DNT, d : comparaison avec DT Insuline.

- Urée et créatinine

Nos résultats montrent une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) des paramètres de la fonction rénale (urée, créatinine) chez le lot DNT par rapport au Témoin et témoin traité par sélénium, et hautement significative ($p < 0.01$) par rapport au diabétique traité par insuline et diabétique traité par sélénium.

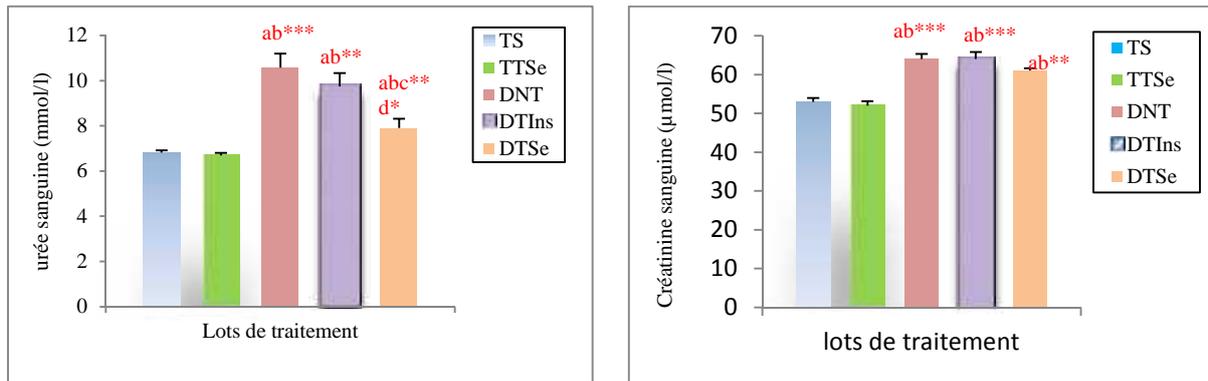


Figure 27. Variation de la concentration sérique en urée et créatinine chez le lot témoin et les lots traités (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$). a : comparaison avec le lot TS, b : comparaison avec le lot TTSe, c : comparaison avec le lot DNT, d : comparaison avec DT Insuline.

- Bilirubine totale et directe

Augmentation du taux de la bilirubine totale avec une différence significative ($p < 0.05$) par rapport aux autres lots de traitement, néanmoins pas de différence pour la bilirubine directe entre les lots traités.

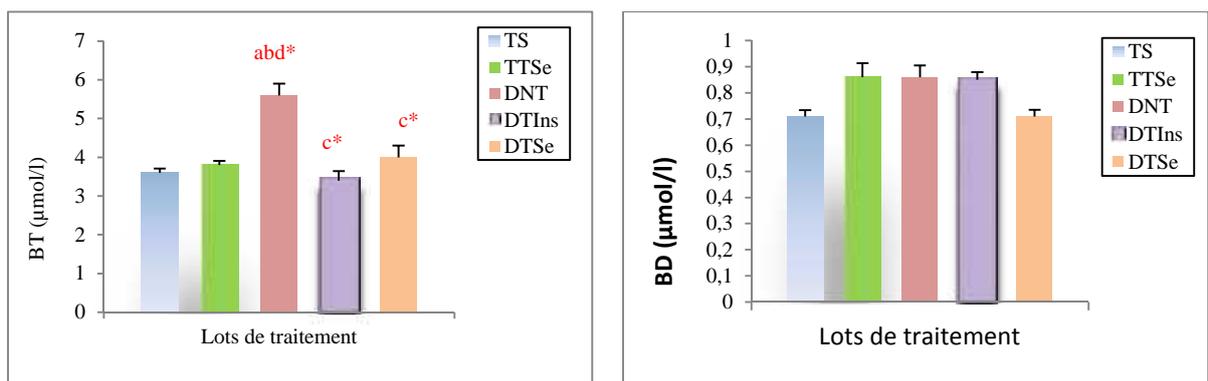
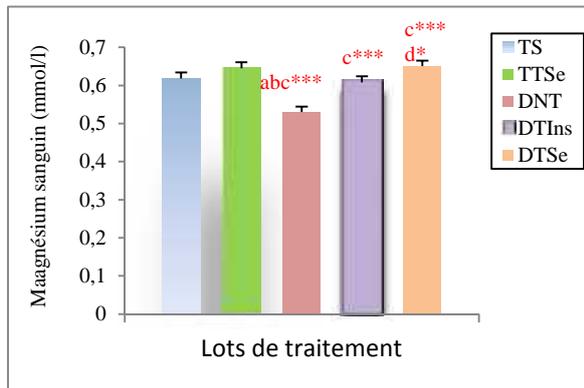


Figure 28. Variation au taux sérique de la bilirubine totale et directe chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours de traitement. (a : comparaison avec le lot TS, b : comparaison avec le lot TTSe, c : comparaison avec le lot DNT, d : comparaison avec DT Insuline).

- Magnésium



-Il existe une diminution du taux de magnésium sériques chez le lot DNT avec une différence très hautement significative (p 0.001) comparé aux autres lots traités.

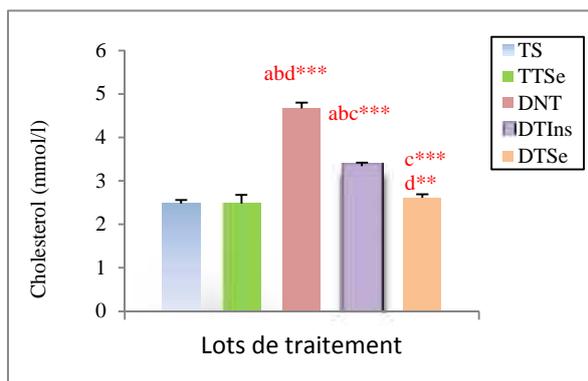
Figure29. Variation du taux de magnésium chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours de traitement.

Tableau 04 : Variation de la concentration sérique du cholestérol T, HDL-C, LDL-C, triglycérides et les lipides totaux chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours de traitement.

Paramètres	Groupes expérimentaux				
	TS (n=7)	TTSe (n=7)	DNT (n=7)	DTInsuline (n=7)	DTSe (n=7)
Cholestérol T (mmol/l)	2.48 ±0.1	2.48±0.21	4.67 ± 0.13 ^{abd}	3.34 ± 0.05 ^{abc}	2.61 ± 0.08 ^{cd}
HDL-C (mmol/l)	0.92 ± 0.04	0.97 ± 0.04	0.88 ± 0.015 ^{ab}	0.90 ± 0.025	0.95 ± 0.038 ^{cd}
LDL-C (mmol/l)	121 ± 0.02	1.17 ± 0.04	3.01 ± 0.08 ^{abd}	1.84 ± 0.07 ^{abc}	1.30 ± 0.08 ^{cd}
Triglycérides (mmol/l)	0.67 ±0.045	0.65 ± 0.022	1.55 ± 0.14 ^{abd}	1.20 ± 0.031 ^{abc}	0.733 ± 0.051 ^{cd}
Lipides T (mg/dl)	512 ± 59	497 ± 19	763 ± 33 ^{abd}	652 ± 49 ^{abc}	605 ± 24 ^{abcd}

a : comparaison avec le lot TS, b : comparaison avec le lot TTSe, c : comparaison avec le lot DNT, d : comparaison avec DT Insuline.

- Cholestérol Total

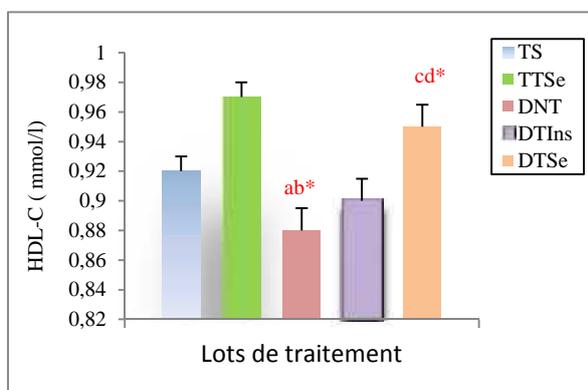


jours du traitement.

-Nos résultats révèlent une augmentation de la cholestérolémie chez le lot DNT avec une différence très hautement significative (p 0.001) par rapport au lot témoin et autres lots traités.

Figure 30. Variation de la cholestérolémie chez le lot témoin et les lots traités après 21

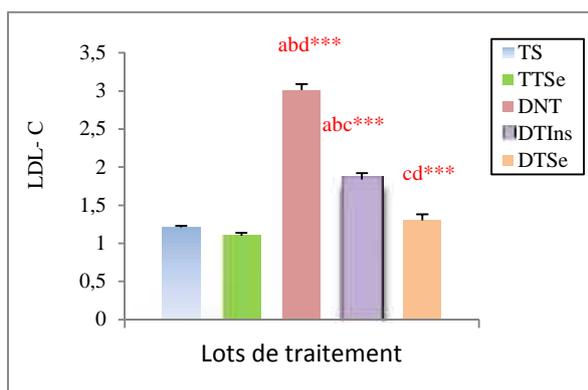
- HDL-C



-Une diminution est observée chez le lot DNT avec une différence significative (p 0.05) par rapport au lot témoin traité par sélénium et le lot diabétique traité par sélénium.

Figure 31. Variation du cholestérol HDL chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours du traitement (* :p 0.05, ** :p 0.01, *** : p 0.001).

- LDL-C

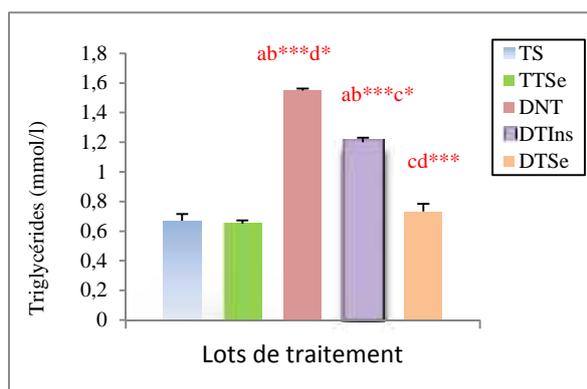


(p 0.001) par rapport au lot diabétique traité par insuline.

-Une augmentation du taux de l'LDL-C avec une différence très hautement significative (p 0.001) chez le lot DNT par rapport au lot témoin et les autres lots traités. Le traitement des rats diabétiques par le sélénium fait diminuer le taux de l'LDL-C avec une différence très hautement significative

Figure 32. Variation du cholestérol HDL chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours du traitement (* : p 0.05, ** : p 0.01, *** : p 0.001). (a : comparaison avec le lot TS, b : comparaison avec le lot TTSe, c : comparaison avec le lot DNT, d : comparaison avec DT Insuline).

- Triglycérides

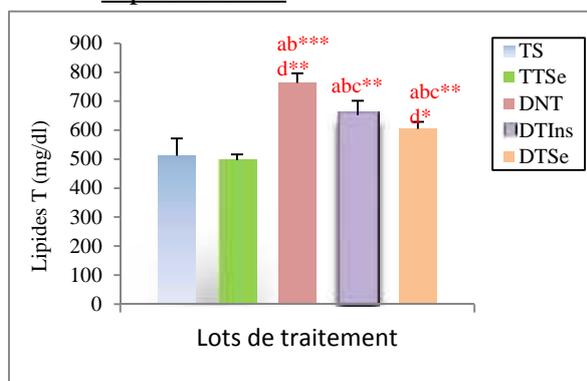


-Les résultats trouvés montrent une augmentation des triglycérides chez le lot DNT avec une différence très hautement significative (p 0.001) par rapport au lot témoin et les autres lots traités. La supplémentation du sélénium aux rats diabétiques fait diminuer significativement les

triglycérides par rapport aux diabétiques traités par insuline.

Figure 33. Variation de la concentration sérique des triglycérides chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours du traitement.

- Lipides totaux



Une augmentation des lipides avec une différence très hautement significative (p 0.001) chez le lot DNT par rapport aux lots TS et TTSe, hautement significative (p 0.01) par rapport aux DTinsuline et DTSe.

Figure 34. Variation de la concentration sérique des lipides totaux chez le lot témoin et les lots

traités après 21 jours de traitement.

Tableau 05 : Variation de l'activité enzymatique des transaminases (TGO, TGP), phosphatase alcaline (PAlc) et l' amylase sérique chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours de traitement.

Paramètres	Groupes expérimentaux				
	TS (n=7)	TTSe (n=7)	DNT (n=7)	DTInsuline (n=7)	DTSe (n=7)
TGO (U/L)	21.7 ± 1.3	20.0 ± 0.8	29.8 ± 1.1 ^{ab}	27.3 ± 1.2 ^{ab}	20.71 ± 1.4 ^{cd}
TGP (U/P)	23.7 ± 1.3	23.86 ± 1.1	34.57 ± 1.2 ^{ab}	30.43 ± 1.1 ^{ab}	24.43 ± 0.9 ^{cd}
P Alc (U/L)	365 ± 11	345 ± 10	508 ± 16 ^{ab}	503 ± 20 ^{ab}	417 ± 47 ^{abcd}
amylase (U/L)	69 ± 1.3	70 ± 1.2	41.6 ± 3 ^{abd}	48 ± 1 ^{abc}	54.7 ± 0.7 ^{abcd}

- Transaminases

Les résultats obtenus révèlent une augmentation des transaminases (TGO, TGP) avec une différence très hautement significative ($p < 0.001$) suite à l'injection de l'alloxane chez les rats DNT et DT insuline comparés aux témoins (TS), TTSe et DTSe.

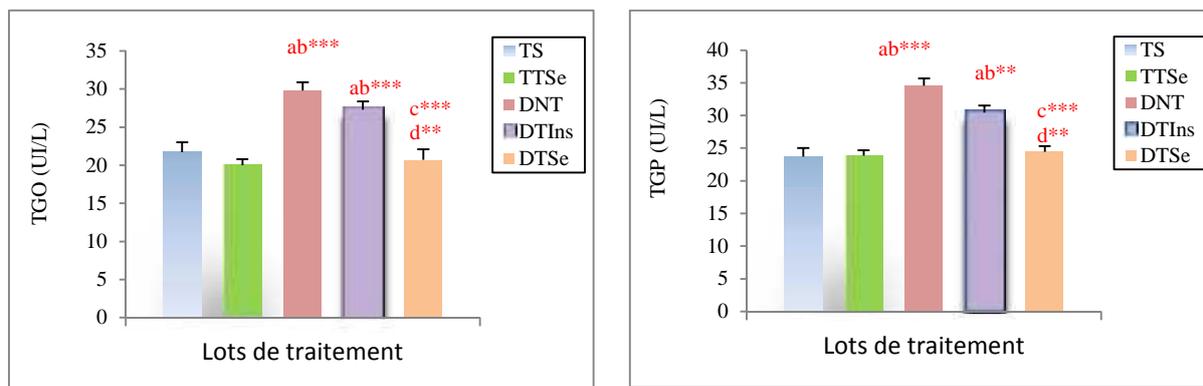
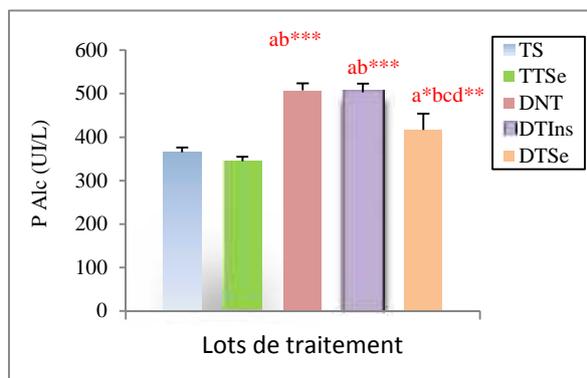


Figure 35. Variation de l'activité enzymatique des transaminases chez les rats témoins et traités après 21 jours de traitement (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p \leq 0.001$).

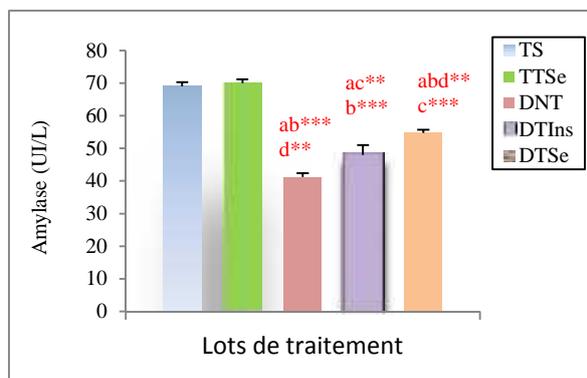
- Phosphatase alcaline



Une augmentation de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline avec une différence très hautement significative ($p < 0.001$), a été enregistrée chez les lots DNT et DTinsuline par rapport aux TSet TTSe. Néanmoins cette différence est hautement significative ($p < 0.01$) par rapport au DTSe.

Figure 36. Variation de l'activité enzymatique de la PALc chez les rats témoins et traités.

- amylase



Nos résultats montrent une diminution de l'amylasémie avec une différence très hautement significative ($p < 0.001$) chez le lot DNT par rapport aux TS, TTSe, DTSe et hautement significative ($p < 0.01$) par rapport au DTinsuline.

Figure 37. Variation de l'activité enzymatique de l'amylase chez les rats témoins et traités après 21 jours de traitement.

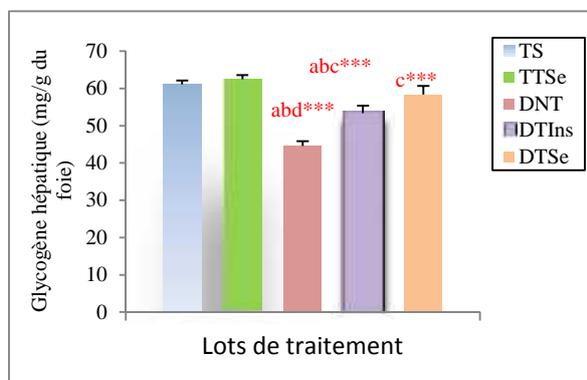
C. Etude des paramètres biochimiques tissulaires

- Glycogène hépatique

Tableau 06: Variation de la teneur hépatique en glycogène chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours de traitement.

Paramètre	Groupes expérimentaux				
	TS (n=7)	TTSe (n=7)	DNT (n=7)	DTInsuline (n=7)	DTSe (n=7)
Glycogène (mg/g du foie)	61.1 ± 1.4	62.5 ± 1.0	44.6 ± 1.2 ^{abd}	53.36 ± 1.1 ^{abc}	58.36 ± 2.3 ^c

a : comparaison avec le lot TS, b : comparaison avec le lot TTSe, c : comparaison avec le lot DNT, d : comparaison avec DT Insuline.



Diminution de la teneur hépatique en glycogène chez le lot DNT comparé au témoin et aux autres lots traités, et chez les rats diabétiques traités par l'insuline par rapport aux TS, TTSe, DNT avec une différence très hautement significative (p 0.001).

Figure 38. Variation de la teneur hépatique en glycogène chez les rats témoins et traités après 21 jours de traitement. (a : comparaison avec le lot TS, b : comparaison avec le lot TTSe, c : comparaison avec le lot DNT, d : comparaison avec DT Insuline ,*** : p 0.001) .

Tableau 07 : Variation de glutathion (GSH), Malon di aldéhyde (MDA), l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx), glutathion -S- transférase (GST), catalase (CAT) dans les organes (Foie, rein, cœur et testicule) chez les rats témoins et traités après 21 jours de traitement.

Paramètres & tissus		Lots expérimentaux				
		TS (n=7)	TTSe (n=7)	DNT (n=7)	DT Insuline (n=7)	DTSe (n=7)
GSH (nmol/ mg de P)	Foie	234 ± 4.2	240 ± 5.3	178 ± 3.7 ^{abd}	210 ± 4.5 ^{abc}	226 ± 3 ^{dc}
	Rein	92 ± 4.3	95 ± 2.1	55 ± 2.2 ^{abd}	77 ± 3 ^{abc}	82 ± 3 ^{bc}
	Coeur	129 ± 2.0	130 ± 1.9	103 ± 2.3 ^{abd}	116 ± 1.8 ^{abc}	124 ± 2 ^{cd}
	Testic	68 ± 4.7	69 ± 2.6	46 ± 1.5 ^{abd}	57 ± 2.2 ^{bc}	56 ± 1.3 ^{bc}
GPx (µmol/ mg de P)	Foie	0.386±0.006	0.388±0.005	0.268 ± 0.01 ^{abd}	0.331 ± 0.02 ^{bc}	0.36 ± 0.013 ^c
	Rein	0.326±0.026	0.369±0.012	0.198 ± 0.007 ^{abd}	0.297 ± 0.01 ^{bc}	0.33 ± 0.01 ^c
	Coeur	0.323±0.011	0.329±0.061	0.239 ± 0.007 ^{ab}	0.268 ± 0.01 ^{ab}	0.298 ± 0.01 ^{bc}
	Testic	0.131±0.009	0.134±0.002	0.077 ± 0.002 ^{abd}	0.096 ± 0.006 ^{abc}	0.129 ± 0.05 ^{bc}
GST (nmol/m n/mg de P)	Foie	1.71±0.02	1.68±0.02	2.04 ± 0.03 ^{ab}	1.92 ± 0.05 ^{ab}	1.73 ± 0.02 ^{cd}
	Rein	0.644±0.037	0.659±0.03	0.791 ± 0.03 ^{abd}	0.720 ± 0.04 ^c	0.719 ± 0.02 ^c
	Coeur	0.696±0.04	0.676±0.023	0.854 ± 0.05 ^{ab}	0.787 ± 0.06 ^{ab}	0.724 ± 0.04 ^c
	Testic	0.831±0.009	0.829±0.003	1.12 ± 0.012 ^{ab}	0.97 ± 0.05 ^{ab}	0.883 ± 0.02 ^c
CAT (µmol H2O2/m n/mg de P)	Foie	55.94±1.2	56.3±1.0	40.2 ± 2.0 ^{ab}	41.49 ± 1.4 ^{ab}	49.02 ± 2.1 ^{abcd}
	Rein	25.7±1.3	25.89±1.1	14.64 ± 0.8 ^{abd}	20.6 ± 1.2 ^{abc}	25.78 ± 0.5 ^{cd}
	Coeur	11.99±0.8	11.82±0.43	8.09 ± 0.37 ^{abd}	10.84 ± 0.7 ^c	11.23 ± 0.6 ^c
MDA (nmol/ mg de P)	Foie	0.215±0.004	0.212±0.048	0.362 ± 0.01 ^{abd}	0.303 ± 0.005 ^{abc}	0.219 ± 0.06 ^c
	Rein	0.262±0.048	0.234±0.062	0.382 ± 0.02 ^{abd}	0.325 ± 0.006 ^{abc}	0.267 ± 0.09 ^{bcd}
	Coeur	0.516±0.08	0.504±0.06	0.972 ± 0.005 ^{abd}	0.733 ± 0.02 ^{abc}	0.601 ± 0.01 ^{abcd}
	Testic	0.169±0.004	0.169±0.003	0.223 ± 0.05 ^{abd}	0.194 ± 0.003 ^{abc}	0.175 ± 0.007 ^{cd}

a : comparaison avec le lot TS, b : comparaison avec le lot TTSe, c : comparaison avec le lot DNT, d : comparaison avec DT Insuline.

- Glutathion (GSH)

- Les résultats obtenus montrent une diminution de la teneur hépatique en glutathion avec une différence très hautement significative ($p < 0.001$), chez le lot DNT comparé au témoin et aux autres lots traités et avec une différence hautement significative ($p < 0.01$), chez le lot DT ins comparé au témoin (TS) et très hautement significative ($p < 0.001$) comparé aux TTSe et DTSe.
- De même pour la GSH rénale, la diminution chez le lot DNT est avec une différence très hautement significative ($p < 0.001$), comparé aux TS, TTSe, DTSe et hautement significative ($p < 0.01$) par rapport au DT ins.
- La diminution de la GSH cardiaque chez le lot DNT à une différence très hautement significative ($p < 0.001$), comparé au TS et aux autres lots traités.
- Le tissu testiculaire des rats DNT présente une diminution de la teneur en GSH avec une différence très hautement significative ($p < 0.001$) par rapport aux TS, TTSe, DTSe et hautement significative ($p < 0.01$) par rapport au DT ins.

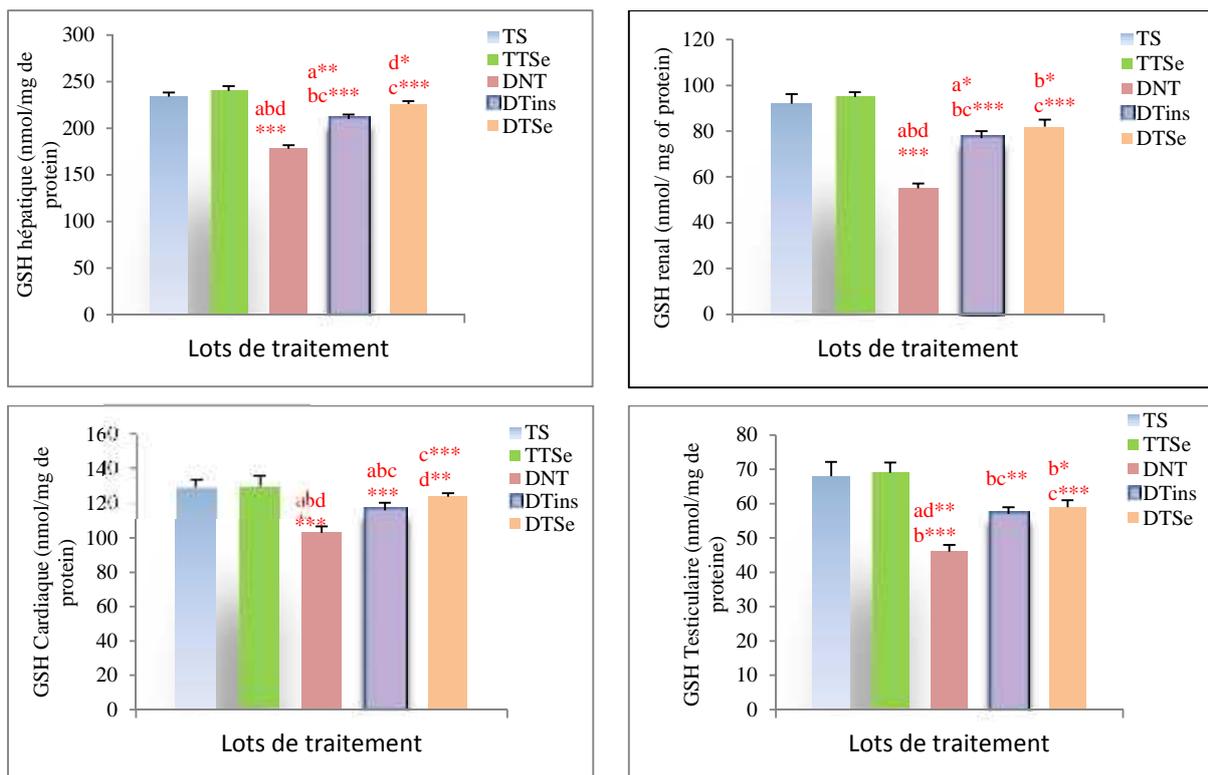


Figure 39. Variation de la teneur en glutathion (GSH) dans les organes (Foie, rein, cœur et testicules) chez les rats témoins et traités après 21 jours de traitement. (a : comparaison avec le lot TS, b : comparaison avec le lot TTSe, c : comparaison avec le lot DNT, d : comparaison avec DT Insuline, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$).

- Glutathion peroxydase

- L'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) hépatique est diminuée chez le lot DNT avec une différence très hautement significative (p 0.001) par rapport au DT ins.
- Pour l'activité de la GPx rénale la diminution chez le lot DNT est avec une différence hautement significative (p 0.01) par rapport au TS, et très hautement significative (p 0.001) par rapport aux autres lots traités.
- Le tissu cardiaque montre une diminution de l'activité enzymatique de la GPx chez le lot DNT avec une différence très hautement significative (p 0.001) par rapport aux lots TS, TTSe et DTSe. Pas de différence par rapport au DT ins.
- L'activité enzymatique de la GPx testiculaire chez le lot DNT est diminuée avec une différence très hautement significative (p 0.001) par rapport aux lots :TS, TTSe et DTSe, et significative (p 0.05) par rapport au DI ins.

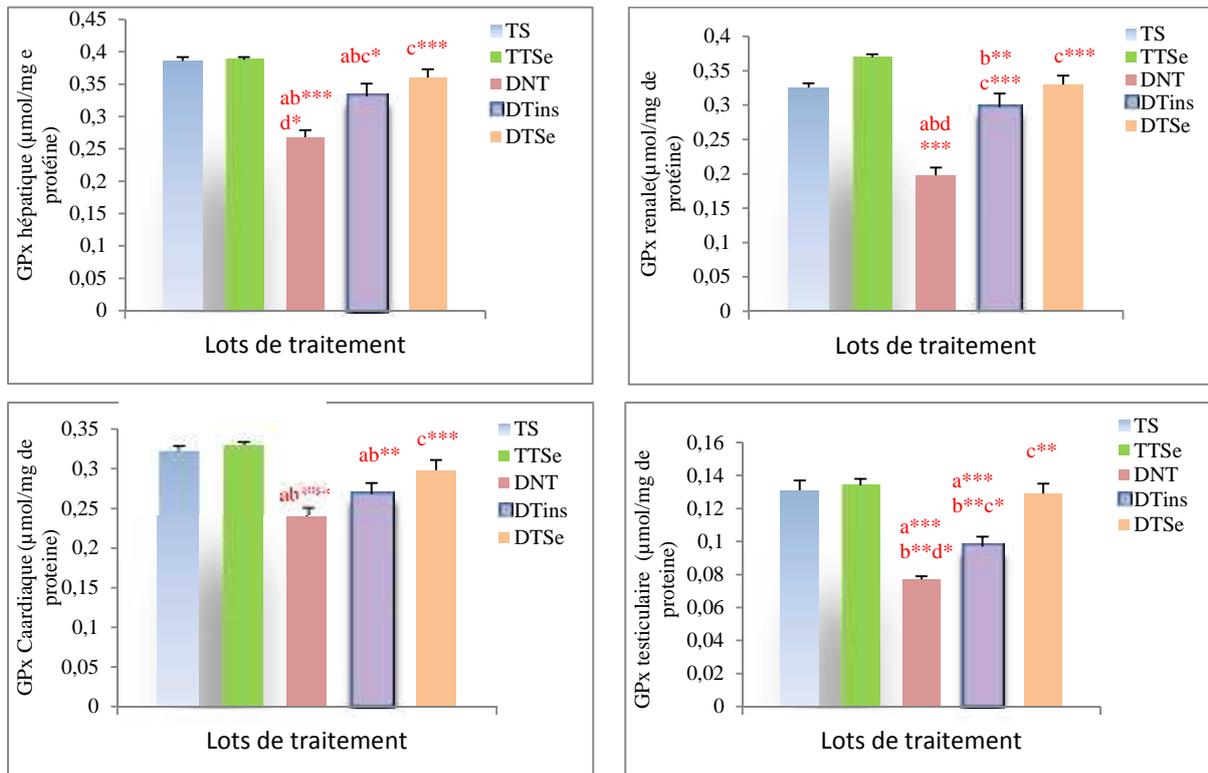


Figure 40. Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) dans les organes (foie, rein, cœur et testicule) chez les rats témoins et traités après 21 jours de traitement. (a : comparaison avec le lot TS, b : comparaison avec le lot TTSe, c : comparaison avec le lot DNT, d : comparaison avec DT Insuline , * : p 0.05,** : p 0.01,*** : p 0.001) .

- Glutathion –S- transférase

- Une augmentation de l'activité enzymatique de la glutathion-S- transférase (GST) hépatique chez le lot DNT avec une différence très hautement significative (p 0.001) par rapport aux lots : TS, TTSe, DTSe et pas de différence par rapport au DT ins.
- Cette différence est significative (p 0.05) dans le tissu rénal chez le lot DNT comparé aux TS et TTSe.
- Le tissu cardiaque montre une augmentation de l'activité enzymatique de la GST chez le lot DNT avec une différence significative (p 0.05) par rapport au TS et hautement significative (p 0.01) par rapport au TTSe.
- La GST testiculaire présente une augmentation avec une différence significative (p 0.05) chez le lot DNT comparé aux : TS, TTSe, DTSe.

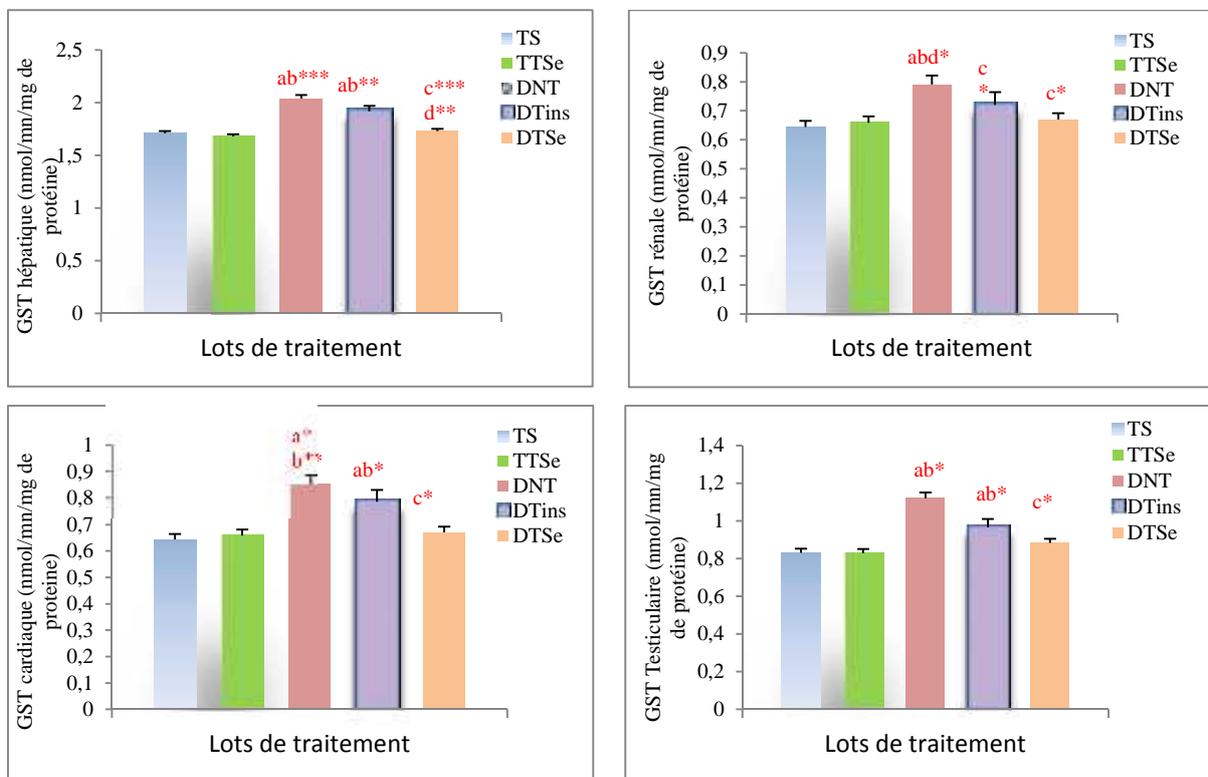
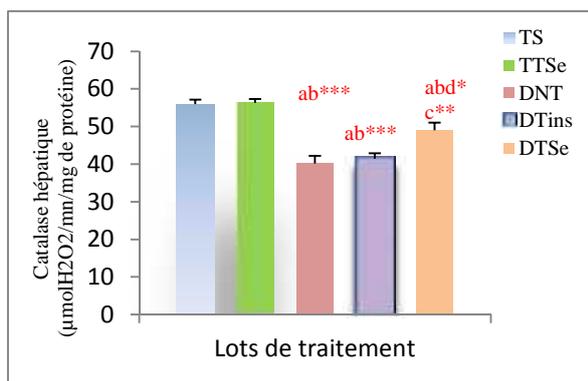
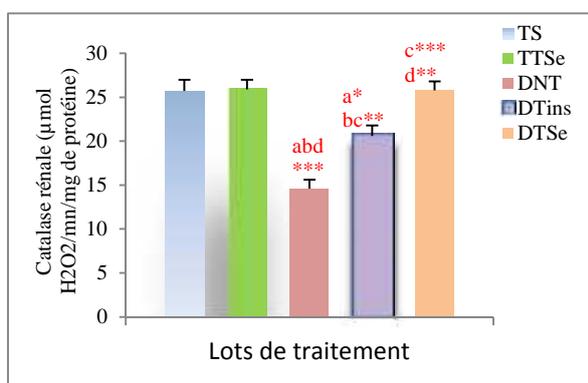


Figure 41. Variation l'activité enzymatique de la glutathion -S- transférase (GST), dans les organes (foie, rein, cœur et testicule) chez les rats témoins et traités après 21 jours de traitement. (a : comparaison avec le lot TS, b : comparaison avec le lot TTSe, c : comparaison avec le lot DNT, d : comparaison avec DT Insuline , * : p 0.05, ** : p 0.01, *** : p 0.001) .

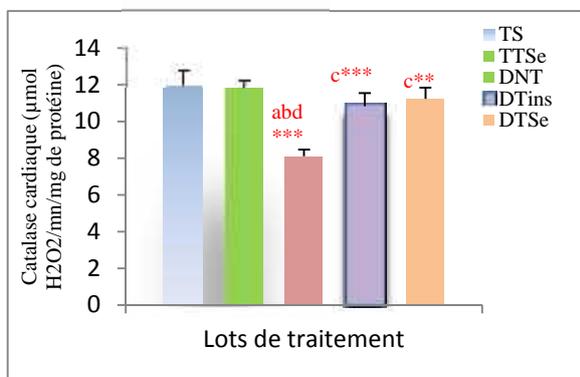
- Catalase



-Nos résultats révèlent une diminution de l'activité enzymatique de la catalase hépatique chez le lot DNT avec une différence très hautement significative (p 0.001) par rapport aux : TS, TTSe, et hautement significative (p 0.01) par rapport au DTSe.



- Cette diminution à une différence très hautement significative (p 0.001) dans le tissu rénal chez le lot DNT par rapport aux lots : TS, TTSe, et DTSe et hautement significative (p 0.01) par rapport au DT ins.



-La catalase cardiaque présente une diminution avec une différence très hautement significative (p 0.001) chez le lot DNT comparé au TTSe, et hautement significative (p 0.01) par rapport aux TS, DTSe et DTins.

Figure 42. Variation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) dans les organes (Foie, rein et cœur) chez les rats témoins et traités après 21 jours de traitement. (a : comparaison avec le lot TS, b : comparaison avec le lot TTSe, c : comparaison avec le lot DNT, d : comparaison avec DT Insuline , * : p 0.05, ** : p 0.01, *** : p 0.001) .

- Malondialdéhyde (MDA)

D'après les résultats obtenus (tableau 07 et fig 43), on observe une augmentation avec une différence très hautement significative ($p < 0.001$) du taux de MDA dans les organes foie, rein, cœur et testicules, chez le lot DNT par rapport aux TS, TTSe et DTSe, et hautement significative ($p < 0.01$) dans le tissu hépatique par rapport au DTins, très hautement significative ($p < 0.001$) dans les tissus cardiaques et testiculaires par rapport au DTins, significative ($p < 0.05$) dans le tissu rénal par rapport au DTins.

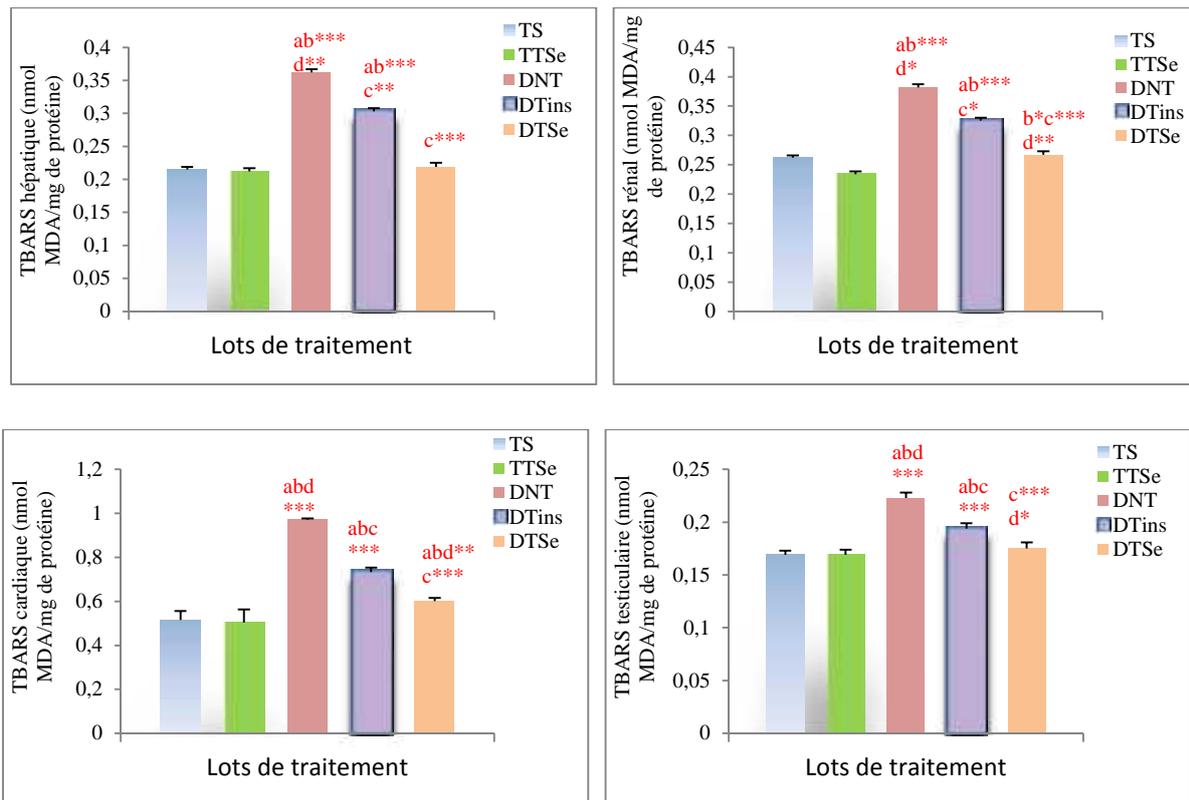
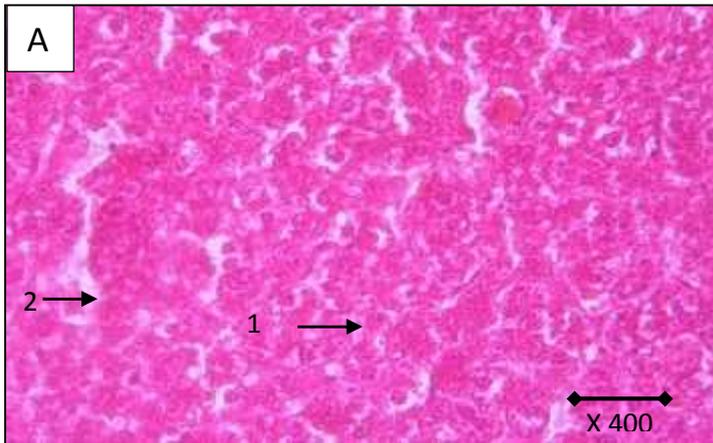


Figure 43. Variation de la teneur en Malondialdéhyde (MDA) dans les organes (Foie, rein, cœur et testicule) chez les rats témoins et traités après 21 jours de traitement. (a : comparaison avec le lot TS, b : comparaison avec le lot TTSe, c : comparaison avec le lot DNT, d : comparaison avec DT Insuline, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$).

D. Etude histologique

Les observations microscopiques des coupes du foie, rein et testicule des rats témoins, diabétiques et diabétiques traités pendant 21 jours ne révèlent aucune modification cellulaire visible (figure 44).

Néanmoins l'observation microscopique du pancréas montre une diminution du nombre des ilots de langerhans par champ microscopique chez le rat DNT par rapport au témoin. La supplémentation du sélénium à une dose de 2 mg/kg/j avant l'injection de l'alloxane a protégée les ilots de langerhans des radicaux libres générés par l'alloxane chez le lot DTSe (figure 45).



A : Coupe histologique de foie d'un rat diabétique non traité (DNT), montrant les hépatocytes à l'état normal HE 400X.

- 1 Hépatocyte sain
- 2 amas de cellules atypiques



B : Coupe histologique du rein d'un rat diabétique non traité (DNT), montrant les cellules rénales à l'état normal HE 400X.

GN : Glomérule normal



C : Coupe histologique d'un testicule du rat diabétique non traité (DNT), montrant les cellules à l'état normal HE 400X.

→ Tube séminifère à l'état normal.

Figure 44. Coupes histologiques du foie, rein, testicule d'un rat diabétique non traité (DNT), coloration à l'hématoxyline éosine X400.

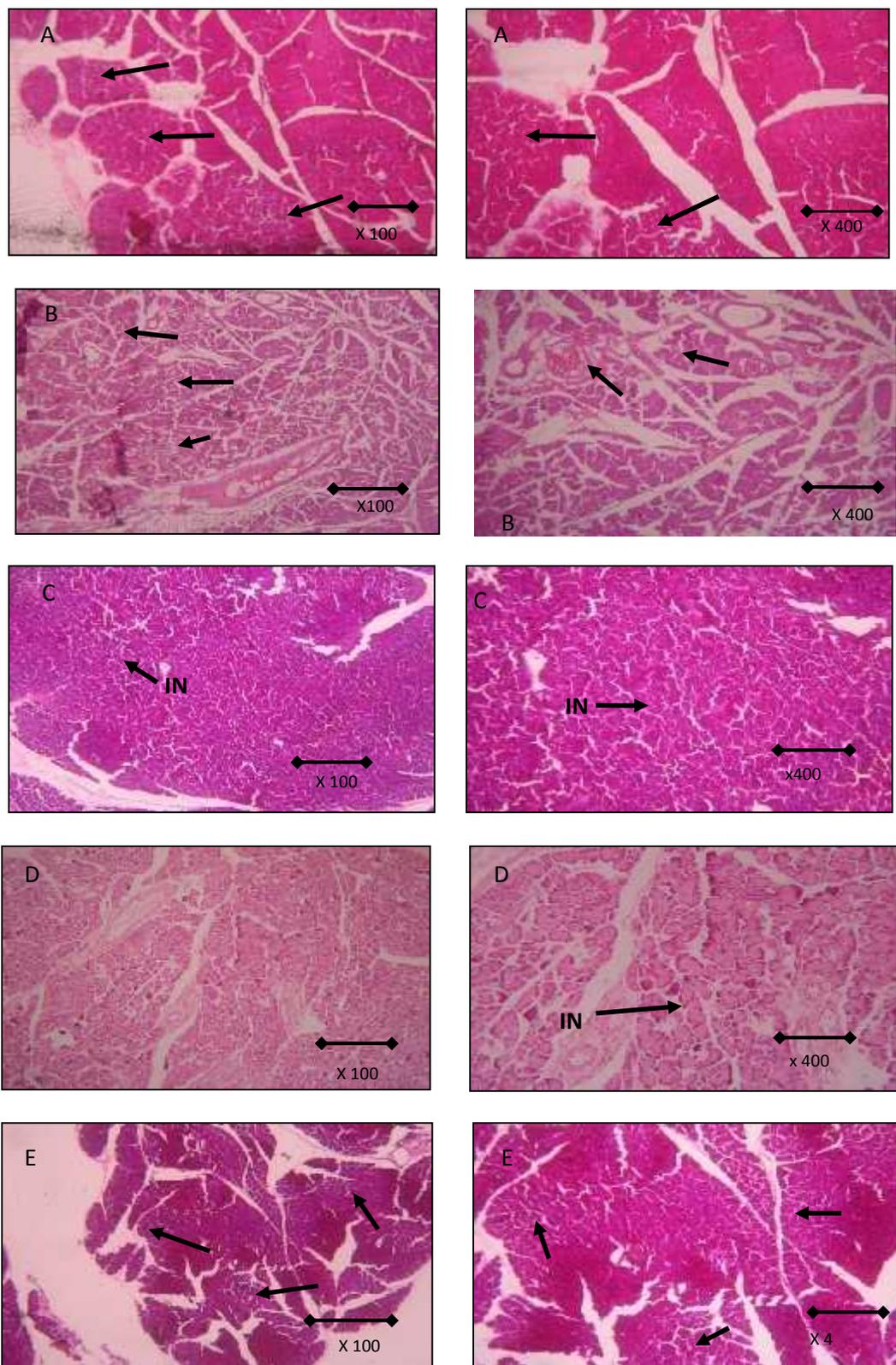


Figure 45. Coupes histologiques du pancréas du rat témoin (A), témoin traité par sélénium (B), diabétique non traité (C), diabétique traité par insuline (D) et diabétique traité par sélénium (E) coloration HE 100X et 400X.

————> Ilot de langerhans IN : Ilot de langerhans nécrotique (dégénérescence)

DISCUSSION

DISCUSSION

Le stress oxydant qui résulte d'un déséquilibre entre la production des RL et leur élimination par les défenses anti oxydantes, contribue à l'initiation et à la progression de plusieurs maladies. Les RL sont très réactifs et peuvent attaquer, s'ils ne sont pas détruits, différentes cibles telles que les protéines, l'ADN et surtout les acides gras poly insaturés (peroxydation lipidique). Au cours de diabète l'hyperglycémie provoque la génération des radicaux libres via multiples mécanismes ; auto-oxydation de glucose, glycation non enzymatique, la voie des polyols et la réduction de la défense anti-oxydante (**Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2000 ; Sharma *et al.*, 2000**).

1. Effet du sélénium sur le poids corporel et le poids relatif des organes :

- Dans nos conditions expérimentales, On a enregistré un déficit pondéral chez les rats diabétiques non traités (DNT) et diabétiques traités par le sélénium ce qui en accord avec le résultat obtenus par : **Nuraye & Belma, 2005 ; Murat & Belma, 2006 ; Murat *et al.*, 2004 ; Soudani *et al.*, 2010**. Cet effet peut être dû au manque d'insuline qui conduit à la dégradation des protéines structurales qui sont connues par leur contribution au poids corporel (**Rajkumar & Govindarajulu, 1991 ; Vats *et al.*, 2004**).

- Augmentation du poids relatif du foie chez le lot DNT par rapport au témoin et aux lots traités ce qui en accord avec les travaux de : **Hwang *et al* (2005)**. d'après **Yves Patrice *et al* (2006)**, l'hypertrophie hépatique ou hépatomégalie associée à une augmentation modérée des transaminases est en rapport direct avec la surcharge graisseuses en cas de : éthylisme, obésité, diabète et hypertriglycéridémie.

- Une hypertrophie cardiaque a été enregistrée chez le lot DNT comparé aux lots traitement. Ceci est expliqué comme suit :

L'hyperglycémie induite par le diabète entraîne également une production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN), laquelle induit un stress oxydant, altère l'expression génique, les signaux de transduction, et active les voies de mort cellulaire programmée ou apoptose (**Vishwanath *et al.*, 1986**). De plus une glycation des résidus lysine du collagène inhibe leur dégradation, favorisant la formation d'une fibrose myocardique ; une des causes de la cardiomyopathie diabétique chez l'homme comme chez l'animal (**Haunstetter & Izumo, 1998**). D'après l'étude de **Regan *et al* (1974)** réalisée sur des chiens diabétiques, une augmentation du tissu conjonctif interstitiel, en l'absence des dommages au niveau des

myocytes à été observée un (1) an après l'induction du diabète. Une augmentation de la fibrose interstitielle est également observée au niveau des cœurs de rats diabétiques (**Fischer et al., 1981 ; Fredersdorf et al., 2004**). Parallèlement à cette fibrose myocardique, l'hypertrophie ventriculaire constitue une des caractéristiques essentielles de la cardiomyopathie diabétique. Cette hypertrophie ventriculaire est retrouvée dans les études épidémiologiques de **Hamby et al (1974)** chez des patients diabétiques présentant des complications sévères et une insuffisance cardiaque. En effet, ces patients présentent une hypertrophie myocardique associée à une augmentation du poids du cœur. Les études expérimentales réalisées chez l'animal aboutissent à la même conclusion que les études épidémiologiques, selon laquelle une hypertrophie cardiaque est induite par le diabète.

Chez les diabétiques où une utilisation moins importante du glucose au niveau du cœur est observée (**Feuvray et al., 1979**), l'oxydation des AG peut participer à plus de 90% de la production d'énergie (**Morgan et al., 1961 ; Randle, 1978**). En effet, le cœur diabétique est relié aux AG presque exclusivement pour sa production d'énergie. Il est estimé que le cœur diabétique peut recevoir 90% de ses besoins en énergie par l'oxydation de ces AG. Ceci est associé, à un défaut primaire de la stimulation de la glycolyse et de l'oxydation du glucose (**Wall & Lopaschuk, 1989**). En effet, une diminution significative des stocks et de l'utilisation myocardiques de glucose a été observée aussi bien dans des cardiomyocytes isolés de rats diabétiques (**Chen et al., 1984**) que chez des patients diabétiques (**Ohtake et al., 1995**). En effet, **Garvey et al. (1993)** ont mis en évidence une diminution de 53 % de l'activité de transport du glucose dans les vésicules de sarcolemme cardiaque chez des rats traités à la STZ comparés à des animaux contrôles. Ces données sont à mettre en parallèle avec la diminution du nombre de transporteurs de glucose (GLUT1 et GLUT4) au niveau du sarcolemme de la cellule cardiaque lors du diabète (**Eckel & Reinauer, 1990 ; Garvey et al., 1993 ; Stanley et al., 1994 ; Osborn et al., 1997 ; Depré et al., 2000**). Parallèlement à ce transport du glucose altéré, l'augmentation du métabolisme des AG (**Randle et al., 1964**), liée à des niveaux élevés d'AG libres, contribue également à la moindre utilisation du glucose par le myocarde diabétique. En effet, l'oxydation des AG a un effet inhibiteur sur le complexe pyruvate déshydrogénase et ce faisant sur l'oxydation du glucose (**Wall & Lopaschuk, 1989**).

Ainsi, un transport du glucose altéré associé à une augmentation du métabolisme des AG dans le tissu myocardique diabétique constituent les principales altérations métaboliques du myocarde diabétique. Ces altérations semblent être la 1^{ère} cause de la pathogénèse de cette

maladie spécifique du myocarde (**Rodrigues et al., 1998**). Néanmoins, il est important de noter que ces désordres métaboliques sont directement dus à l'état d'hyperglycémie induit par le diabète et qu'ils sont largement insulino-réversible puisque l'amélioration du contrôle métabolique par le traitement des animaux diabétiques avec de l'insuline renverse ces désordres (**Garvey et al., 1993**).

- Cette étude ne montre aucune différence du poids relatif des reins ce qui est en accord avec (**Soudani et al., 2010**), et des testicules entre les groupes traités .

2. Effet du sélénium sur les paramètres biochimiques sanguins

- Dans cette étude l'administration du sélénite de sodium par voie intra péritonéale à une dose de 1.89 mg/kg/j pendant 21 jours a diminué significativement la glycémie chez les rats diabétiques alloxaniques ce qui est en accord avec les travaux réalisés par : **Mc Neil et al., 1991 ; Ding, 1997 ; Ezaki, 1990 ; Xi-qun et al., 2003**. Avec une normalisation de la glycémie chez le lot traité par insuline (**Xi-qun et al., 2003**).

Mc Neil et al., (1991) ont montré que le sélénite de sodium possède un effet mimétique à l'insuline chez les rats après une injection intra péritonéale de 10 – 15 µmol/kg/j de sélénite de sodium pendant sept (07) semaines (restaure la glycémie). Autre étude (**Ghosh et al., 1994**), a obtenu le même résultat après administration du sélénite par voie orale.

La supplémentation du sélénium chez les diabétiques a un effet bénéfique sur la glycémie. Premièrement il intervient dans la stimulation de l'utilisation de glucose en régulant le métabolisme glucidique ; glycolyse, gluconéogenèse, synthèse d'acides gras (FAS) et la voie des pentose phosphate (**Stapleton et al., 1997, Hei et al., 1998**). Deuxièmement le sélénium active les enzymes en cascade indispensables dans l'induction du signal insulinique (**Stapleton, 2000**) , de plus le sélénium restaure partiellement la traduction de l'ARNm et l'activité des deux enzymes clés de la glycolyse ; glucokinase et pyruvate kinase. Il diminue l'activité de la majorité des enzymes de la néoglucogenèse et la phospho enol pyruvate carboxy kinase (**Becker et al., 1996**), aussi le sélénium est capable de restaurer l'activité des enzymes de la lipogenèse, glucose 6 phosphate déshydrogénase (G6PDH) et FAS (**Berg et al., 1995**).

- Dans cette étude l'activité enzymatique de la G6PDH est diminuée (22.62%), chez les DNT par rapport aux témoins ce qui est en accord avec les résultats de **Yizhen et al (2005)**. L'administration de l'insuline et du sélénium a augmenté cette activité enzymatique de 15% et 20% respectivement par rapport aux DNT ; donc le sélénium a presque normalisé cette

activité enzymatique ce qui concorde avec les résultats obtenus par **Zhang & Stanton (2000)**. La diminution de l'activité de la G6PDH est due à l'état du stress oxydatif chez les diabétiques (les radicaux libres générés au cours de diabète), ainsi que la peroxydation lipidique prouvée par le dosage du MDA. La modification des protéines, et des biomolécules par les produits de la peroxydation lipidique joue un rôle majeure dans la pathogénèse associée aux dommages radicalaires (**Luke et al., 1993**).

Le 4HNE comme le MDA est un produit de la peroxydation lipidique qui peut réagir avec les macromolécules biologiques et plus particulièrement les protéines ce qui provoque leur modification (**Esterbauer et al., 1991 ; Uchida & Stadtman, 1992**).

Uchida & Stadtman (1992), ont identifié l'adduit histidine-HNE comme un produit majeur de plusieurs protéines traitées par le 4-HNE. Alors que **Luke et al (1993)** ont incubés la G6PDH avec le 4-HNE et ont trouvé une diminution de l'activité enzymatique de cette enzyme. Cette diminution est due à la réaction du résidu lysine de la G6PDH avec la double liaison en C3 du 4-HNE (figure 46).

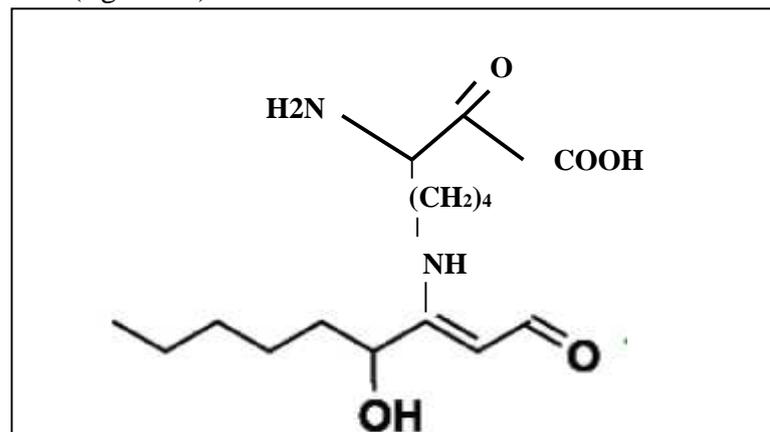


Figure 46. Formation d'adduit 4-HNE-Lysine de la G6PDH (**Luke et al., 1993**).

Autre étude (**Zhang et al., 2000**), réalisée sur des cultures de cellules endothéliales aortiques bovines a montré que les concentrations élevées en glucose provoquent une augmentation de l'activité enzymatique de la protéine kinase A(PKA), et la phosphorylation de la G6PDH et par conséquent une inhibition de l'activité de la G6PDH.

- Une diminution de taux de l'insulinémie (73%) chez le lot DNT par rapport au témoin a été enregistrée. Cette diminution est dû à la destruction des cellules des îlots de langerhans par l'alloxane (**Ankur & Shahjad, 2012 ; Lenzen, 2008**). L'utilisation de l'insuline et du sélénium chez les rats diabétiques à augmenter la concentration sérique de l'insuline par 69%

et 66% respectivement par rapport au DNT. Ce résultat est en accord avec les travaux réalisés par **Mary et al., 1998 ; Eddoks et al., 2005**. Donc le prétraitement par le sélénium a protégé les îlots de Langerhans contre les attaques radicalaires provoquées par l'alloxane.

- Nous avons constaté également chez le lot diabétique non traité une augmentation de la concentration sérique en urée et créatinine par 55%, 20% respectivement par rapport au témoin (TS), ces deux paramètres sont des marqueurs du dysfonctionnement rénal, leur augmentation signifie une insuffisance rénale (**Almadal & Vilstrup, 1988**). Alors que chez le lot DTSe, nous avons enregistré une diminution de l'urémie et de la créatininémie par 25% et 15% respectivement par rapport au DNT. Cette supplémentation du sélénium a fait diminuer significativement la glycémie et donc a protégé le tissu rénal des dommages qui peuvent être provoqués suite à l'hyperglycémie prolongée. D'après **WOLF (2005)** l'hyperglycémie et les protéines modifiées par l'hyperglycémie telles que les produits d'amadori et les AGE, jouent un rôle clé dans la survenue de la néphropathie diabétique et l'insuffisance rénale.

- Comparant au témoin, les résultats concernant le taux sérique de la bilirubine totale et directe montrent une augmentation caractéristique chez le lot DNT (55%, 21%) respectivement ce qui signifie les dommages hépatiques parce que, la bilirubine doit être captée par les cellules hépatiques (hépatocytes) après dissociation avec l'albumine, Ces dommages sont confirmés par l'activité des enzymes hépatiques. De plus la diminution de la synthèse des protéines particulièrement de l'albumine, qui est le principal transporteur de la bilirubine (**El-Demerdash et al., 2004**). Tandis que le traitement par le sélénite de sodium a rétablit les valeurs à la normale.

- Nos résultats montrent une diminution de la concentration sérique du magnésium avec une différence très hautement significative (14%, 15%, 23%), chez le lot DNT par rapport au TS, TTins et TTSe respectivement. Cette baisse de la magnésémie est dû à une diminution de la réabsorption tubulaire, a été confirmée par le dosage de l'urémie et de la créatininémie (**Bernard, 1985 ; Flechet, 1990**).

- En ce qui concerne les enzymes hépatiques (TGO et TGP), nous avons remarqué une augmentation significative de leur activité sérique chez rats diabétiques non traités (DNT) par rapport aux témoins sains (TS), témoins traité par le sélénium (TTSe) et diabétiques traités par le sélénium (DTSe). Ceci est expliqué par la destruction des cellules hépatiques (cytolyse hépatique) par les substances toxiques (effet hépatotoxique de l'alloxane) (**Barbosa, 2006**). De plus l'augmentation des transaminases est expliquée par l'accumulation des acides aminés comme l'alanine et l'acide glutamique dans le sang provenant de la dégradation des protéines du corps. Ainsi ces acides aminés peuvent se transformer sous l'action des transaminases en

composés carboxyliques tel que l'acide céto-glutamique et l'acide pyruvique puis en glucose, ce qui traduit la forte activité enzymatique des transaminases. Alors nos résultats montrent que le traitement des rats diabétiques par le sélénite de sodium à diminuer significativement l'activité enzymatique des transaminases par rapport aux rats DNT, ce qui signifie que le sélénium inhibe les dommages hépatiques causés par l'alloxane (**Meral et al., 2004 ; Murray et al., 1990 ; Mccarthy et al., 1980 ; Serap & Ismail, 2003 ; Kade et al., 2008**)

- L'augmentation de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline chez le lot DNT confirme l'atteinte du tissu hépatique. Cette augmentation peut être dû principalement à la fuite de cette enzyme du cytosol du foie dans la circulation sanguine (**Navarro et al., 1993**). Cependant, l'administration du sélénium pendant 21 jours consécutifs pourrait restaurer l'activité de cette enzyme.

- Pour l' amylase sérique, nos résultats ont montré une diminution très claire de l'activité enzymatique de cette enzyme chez les rats DNT par rapport à ceux témoins (**Navarro et al., 1993**). Ceci est en accord avec une autre constatation qui a montré que l'activité enzymatique de l' amylase pancréatique subit également une diminution chez les rats diabétiques (**Liu et al., 2007**). On peut expliquer cette diminution par la nécrose au niveau du pancréas induit par l'alloxane et par conséquent le blocage des enzymes pancréatiques (**Hincu et al., 2006**). De plus la peroxydation lipidique joue un rôle majeure dans l'inhibition de plusieurs enzymes (**Luke et al., 1993**). Alors que le traitement des rats par le sélénium a amélioré significativement cette activité enzymatique.

- Le plus important résultat de cette étude est l'effet protecteur qu'exerce le sélénium sur la fonction cardio-vasculaire chez le diabétique.

L'étude du bilan lipidique montre une augmentation très hautement significative de taux de cholestérol total, triglycérides, LDL-c, lipides totaux avec une diminution significative de l'HDL-c chez le lot diabétique non traité comparé au témoin, ce qui en accord avec les résultats obtenus par : **Opie, 1970 ; Rodrigues & McNeill, 1986 ; Rodrigues et al., 1986 ; Mary et al., 1998**. Le traitement par l'insuline à améliorer les paramètres du bilan lipidique chez les rats diabétiques, alors que le sélénium à normaliser ces paramètres, ce qui se concorde avec les constatations de : **Veki et al., 1973 ; Viegas et al., 1995 ; Mary et al., 1998**. Une augmentation de la concentration des lipides sanguins à un effet directe sur la fonction cardiaque (**Opie, 1970**). Le sélénium est un cofacteur de la GPx, il prévient la peroxydation lipidique (**Little & Brien, 1968**), assure une protection directe des cellules endothéliales contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui sont impliquées dans

l'athérosclérose (Yagi, 1984 ; Hennig & Chow, 1988). Le sélénium intervient dans la régulation du métabolisme du cholestérol chez les rats (Stone *et al.*, 1986), chez les humains (Luoma *et al.*, 1990), et la concentration sérique du sélénium est inversement proportionnelle à la concentration des paramètres du bilan lipidique sanguin (Bukkens *et al.*, 1990 ; Salonen *et al.*, 1988).

Koehler *et al* (1988), ont montrés que les patients subissent un infarctus du myocarde ayant un taux bas du sélénium plasmatique comparés aux témoins sains, et une perfusion de 1 à 3 mg/kg de sélénite de sodium à sauver ces patients. De plus le sélénium assure une protection des cardiomyocytes des nouveaux né d'où il prévient des dommages oxydatifs qui sont dus à l'hyper activité des xanthines et xanthine oxydase (Zhong *et al.*, 1990). Le sélénium en association avec la vitamine E est connu par son effet cytoprotecteur contre les dommages radicalaires, il est utilisé pour prévenir et traiter la maladie de Keshan; cardiomyopathie dû à une carence en sélénium (Fordyce, 2005). Théoriquement les diabétiques sont exposés aux maladies cardiaques, et le sélénium à un effet bénéfique sur l'homéostasie de glucose et un effet cardio- protecteur directe (Mary, 1998).

On peut faire l'hypothèse suivante : l'augmentation du stress oxydant et la diminution du sélénium chez le sujet diabétique participe aux complications vasculaires fréquentes.

Cette conclusion est confortée par l'augmentation du stress oxydant observé chez les obèses (Frukawa *et al.*, 2004), et les diabétiques (Dondona *et al.*, 2005).

3. Effet du sélénium sur les paramètres biochimiques tissulaires

- Le glycogène est la forme de stockage intracellulaire primaire de glucose et ses niveaux dans divers tissus sont une réflexion directe de l'activité de l'insuline car cette hormone favorise le dépôt intracellulaire de glycogène en stimulant la glycogène synthétase et en inhibant la glycogène phosphorylase (Valdiguie, 2000).

Nos résultats montrent une diminution significative dans la teneur hépatique en glycogène chez le lot diabétique non traité par rapport aux lots traités, cette diminution est due à la destruction sélective des cellules des îlots de Langerhans par l'alloxane, ayant comme résultat une diminution de l'insulinémie (Zhong *et al.*, 2004). Sabu *et al* (2002) pensent que cette diminution pourrait être due à une inhibition de l'activité enzymatique du glycogène synthétase et/ou hyper activité du glycogène phosphorylase. De plus La modification des protéines, et plus particulièrement les protéines enzymatiques par les produits de la peroxydation lipidique inhibe ces enzymes (Luke *et al.*, 1993), c'est pour cela que le traitement par le sélénium à deux effets ; d'une part un effet directe sur la protection des

cellules des îlots de langerhans et donc sur la libération de l'insuline, d'autre part il diminue la peroxydation lipidique.

- L'étude des paramètres du stress oxydant dans les tissus montre une diminution très hautement significative du taux de glutathion réduit (GSH) dans les tissus ; foie, rein, cœur et testicules chez le lot diabétique non traité comparé aux autres lots de traitement, ce résultat a été confirmé par **Vadde & Rama, 2008 ; Venkateswaran & Pari, 2002 ; Murat *et al.*, 2004 ; Nahla *et al.*, 2006 ; Meral *et al.*, 2004**. Dans les conditions d'hyperglycémie, le glucose est utilisé par la voie des polyols et se transforme en sorbitol, cette réaction consomme le NADPH, ce dernier est indispensable pour la régénération des molécules de glutathion par l'enzyme glutathion réductase ce qui explique la diminution de la glutathion chez les diabétiques (**West, 2000 ; Baynes, 1991**). De plus le taux de GSH est diminué en raison du taux élevé de superoxyde et les radicaux libres le GSH est convertit en GSSG (glutathion oxydé) (**Loven *et al.*, 1986 ; Bedwal, 1983**). Le traitement par le sélénite de sodium a rétabli d'une manière significative le taux de GSH par rapport aux rats DNT ce qui en accord avec les travaux de **Kade *et al.*, 2008 ; Xi-Qun *et al.*, 2004 ; Nahla *et al.*, 2006 ; Barbosa *et al.*, 2006**. Le diabète provoque une diminution de GSH dans le tissu cardiaque ce qui conduit à un stress oxydatif, alors que le sélénite de sodium augmente cette concentration (**Meister *et al.*, 1983 ; Murat *et al.*, 2004**).

- Les enzymes antioxydantes sont considérées comme la première ligne de défense de l'organisme contre les radicaux libres, d'où elles préviennent l'oxydation des macromolécules biologiques. Au cours de notre étude nous avons enregistré une diminution de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) dans les tissus ; reins (**Soudani *et al.*, 2010**), foie, cœur (**Murat & Belma, 2005**), et testicules chez les rats diabétiques non traités comparés aux témoins, et une diminution significative de l'activité enzymatique de la catalase dans le tissu rénal (**Soudani *et al.*, 2010**), hépatique et cardiaque chez les rats diabétiques non traités par rapport aux autres traités.

Le maintien de l'activité des enzymes anti-oxydantes est lié à la production de NADPH qui est le principal réducteur cellulaire exemple : le NADPH est un cofacteur de la catalase et l'activité de cette enzyme dépend de ce cofacteur (**Gaetani *et al.*, 1994 ; Kirkman & Gaetani, 1984 ; Kirkman *et al.*, 1999**), aussi le NADPH sert de cofacteur de la glutathion réductase qui catalyse la réduction de la forme oxydée de glutathion (GSSG), ce glutathion réduit (GSH) est le majeur piègeant des radicaux libres. La majeure source de NADPH est la glucose-6- phosphate déshydrogénase (G6PDH) qui catalyse la 1^{ère} réaction de la voie des pentoses phosphate (**Pandolfi *et al.*, 1995**). Notre étude a montré une diminution significative

de taux de NADPH (diminution de l'activité enzymatique de la G6PDH), et par conséquent diminution de l'activité enzymatique de la GPx et la catalase. Et la diminution de l'activité enzymatique de la G6PDH à été observée dans le tissu hépatique (**McDermott et al., 1995**), cardiaque (**Kuroda et al., 1990 ; Tarach, 1978**) et rénal (**Yizhen et al., 2005**) chez les modèles animaux diabétiques (**Yizhen et al., 2005**). L'administration du sélénium à normaliser les activités enzymatiques de la GPx et la catalase dans les tissus étudiés, ce qui en accord avec les suggestions de :**Soudani et al, (2010)**.

- Concernant la glutathion S-transférase (GST), cette enzyme joue un rôle important dans la désintoxication des xénobiotiques et/ou dans la protection contre des métabolites nocifs générés après la dégradation des macromolécules suite à leur exposition au stress oxydant (**Mulder et al., 1999**). D'après nos résultats on observe une augmentation très hautement significative de la GST dans les tissus étudiés (foie, reins, cœur et testicules) chez le lot DNT par rapport aux autres lots de traitement ce résultat est confirmé par autres études ; (**Nuriye & Belma, 2005 ; Mukherjee et al., 1998**). L'augmentation de l'activité de cette enzyme est une réponse physiologique pour compenser les altérations qui sont dus aux radicaux libres (**Nuriye & Belma, 2005**). donc la GST est impliquée dans l'élimination des radicaux libres générés au cours de diabète (**Xu et al., 2002**). Après la supplémentation du sélénium pendant 21 jours, l'activité enzymatique de la GST dans les organes étudiés, revient presque à la normale (**Nuriye & Belma, 2005 ; Mukherjee et al., 1998**). Ceci est dû à l'effet antioxydant du sélénium, qui est un cofacteur de nombreuses enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase GPx, la thiorédoxine réductase, où l'activité de ces enzymes est très dépendante de l'apport en sélénium (**Mckenzie et al., 2002 ; Favier, 2003 ; Théron & Denis, 2005**).

- Du fait de la difficulté de la mesure des radicaux libres (réactivité intense, demi-vie extrêmement courte, très faible concentration) ; des marqueurs indirects sont déterminés. Ces marqueurs sont les produits secondaires de la peroxydation lipidique. Il s'agit de substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS). Le dosage de TBARS est facile à mettre en œuvre, mais manque de spécificité (**Lefevre et al., 1998**). Au cours de notre travail nous avons enregistré une augmentation très hautement significative du taux de MDA dans les tissus (foie, reins, cœur et testicules), chez les rats diabétiques non traités comparés aux témoins. Ce résultat est en accord avec autres études : **Durdi et al., 2005 ; vadde & Rama, 2008, Mukherjee et al., 1998 ; Abbas et al., 2003 ; Yizhen et al., 2005 ; Manar et al., 2007 ; Xi-qun et al., 2004**. L'administration de l'insuline à diminuer significativement le taux de l'MDA dans les tissus étudiés (**Abbas et al., 2003 ; Yizhen et al., 2005 ; Manar et al.,**

2007 ; **Xi-qun et al., 2004**), ainsi que l'administration du sélénium (**Mukherjee et al., 1998 ; Manar et al., 2007 ; Xi-qun et al., 2004**).

4. Effet du sélénium sur l'histologie des organes

En ce qui concerne l'histologie ; le pancréas des rats rendus diabétiques présente des îlots nécrotiques avec une destruction des populations cellulaires, notamment les cellules β et par conséquent diminution voir disparition du nombre des îlots de Langerhans par champ microscopique. Ceci est dû à l'effet cytotoxique de l'alloxane qui se comporte comme un agent relatif d'inhibition enzymatique ayant des conséquences négatives sur la sécrétion exocrine pancréatique, procès accompagné par un diabète typique dû à la défection apparue de la sécrétion insulinaire (**Hincu et al., 2006**).

En revanche, l'histologie pancréatique des rats qui ont subi un prétraitement oral par le sélénium à une dose de 2mg/kg/j pendant 10 jours puis par voie intrapéritonéale (1.89 mg/kg/j) pendant 21 jours après l'induction du diabète est comparable à celle des rats normaux par la distribution et la forme intacte des îlots de Langerhans. Il est, peut-être, constatable que le sélénium possède des effets préventifs sur la dépréciation du pancréas.

- L'étude histologique des organes (foie, reins et testicules), ne montre aucune variation pathologique.

CONCLUSION
&
PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le stress oxydant et ses effets sur les cellules de l'organisme est un phénomène très étudié, chez l'homme comme chez l'animal, car il est responsable de l'induction de plusieurs maladies et peut entraîner des lésions graves. Chez les diabétiques l'hyperglycémie prolongée est la première stratégie des complications de diabète (neuropathie, rétinopathie, cardiopathie et néphropathie), à cause de la génération des radicaux libres et la peroxydation lipidique. Les conséquences d'une attaque radicalaire des biomolécules peuvent être quantifiées indirectement par la mesure de la concentration en produits résultant de cette attaque ainsi que des composés participant à la protection anti radicalaires.

Le travail que nous avons mené est consacré à l'étude de l'effet du sélénite de sodium sur l'évolution du poids corporel, l'histologie des organes ainsi que le bilan biochimique sanguin et tissulaire chez le rat wistar. Notre objectif était de savoir si la supplémentation du sélénium sous la forme minérale à un effet sur la prévention des complications du diabète. A la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que :

- L'injection intra péritonéale de l'alloxane à 150 mg/ kg du poids corporel chez les rats mâles adultes a induit des perturbations du métabolisme glucidique, lipidique et protéique, procès accompagné par un déficit pondéral remarquable.
- L'alloxane a provoqué également des altérations histologiques du pancréas révélées par la dégénérescence des îlots de Langerhans et la mort cellulaire par nécrose et par conséquent diminution du nombre d'îlots de langerhans par champ microscopique. L'étude histologique du foie, reins et testicules ne montre aucune altération discutable.
- Le prétraitement par le sélénium par voie orale à raison de 2 mg/kg/j pendant 10 jours, puis 1.89 mg/kg/j par voie intra péritonéale aux rats diabétiques pendant 21 jours n'a pas d'effet sur l'évolution du poids corporel, mais à provoquer une réduction significative de la glycémie.
- En ce qui concerne le bilan lipidique (cholestérol, HDL-c, LDL-c, triglycérides, lipides totaux), le traitement par le sélénium à rétabli les valeurs à la normale ce qui traduit l'effet protecteur du sélénium sur la fonction cardio-vasculaire.
- Le sélénium a protégé le tissu rénal de l'effet de l'hyperglycémie et se manifeste par une urémie et créatininémie normales. Ainsi que la magnésémie est rétabli à la normale.

- L'effet du sélénium sur la fonction hépatique et pancréatique se traduit par une restauration significative des paramètres de la fonction hépatique ; TGO, TGP, PAL et bilirubines (T&D), ainsi que l'amylasémie.

- Le sélénium par son action antioxydante à diminuer la peroxydation lipidique, et à augmenter la défense antioxydante non enzymatique ; glutathion réduit (GSH), enzymatique ; glucose -6- phosphate deshydrogénase (G6PDH), glutathion peroxydase (GPx), glutathion -S- transférase (GST) et catalase.

En perspectives, il serait intéressant de développer cette recherche de point de vue opérationnel par approfondissement de la connaissance sur :

- Etude immunohistochimique des organes.
- Appréciation de l'activité antioxydante du sélénium à travers le dosage de tous les éléments de la cascade du système anti oxydant sérique et tissulaire.
- Elucider le mécanisme d'action du sélénium et son efficacité comme agent anti diabétique.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbes, Ali.** Mahdi., Anu, Chandra., Raj, Kumar., Singh., Sanjeev., Shukla, L.C., Mishra and Souhail, Ahmes.(2003). Effect of herbal hypoglycemic agents on oxidative stress and antioxidant status in diabetic rats; *Ind. J. Clin. Biochem*, 18(2), 8-15.
- Abraham NG,** Kappas A (2008). Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev* 60, 79–127.
- Adachi,T.,** Ohta, H., Hirano, K., Hayashi,K., Marklund,S.L. (1991). Non enzymic glycation of human extra cellular superoxide dismutase. *Biochem.J.vol* 279, p263-267.
- Aebi.** (1984). Catalase . In : L. Packer (Ed), *methods in enzymology*, Academic pres, Orlando, 105, 121-126.
- Almadal, T.P and Vilstrup, H.** (1988).Strict insulin treatment normalizes the organic nitrogen contents and the capacity of urea–N synthesis in experimental diabetes in rats *Diabetologica*; **31**, 114-118.
- Anderson HR, Stitt AW.** (1993). Induction of alloxan/streptozotocin diabetes in dogs: a revised experimental technique. *Lab Anim*; **27**, 281-285.
- Anderson, H.R and Stitt, A.W.** (1993).Induction of alloxan / streptozotocin diabetes in dogs: a revised experimental technique .*Lab. Anim*; **27**, 281-285.
- Ankur Rohilla and Shahjad Ali.** (2012) Alloxan induced diabetes: mechanisms and effects. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biochemical Sciences*. Vol :3, 818-823.
- Atkinson,M.A., Maclaren, N.K** (1994). The pathogénese of insulin- dependent diabetes mellitus. *N Eng/ J Med*; 331, 1424-1436.
- Barbosa, N.B.V., Rocha, J.B.T., Wandracek, D.C., Perottoni, J., Zeni, G and Nogueira; W.** (2006). Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions* Vol 163, 230-238.
- Barbosa, N.B.V., Rocha, J.B.T., Wandracek, D.C., Perottoni, J., Zeni, G and Nogueira; W.** (2006). Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions* Vol 163, 230-238.
- Baynes, J.W.** (1991). Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*; **40**, 405-412.
- Beaudeau, J.L. and Vasson, M.P.** (2005). Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygéné : Radicaux libres et stress oxydant Aspects biologiques et pathologiques.

- Coordinateurs Delattre J, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot D. Editions Lavoisier, Paris, 45-86.
- Becker, D.J., Reul, B., Ozcelikay,A., Buchent,J. P., Henquin, J.C. and Brichard, S.M.** (1996). oral selenate improves glucose homeostasis and partly reverses abnormal expression of liver glycolytic and gluconeogenic enzyme in diabetic rats. *Diabetologia*; 39, 3-11.
- Bedwal, R.S., Nair, N., Sharma, M.P., Mather, R.S.** (1983). selenium its biological perspectives. *Med Hypothesis*; Vol 41, 150-159.
- Berg, E.A., wU; J.Y.,Campbell, L., Kagey, M. And Stapleton,S.R.** (1995). Insulin like effect of vanadate and selenate on the expression of G6PD and fatty acid synthase in diabetic rats. *Biochimie*, 77, 919-924.
- Berg, EA. Wu, J.Y., Campbell, L., Kagey, M. and stapleton,S.R.** (1995). Insulin like effect of vanadate and selenate on the expression of G6PDH and fatty acid synthase in diabetic rats. *Biochemie* 77, 919-924.
- Bernard, S.** (1985). *Biochimie clinique*, Maloine, Paris.
- Beyer RE** (1990). The participation of coenzyme Q in free radical production and antioxidation. *Free Radic Biol Med* 8, 545–565.
- Bindoli A, Cavallini L, Jocelyn P** (1982). Mitochondrial lipid peroxidation by cumene hydroperoxide and its prevention by succinate. *Biochim Biophys Acta* 681, 496–503.
- Blakytny,R., Harding, J.J.**(1992). Glycation inactivates glutathione reductase. *Biochem J.*, vol 288,p 303-307. **Adachi,T., Ohta, H., Hirano, K., Hayashi,K., Marklund,S.L.** (1991). Non enzymic glycation of human extra cellular superoxide dismutase. *Biochem.J.*vol 279, p263-267.
- Bonnefont-Rousselot, D., Bastard,J.P., Jaudon, M.C., and Delallo, J.**(2000). consequences of the diabetic status on the oxidant/ anti-oxidant balance. *Diabetes and metabolism*. Vol, 26 , 163-176.
- Bookchin,R.M., Gallop,P.M.**(1968). Structure of haemoglobin Alc: nature of the N-Terminal beta chain blocking group. *Biochem. Biophys. Res. Commun*,vol 32(1), p 86-93.
- Bors W, Heller W, Michel C, Satan M** (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging- efficiencies, *Methods in Enzymology* 186, 343–355.
- Bourajjaj, M., Stehouwer, C.D., van Hinsbergh, V.W. and Schalkwijk, C.G.** (2003). Role of methylglyoxal adducts in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *Biochem Soc Trans*, 31, 1400-2.

- Bradford, M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteinbinding, *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Buccolo, G.** Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes.(1973) *Clin Chem*: 19(5), 476-482.
- Bukkens.S, Vos. N, Kok. F.J, Schouten. E.G, Bruizin. A.M, and Hofman. A.**(1990). *J.Am. Coll.nutr.*9, 128-135.
- Bunnell E, Pacht ER** (1993). Oxidized glutathione is increased in the alveolar fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 148, 1174–1178.
- Burk, R.F.** (1994). *Selenium in biology and human health.* Springer-Verlag . 221.
- Cadet J, Bellon S, Berger M, Bourdat AG, Douki T, Duarte V, Frelon S, Gasparutto D, Muller E, Ravanat JL, Sauvaigo S** (2002). Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol Chem* 383, 933–943.
- Cadet J, D'Ham C, Douki T, Pouget JP, Ravanat J-L, Sauvaigo S.** (1998). Facts and artifacts in the measurement of oxidative base damage to DNA. *Free Radic Res*; 2:541-50.
- Casagrande S, Bonetto V, Fratelli M, Gianazza E, Eberini I, Massigna T, Salmona M, Chang G, Holmgren A, Ghezzi P** (2000). Glutathiolation of human thioredoxin: a possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems. *Cell Mol Biol* 16, 162–170
- Chen V, Ianuzzo CD, Fong BC, Spitzer JJ** (1984) The effects of acute and chronic diabetes on myocardial metabolism in rats. *Diabetes* 33(11):1078-84.
- Coleman, M.D., Rustioni,C.V.**(1999). Resistance to glutathione depletion in diabetic and non-diabetic human erythrocytes in vitro.*J.Pharm.pharmacol.*, vol 51, p 21-25.
- Cooke MS, Olinski R, Evans MD.** (2006). Does measurement of oxidative damage to DNA have a clinical significance? *Clin Chim Acta*; 365, 30-49.
- Cummings RC, Andon NL, Haynes PA, Park M, Fischer WH, Schubert D** (2004). Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress. *J Biol Chem* 279, 21749–21758.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Colombo R, Milzani A** (2003). Actin S-glutathionylation: evidence against a thiol-disulphide exchange mechanism. *Free Radic Biol Med* 35, 1185–1193.

- Dandona. P., Aljada.A., Chaudhuri.A., Mohanty.P., Garg.R.** (2005) Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes and inflammation. *Circulation*, vol ;111(11) , 1448-1454.
- De Zwart, L.L., Meerman, J.H., Commandeur, J.N. and Vermeulen, N.P.** (1999) Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med*, **26**, 202-26.
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ** (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324, 1–18.
- Del Corso A, Vilardo PG, Cappiello M, Cecconi I, Dal Monte M, Barsacchi D, Mura U** (2002). Physiological thiols as promoters of glutathione oxidation and modifying agents in protein S-thiolation. *Arch Biochem Biophys* 397, 392–398.
- Depre C, Young ME, Ying J, Ahuja HS, Han Q, Garza N, Davies PJA, Taegtmeyer H** (2000) Streptozotocin-induced changes in cardiac gene expression in the absence of severe contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 32: 985-996.
- Ding H., Pen R., Chen J.** (1997). Effect of selenite and *allitridi* on the diabetic mice, *Acta Nutr. Sini.* 19, 384–387.
- Dodig. S and Cepelak. I** (2004). The facts and contrevses about selenium. *Acta Pharmaceutica* 54:261-276.
- Douki T, Delatour T, Bianchini F, Cadet J.** (1996). Observation and prevention of an artefactual formation of oxidized DNA bases and nucleosides in the GC-EIMS method. *Carcinogenesis* 17, 347-353.
- Du, X.L., Edelstein, D., Dimmeler, S., Ju, Q., Sui, C. and Brownlee, M.** (2001) Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest*, 108, 1341-1348.
- Ducros, V., Favier, A.** (2004). Selenium metabolism. *EMC-endocrinologie.* 1, 19-28.
- Duffield, A., Thomson, C., Hili, K., Williams, S** (1999). An estimation of selenium requirements for new Zealanders. *Am J Clin Nutr*; 70, 896-903.
- Dukros, V., Faure, P., Ferry, M., Couzy, F., Biajoux, I., Favier, A** (1997). The sizes of the exchangeable pools of selenium in elderly women and their relation to institutionalization. *Br J Nutr*; 78, 379-396.
- Durdi .Q, Masomeh.H, Hamideh. D, and Timur. R.** (2005). Malondialdehyde and carbonyl contents in the erythrocytes of streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Diabetes & Metabolism.*13, 96-98.

- Eckel J, Reinauer H** (1990) Insulin action on glucose transport in isolated cardiac myocytes: signalling pathways and diabetes-induced alterations. *Biochem Soc Trans* 18(6):1125-7.
- Eddouks. M., Maghrani. M., Michel.J.B.** (2005) Hypoglycaemic effect of *Triticum repens* P.Beauv. in normal and diabetic rats. *Journal of Ethno-Pharmacology* 102, 228-232.
- El-Demerdash,F.M., Youcef, M.I and Abou El-Naga,N.I.** (2004) Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats.
- Ernster L, Dallner G** (1995). Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta* 1271, 195–204.
- ESCODD.** (2002). Comparative analysis of baseline 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mammalian cell DNA, by different methods in different laboratories: an approach to consensus. *Carcinogenesis*; 23, 2129-2133.
- ESCODD.** (2003). Measurement of DNA oxidation in human cells by chromatographic and enzymic methods. *Free Radic Biol Med*; 34, 1089-1099.
- Essig DA, Nosek TM** (1997). Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species? *Can J Appl Physiol* 22, 409–428.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jungens, G.** (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 13, 341.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., and Zollner. H.**(1991) *Free radical Biol. &Med.* 11,81-128.
- Eto Y, Kang D, Hasegawa E, Takeshige K, Minakami S** (1992). Succinate-dependent lipid peroxidation and its prevention by reduced ubiquinone in beef heart submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 295, 101–106.
- Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS** (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 567, 1–61.
- Evans PJ, Halliwell B** (1999). *Free Radicals and Hearing: Cause, Consequence, and Criteria.* *Ann N Y Acad Sci* 884, 19–40.
- Ezaki O.** (1990). The insulin-like effects of selenate in rat adipocytes, *J. Biol. Chem.* 265, 1124–1130.
- Farrel E C., Kaplan A.**(1984). *Magnesium.* Clin Chem The C.V. mosby Co. Si louis.Tronto. Princeton. pp 1065-1069.
- Favier, A.** (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques. L'actualité Chimique*, 108-115.
- Feuvray D, Idell-Wenger JA, Neely JR** (1979) Effects of ischemia on rat myocardial function and metabolism in diabetes. *Circ Res* 44: 322-329.

- Fischer VW**, Leskiw ML, Barner HB (1981) Myocardial structure and capillary basal laminar thickness in experimentally diabetic rats. *Exp Mol Pathol* 35(2):244-56.
- Fishbein, L.** (1991). Selenium. In: *Metals and their compounds in the environment. Occurrence, Analysis, and Biological. Relevance.* Merian E., (Ed.) VCH. Washington, DC, U.S.A. 1153-1190.
- Flechet, B.**(1990). Guide des Analyses Spécialisées, Laboratoires CERBA. Dans la Banque Télématique de la Société Française de Biologie Clinique.
- Flohe, L., Gunzler, W.A.** (1984). Analysis of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.* 105, 114–121.
- Fordyce, F.** (2005). Selenium deficiency and toxicity in the environment. In: Selinus O, Alloway B, Centeno JA, Finkelman RB, Fuge R, Lindh U and Smedley P (ed) *Essentials of medical geology.* Elsevier, Amsterdam, pp 373-415
- Fredersdorf S, Thumann C, Ulucan C, Griese DP, Luchner A, Riegger GA, Kromer EP, Weil J** (2004) Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovasc Pathol*13(1):11-9.
- Fridovich I** (1995). Superoxide radical and superoxide dismutase"s. *Annu Rev Biochem* 64, 97–112.
- Friedewald W.T., Levei R.I., Fridrickson D.S.** (1972). Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultracentrifugation . *Clin Chem*, 18, 499-502.
- Frukawa. S., Fujita. T., Shimabukuro.M., Iwaki.M., Yamada., Nakajima.Y., Nakayama. O., Makishima.M., Matsuda.M., Shimomura. I.** (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* Vol 114(12) , 1752-1761.
- Gaetani.GF, Kirkman.HN, Mangerini.R and Ferraris.AM.**(1994). Importance of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood* 84, 325-330.
- Ganther, H. E.** (1999). Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis.* 20(9), 1657-1666.
- Garvey WT, Hardin D, Juhaszova M, Dominguez JH** (1993) Effects of diabetes on myocardial glucose transport system in rat: implications for diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 264: H837-844.
- Ghafourifar, P. and Cadenas, E.** (2005) Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci*, 26, 190-5.
- Gomila, S. and Dallongeville, J.** (2003). Epidemiologie du syndrome metabolique". *Medecine et Nutrition*, 39, 89-94.

- Griffith OW, Mulcahy RT** (1999). The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 73, 209–267.
- Griffiths, H.R., Moller, L., Bartosz, G., Bast, A., Bertoni-Freddari, C., Collins, A., Cooke, M., Coolen, S., Haenen, G., Hoberg, A.M., Loft, S., Lunec, J., Olinski, R., Parry, J., Pompella, A., Poulsen, H., Verhagen, H. and Astley, S.B.** (2002) Biomarkers. *Mol Aspects Med*, 23, 101-208.
- Grove T H.** (1979). Effect of reagent pH on determination of HDL Cholesterol by precipitation with sodium phosphotungstate-magnesium *Clin Chem* 25:560.
- Guigliano,D., Ceriello,A., Paolisso,G.** (1995). Diabetes mellitus, hypertension and cardiovascular diseases : which role for oxidative stress. *Metabolism*, vol 44, p 363-368.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jacobi, W.B.** (1974). The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J.Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Haddad JJ Olver RE, Land SC** (2000). Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIF-1 α and NF- κ B redox sensitivity. Evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* 275, 21130–21139.
- Halliwell B** (1990). How to characterise a biological antioxidant. *Free Rad Res Commun* 9, 1–32.
- Halliwell B** (1996). Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Rad Res* 25, 275-283.
- Ham AJ, Liebler DC** (1995). Vitamin E oxidation in rat liver mitochondria. *Biochemistry* 34, 5754–5761.
- Hamby RI, Zoneraich S, Sherman L** (1974) Diabetic cardiomyopathy. *JAMA* 229(13):1749-54.
- Hassid C.H et Abraham S.** (1957). Chemical procedures for analysis of polysaccharides. *Methods Enzymol.*3 :34.
- Haunstetter A, Izumo S** (1998) Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res* 82(11):1111-29.
- Haygarth, P.M.** (1994). Importance and global cycling of selenium. In: Frankenberger, J., Benson, S. *Selenium in the Environment*. Marcel Dekker, New York. 1-28.
- Heffner, JE, Repine JE** (1989). Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis* 140, 531–554.
- Hei Y.J., Farahbakhshian S., Chen X** (1998). Stimulation of MAP kinase and S6 kinase by vanadium and selenium in rat adipocytes, *Mol. Cell. Biochem*, 178: 367–375.

- Helbock HJ, Beckman KB, Shigenaga MK, Walter PB, Woodall AA, Yeo HC Ames BN.** (1998). DNA oxidation matters: The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:283-93.
- Hennig. B and Chow. C.K.**(1988). *Free Radical Biol Med.* 4, p99-106.
- Hincu, M., Pantea, S., Anca, M., Coman, E.M et Mehedinti, T.** (2006). L'effet de l'alloxane sur l'histologie du tissu pancréatique. *Fascicula XVII, Anul V*
- Houlot, R.** (1984). *Techniques d'histopathologie et de cytopathologie.* Ed. Maloine, 19-21, 225-227.
- Hunt, J.V.** (1994). Glucose chemistry and atherosclerosis in diabetes mellitus. In: *Free radical in the environment, medicine and toxicology: critical aspects and current highlight.* Vol VIII. Eds. Richelieu Press. London, p137-162.
- Hutter E, Skovbro M, Lener B, Prats C, Rabol R, Dela F & Jansen-Durr P** (2007). Oxidative stress and mitochondrial impairment can be separated from lipofuscin accumulation in aged human skeletal muscle. *Aging Cell* 6, 245–256.
- Hwang H.J., Kim S.W., Lim J.M., Joo J.H., Kim H.O., Kim H.M et Yun J.W.**(2005) . Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by a medicinal mushroom *Phellinus baumii* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences* 76 : 3069–3080.
- Jain, S.K., McVie, R., Jaramillo, J.J. and Chen, Y.** (1998). Hyperketonemia (acetoacetate) increases the oxidizability of LDL + VLDL in Type-I diabetic patients. *Free Radic Biol Med*, 24, 175-81.
- Johansson, L., Gafvelin, G., Arner, E.S.J.** (2005). Selenocysteine in proteins properties and biotechnological use. *Biochim. Biophys. Acta.* 1726, 1-13.
- Jonas JC, Guiot Y, Rahier J, Henquin JC** (2003). Haeme-oxygenase 1 expression in rat pancreatic beta cells is stimulated by supraphysiological glucose concentrations and by cyclic AMP. *Diabetologia* 46, 1234–1244.
- Kade, I.J., Borgesv, C., Savegnago, L., bukun, E.O., Zeni, .G., Nogueira, C. W. G., Rocha, J. B. T.** (2008). Effect of oral administration of diphenyl diselenide on antioxidant status, and activity of delta aminolevulinic acid dehydratase and isoforms of lactate dehydrogenase, in streptozotocin-induced diabetic rats, *Cell Biol Toxicol : 1-10.*
- Kaplan A.** (1984). *Lipids.* Clin Chem The C.V. mosby Co. Si louis.Tronto. Princeton; 918-919.
- Kaplan A.**(1984). *Urea.* Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton; 1257-1260 and 437 and 418.

- Kaplan, A .** (1984). Bilirubin. Clin Chem. The C.V. mosby Co. Si louis.Tronto. Princeton; 1238-1241.
- Kaplan, L.A.** (1984). Glucose. Kaplan A et al .Clin chem. The C.V. mosby Co. Si louis.Tronto. Princeton; 1032-1036.
- Kinsky N** (1989). Antioxydants function of carotenoides. Free Rad Biol Med 7, 617–635.
- Kirkman.HN and Gaetani.GF.** (1984). Catalase: a tetrameric enzyme with four tighly bound molecules of NADPH. Proc Natl Acad Sci USA 81. P; 4343-4347.
- Kirkman.HN, Rolfo.M, Ferraris.AM and Gaetani.GF.** (1999). Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichimetry. J Biol Chem 274 p. 13908-13914.
- Klotz, L.O., Kröncke, K.D., Buchczyk, D.P., Sies, H.** (2003). Role of Copper, Zinc, Selenium and Tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. J. Nutr. 133, 1448S-1451S.
- Koehler H., Peters H.J., Pankau H., Duck H.J.**(1988). Selenium in cardiology and angiology. Biol Trace Elem Res 15, 157–167.
- Kohrle, J.** (1999). The trace element selenium and the thyroid gland. Biochimie. 81, 527-533.
- Kohrle, J.** (2000). The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. Cell. Mol. Life Sci. 57, 1853-1863.
- Kuroda.A, Saito.K and Tanaka.H.** (1990). Histochemical studies on the conduction system of diabetic rat hearts. Arch Histol Cytol 53, 193-198.
- Lautier D, Luscher P, Tyrrell RM** (1992). Endogenous glutathione levels modulate both constitutive and UVA radiation/hydrogen per-oxide inducible expression of the human heme oxygenase gene. Carcinogenesis 13, 227–232.
- Lefevre.G, Beljean-Leymarie. M and Beyerle.F.** (1998). Évaluation de la peroxydation lipidique par dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *Ann Biol Clin* 56, 305–319.
- Lenzen, S and Panen, V.** (1988).Alloxan: History and mechanism of action. *Diabetologia*; 31: 337-342.
- Lenzen. S.** (2008) The mechanisms of alloxan and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* ; 51, 216-226.
- Leverve XM, Guigas B, Detaille D, Batandier C, Koceir EA, Chauvin C, Fontaine E, Wiernsperger NF** (2003). Mitochondrial metabolism and type-2 diabetes: a specific target of metformin. *Diabetes Metab* 29, 6S88–6S94.
- Levine RL** (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* 32, 790–796.

- Little.C and Brien.PJ.O.** (1984). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31, 145-150.
- Liu, Z., Li, J., Zeng, Z., Liu, M and Wang, M.** (2007). The antidiabetic effects of Cysteinyll Metformin, a newly synthesized agent, in alloxan- and streptozocin-induced diabetic
- Lohr,GW. Waller, HD.** 1974. *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. Method of Enzymatic Analysis*,3rd Edition- Varlag Chemie, Wehnhheim; p.636.
- Loven, D., Schedl, H., Wilson, H., Daabees, T.T., Stegink, L.D., Diekus, M and Oberley, L.** (1986). Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and superoxide dismutase activities in organs of rats with streptozotocin induced diabetes. *Diabetes*; 35, 503-507.
- Luke, I., Szweda, Koji Uchidat, Lin Tsai, and Earl R. Stadtman.** (1993) Inactivation of glucose 6 phosphate dehydrogenase by 4-Hydroxy-2- nonenal. *Biological chemistry.* Vol. 268, 3342-3347;
- Luoma.P.V, Stengard.J, Korpela. H, Rautio. A ,Soutaniene.E.A, Suvanto. E and Marniemi.J.** (1990). *J.Intern. Med.* 227,p 287-289.
- Maiese K, Morhan SD & Chong ZZ** (2007). Oxidative stress biology and cell injury during type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Curr Neurovasc Res* 4, 63–71.
- Malloy, H.T.** (1937). The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J. Biol Chem.* 112, (2): 481-491.
- Manar. M, Nader.L.A, Eissa, Nariman. M, Gamil, and El-sayed.M.A.** (2007). Effect of nitric oxide, vitamine E and selenium on streptozotocin induced diabetic rats. *Saudi Pharmaceutical Journal*, Vol. 15, 23-32.
- Martin A** (2000). *Apports nutritionnels conseillés pour la population française.*
- Mary . L., Battell, Heather.L.M., Delgatty and John.H. McNeill.** (1998) Sodium selenate corrects glucose tolerance and heart function in STZ diabetic rats. *Molecular and cellular Biochemistry* 179, 27-34.
- Mccarthy, .D.M., Nicolson, J.A and Kim, Y.S.(1980).** Intestinal enzyme adaptation to normal diets of different composition; *Am. J. Physiol.* 239, 445–451.
- McCord JM, Fridovich I** (1988). Superoxide dismutase: the first twenty years (1968–1988). *Free Radic Biol Med* 5, 363–369.
- McDermott.BM, Flatt.PR and Strain.JJ.** (1994). Effects of copper deficiency and experimental diabetes on tissue antioxidant enzyme levels in rats. *Ann Nutr Metab* 3888, 363-369.

- Mckenzie, R.C., Arthur, J.R. Beckett, G.J.** (2002) . Selenium and the regulation of cell signaling, growth and 166 survival: molecular and mechanistic aspects, *Antioxid. Redox Signal.* 4, 339-351.
- McLellan, A.C., Thornalley, P.J., Benn, J. and Sonksen, P.H.** (1994). Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin Sci (Lond)*, 87, 21-9.
- Meister.A, Anderson.M.E.** (1983). *Annu. Rev. Biochem.* 52, 711-760.
- Meral, Koyuturk., Sevim, Tunali., Sehnaz, Bolkent., and Refiye, Yanardag .** (2004). Effect of vanadyl sulphate on liver of streptozotocine induced diabetic rats. Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Kadir Has University; vol 104, 233-245.
- Mootz, D., Jeffrey, G. A.** (1965). *Acta Cryst.* 19, 717- 725.
- Morel, Y. and Barouki, R.** (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J* 342 Pt 3, 481-96.
- Morgan HE,** Cadenas E, Regen DM, Park CR (1961) Regulation of glucose uptake in muscle. II. Rate-limiting steps and effects of insulin and anoxia in heart muscle from diabetic rats. *J Biol Chem* 236:262-8.
- Mukai K, Morimoto H, Okaiuchi Y, Nagaoka S.** (1993). Kinetic study of reactions between tocopheroxyl radicals and fatty acids. *Lipids* 28, 753–756.
- Mukherjee, B., Anbazhagan, S., Roy, A., Ghosh,R., Chatterjee, M.** (1998). Novel implication of the potential role of selenium on antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biomed et Pharmacother* 52, 89-95.
- Mulder. T.P, Court.D.A, and Peter. W.H.** (1999). Variability of glutathione-S-transferasein human liver and plasma, *Clin. Chem.* 45, p 355-359.
- Mullenbach GT, Tabrizi A, Irvine BD, Bell GI, Tainer JA, Halliwell RA** (1988). Selenocysteine's mechanism of incorporation and evolution revealed in cDNAs of three glutathion peroxidases. *Protein Eng* 2, 239–246.
- Murat .A and Belma. T.** (2006).Selenium prevents diabetes-induced alterations in $[Zn^{2+}]$ and metallothionein level of rat heart via restoration of cell redox cycle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290. p; H1071-H1080.
- Murat .A, Semir.O, Mehmt. U, Guy. V and Belma. T.** (2004). Effects of selenium on altered mechanical and electrical cardiac activities of diabetic rat. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 426, 84-86.

- Murray R.L.** (1984). Creatinine. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton . 1261-1266 and 418.
- Murray, R.** (1984). Alanine aminotransferase. Kaplan A et al .Clin chem. The C.V. Mosby Co. Si louis. Tronto. Princeton . 1088-1090.
- Murray, R.** (1984). Aspartate aminotransferase. Kaplan A et al .Clin chem. The C.V. Mosby Co. Si louis. Tronto. Princeton. 1112-116.
- Murray, R.K, Mayers ,P.K, Granner, D.K, and Rodwell, V.W.** (1990). Chemical constituents of blood and body fluids; in Harper's biochemistry 22nd edition: 679–693.
- Muruganandam,A., Tannous,M., Mutus, B.** (1994). ELISA for in vivo assessment of non enzymatically glycated platelet glutathione peroxidase. Clin. Bioch. Vol 27 (4). P 293-298.
- Nahla, S., Elshenaw, Y., Ismail, M., Abdel-Nabi.**(2006). Hypoglycemic effect of cleome droserifolia athanolic leaf extract in experimental diabetes, and on non enzymatic antioxidant, glycogen,thyroid hormone and insulin levels. Diabetologia Croatica 35-1.
- Naito H K.** (1984). High-density lipoprotein (HDL) cholesterol. Kaplan A. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton ; 1207-1213 and 437.
- Naito, H.K., Kaplan, A.** (1984). Cholesterol. Clin Chem the C.V Mosby CO. St Louis Toronto. Princlon :1194-11206 and 437.
- Navarro, C.M., Montilla, P.M., Martin, A., Jimenez, J and Utrilla, P.M.** (1993).Free radicals scavenger and antihepatotoxic activity of Rosmarinus, *Plant Medicine*; 59:312-314.
- Nejla Soudani, Mediha Sefi, Ibtissem Benamara, Tahia Boudawara and Najiba Zeghal.** (2010). Protective effects of selenium on chromium induced nephrotoxicity in adult rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety* .73, 671-678.
- Nemet, I., Varga-Defterdarovic, L. and Turk, Z.** (2004). Preparation and quantification of methylglyoxal in human plasma using reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Clin Biochem*, 37, 875-81.
- Neve, J., Favier, A.** (1989). Selenium in medecine and biology. Proceedings of the second international congress on trace elements in medicine and biology. Avoriaz, France.
- Niedernhofer, L.J., Daniels, J.S., Rouzer, C.A., Greene, R.E. and Marnett, L.J.** (2003) Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem*, **278**, 31426-33.

- Nuriye Nuray Ulusu and Belma Turan** (2005). Beneficial effects of selenium on some enzymes of diabetic rats heart. Humana Press Inc. Biological trace element research. Vol, 103: 207-215
- Odani, H., Shinzato, T., Matsumoto, Y., Usami, J. and Maeda, K.** (1999). Increase in three alpha,beta-dicarbonyl compound levels in human uremic plasma: specific in vivo determination of intermediates in advanced Maillard reaction. *Biochem Biophys Res Commun*, 256, 89-93.
- Ohtake T, Yokoyama I, Watanabe T, Momose T, Serezawa T, Nishikawa J, Sasaki Y** (1995) Myocardial glucose metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus patients evaluated by FDG-PET. *J Nucl Med* 36(3):456-63.
- Oldfield, J. E.** (1991). Some implications of selenium for human health. *Nutrition today*. 26, 4-6.
- Opie L.H.** (1970). Effect of fatty acid on contractility and rhythm of the heart. *Nature (London)* 227: 1055–1066.
- Osborn BA, Daar JT, Laddaga RA, Romano FD, Paulson DJ** (1997) Exercise training increases sarcolemmal GLUT 4 protein and mRNA content in diabetic heart. *J Appl Physiol* 82: 828-834.
- Ostergaard H, Tachibana C, Winther JR** (2004). Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. *J Cell Biol* 166, 337–345.
- Packer L** (1991). Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr* 53 1050S-1055S.
- Pandolfi.PP, Sonati.F, Rivi.R, Mason.P, Grosveld.F and Luzzatto.L.** (1995). Targeted disruption of the housekeeping gene encoding G6PD. *EMBO J*14, 5209-5215.
- Peng J, Jones GL, Watson K** (2000) Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. *Free Radic Biol Med* 28, 1598–1606.
- Pereverzev MO, Vygodina TV, Konstantinov AA, Skulachev VP** (2003). Cytochrome c, an ideal antioxidant. *Biochem Soc Trans* 31, 1312–1315.
- Petersen Shay K, Moreau RF, Smith EJ, Hagen TM** (2008). Is alpha-lipoic acid a scavenger of reactive oxygen species in vivo? Evidence for its initiation of stress signaling pathways that promote endogenous antioxidant capacity. *IUBMB Life* 60, 362–367.
- Pigeolet E, Remacle J** (1991). Susceptibility of glutathione peroxidase to proteolysis after oxidative alteration by peroxides and hydroxyl radicals. *Free Rad Biol Med* 11, 191–195.

- Pobezhimova TP, Voinikov VK** (2000). Biochemical and physiological aspects of ubiquinone function. *Membr Cell Biol* 13, 595–602.
- Potier, P., Sasaki, A., Bakala, J., Garcia-Alvarez, M.C., Franck, G., Nhiri, N., Wang, Q., Ermolenko, L., Nguéfeu, Y., Calvo, F. and Gautier, J.F.** (2005). New aspects of diabetes]. *Ann Pharm Fr*, 63, 371-84.
- Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA** (2000). Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol* 296, 295–309.
- Rachek LI, Musiyenko SI, LeDoux SP, Wilson GL** (2007). Palmitate induced mitochondrial deoxyribonucleic acid damage and apoptosis in l6 rat skeletal muscle cells. *Endocrinology* 148, 293– 299.
- Rahman, I., Biswas, S.K. and Kode, A.** (2006). Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol* 533, 222-39.
- Rajkumar, L and Govindarajulu, P.** (1991). Increased degradation of dermal collagen in diabetic rats. *Indian J Exp Biol*; 29:1081-3.
- Rambert, P and Forette, B.** (1977). Epidemiologie . In *Precis de diabetologie*, DEROT M, édition Masson, 5-13.
- Randle PJ, Newsholme EA, Garland PB** (1964) Regulation of glucose uptake by muscle. Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate, and of alloxan-diabetes and starvation, on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscles. *Biochem J* 93(3):652-65.
- Randle PJ, Sugden PH, Kerbey AL, Radcliffe PM, Hutson NJ** (1978) Regulation of pyruvate oxidation and the conservation of glucose. *Biochem Soc Symp* (43):47-67.
- Ravanat JL, Duretz B, Guiller A, Douki T, Cadet J.** (1998). Isotope dilution high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay for the measurement of 8- oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in biological samples. *J Chromatogr B*; 715:349-56.
- Reddy, C.C., Massaro, E.J.** (1983). Biochemistry of selenium: a brief overview. *Fundamental and applied toxicology*. 3 (5): 431-436.
- Regan TJ, Ettinger PO, Khan IM, jesrani MU, Lyons MM, Oldewurtel HA, Weber M** (1974) Altered myocardial function and metabolism in chronic diabetes mellitus without ischemia in dogs. *Circ Res* 35: 222-237.

- Rhee SG, Kang SW, Jeong W, Chang TS, Yang KS, Woo HA** (2005). Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr Opin Cell Biol* 17, 183–189.
- Robertson RP** .(2004a). Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet cells in diabetes. *J Biol Chem* 279, 42351–42354.
- Rodrigues B, Cam MC, McNeill JH** (1998) Metabolic disturbances in diabetic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 180(1-2):53-7.
- Rodrigues B.B., Goyal R.K., McNeill J.H.** (1986). Effects of hydralazine on streptozotocin induced diabetic rats: Prevention of hyperlipidemia and improvement in cardiac function. *J Pharmacol Exp Ther* 237: 292– 299.
- Rodrigues B.B., McNeill J.H.** (1986). Cardiac function in spontaneously hypertensive diabetic rats. *Am J Physiol* 251: H571–H580.
- Rotruck J. T., Pope A. L., Ganther H. E., Swanson A. B., Hafemen D. G, & Hoekstra W. G.,** (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase, *Science* **179**, 588–590.
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG** (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179, 588–590.
- Rouhier N., Gelhaye E., Sautiere P.E., Brun A., Laurent P., Tagu D., Gerard J., de Fay E., Meyer Y. and Jacquot J.P.** (2001). Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor, *Plant Physiol*, 127, 1299-1309
- Roussel A.-M., Hininger-Favier I.**(2009) Éléments-trace essentiels en nutrition humaine : chrome, sélénium, zinc et fer. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Endocrinologie-Nutrition, 10-359-B-10.
- Ruggiero-Lopez, D., Lecomte, M., Moinet, G., Patereau, G., Lagarde, M. and Wiernsperger, N.** (1999). Reaction of metformin with dicarbonyl compounds. Possible implication in the inhibition of advanced glycation end product formation. *Biochem Pharmacol*, 58, 1765-73.
- Ryter SW, Alam J, Choi AM** (2006). Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 86, 583–650.
- Sabu M.C., Smitha K., Ramadasan K.** (2002). Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 83: 109-116

- Salonen.J.T, Salonen. R, Seppanen. K, Kantola.M, Parviainen. M, Alfthan.G, Maenpaa. P.H, Taskinen.E, and Rauramaa. R.** (1988). *Atherosclerosis*, 70, p155-160.
- Sapin,R.** Review. (2003). *Insulin Assays: Previously known and New Analytical Features.* Clin Lab ; 49 (3-4):113-121.
- Schneider, M., Quistad, G.B. and Casida, J.E.** (1998). N2,7-bis(1-hydroxy-2-oxopropyl)-2'- deoxyguanosine: identical noncyclic adducts with 1,3-dichloropropene epoxides and methylglyoxal. *Chem Res Toxicol*, 11, 1536-42.
- Serap, Gur., Ismail, Cinel .**(2003). *Sodium Selenate Partially Corrects Impaired Functional Responses in Detrusor Muscle in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats* Faculty of Medicine, Mersin University, Mersin, Turkey, Vol.93: .171-180.
- Sharma, A., Kharb, S., Chugh, S.N., Kakkar,R and Singh, G.P.** (2000). Evaluation of oxidative stress before and after control of glycemia and after vitamin E supplementation in diabetic patient. *Metabolism* , vol 49, 160-162.
- Sies, H.** (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr.* 69, 965-8.
- Simonoff, M., Simonoff, G.** (1991). *Le sélénium et la vie.* Centre National de la Recherche Scientifique. Masson. Paris. 242.
- Soltaninassab SR, Sekhar KR, Meredith MJ, Freeman ML** (2000). Multi-faceted regulation of glutamylcysteine synthetase. *J Cell Physiol* 182, 163–170.
- Stanley WC, Hall JL, Smith KR, Cartee GD, Hacker TA, Wisneski JA** (1994) Myocardial glucose transporters and glycolytic metabolism during ischemia in hyperglycemic diabetic swine. *Metabolism* 43(1): 61-69.
- Stapleton S.R., Garlock G.L., Foellmi-Adams L** (1997). Selenium potent stimulator of tyrosyl phosphorylation and activator of MAP kinase, *Biochim. Biophys. Acta* , 1355: 259–269.
- Stapleton,S.R.** (2000). Selenium: an insulin mimetic.*Cell.Mol. lif. Sci* ; 57: 1874-1879.
- Stone.W.L, Stewart. M.E, Nicholas.C and Pavuluris.S.** (1986). *Ann. Nuts. Metab.* 30, 94-103.
- Suthagar.E, Soudamani.S, Yuvaraj.S.,Ismail khan, A., Arulldhas, M.M., Balasubramanian,K.** (2009). Effects of streptozotocin induced diabetes and insulin replacement on rat ventral prostate. *Biomed pharmacother* 63, 43-50.
- Szkudelski T** (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in cells of the rat pancreas. *Physiol .Res*; 50: 537-546.

- Szkudelski, T.** (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res*; **50**:537-546.
- Takahashi K, Avissar N, Whitin J, Cohen H** (1987). Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys* 256, 677–686.
- Tan, J.A., Wang, W.Y., Wang, D.C., Hou, S.F.** (1994). Adsorption, Volatilization, and Speciation of Selenium in Different Types of Soils in China. Dekker, New York.. 47-67.
- Tapiero, H., Townsend, D., KD, T.** (2003). The antioxydant role of selenium and selenocompounds. *Biomedecine and Pharmacotherapy*. 7: 134-144.
- Tarach.JS.** (1978). Some histochemical observation on the myocardial metabolism in experimental conditions.Part II. *Acta Histochem* 61, 273-286.
- Thérond P, Malvy D and Favier A** (1997). Toxicité du sélénium à doses pharmacologiques par voie oral. *Nutrition clinique et métabolisme* 11:91-101
- Thomas, G., Skrinska , V., Lucas, F.V., Schumacher, O.P.** (1985). Platelet glutathione and thromboxane synthesis in diabetes. *Diabetes*, vol 34 (10), p 951-954.
- Thomson, C.D., Stewart, R.D.H.** (1974). The metabolism of [75Se] selenite in young women. *Br. J. Nutr.* 32, 47-57.
- Thomson, J., Neve, J.** (1991). Physiological and nutritional importance of selenium. *Experientia*. 47, (2): 187-193.
- Thornalley, P.J.** (2003). Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation end products. *Arch Biochem Biophys*, 419, 31-40.
- Thornalley, P.J., Langborg, A. and Minhas, H.S.** (1999). Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J*, 344 Pt 1, 109-16.
- Tinggi, A.** (2003). Essentiality and toxicity of selenium and its status in australia: a review. *Toxicology Letters*. 137, 103-110.
- Trinder, P.** (1969). *Ann. Clin. biochem.* 6, 24-33.
- Turrens JF** (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552, 335–344.
- Uchida,K., and Stadtman, E.R.** (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 5611-5615.
- Uchida,K., and Stadtman, E.R.** (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 4544-4548.
- Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohe L** (1999). Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* 285, 1393–1396.

- Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe R, Aurnann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohe L** (1995). Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 252, 38–53.
- Vadde, R and Rama, J.** (2008). Oxidative stress in non insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patient. *Acta Diabetol*; **45**:41-46.
- Vadde, Ramakrishna. Rama, JaikaniI.** (2008). Oxidative stress in non insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patient: *Acta Diabetol* Vol.45, 41-46.
- Valdigué P. (2000).** *Biochimie clinique. Edition Médicales internationales (2e édition).* paris. 340.
- Van der Vliet A, Eiserich JP, Kaur H, Cross CE, Halliwell B** (1996). Nitrotyrosine as biomarker for reactive nitrogen species. *Methods Enzymol* 269, 175–184.
- Vats, V., Yadav, S.P and Grover, J.K.** (2004). Ethanolic extract of *Ocimum sanctum* leaves partially attenuates streptozotocin induced alterations in glycogen content and carbohydrate metabolism in rats. *J. Ethnopharmacol*; 90, 155–160.
- Veki, H., Ohkura, Y., Moxoyashiki, T., Tominage, N. and Morita, T.** (1993). Increase in lipoprotein lipase activity in isolated rat adipose tissue by selenate. *Biol. Pharm. Bull*; 16, 6-10.
- Venkateswaran, S and Pari, L.** (2002). Antioxidant effect of *Phaseolus vulgaris* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*; 11:206-209.
- Viegas Crespo, A.M., Lança, M.J., Vasconcelos, S. Andrad, V. , Rodrigues, H and Santos, M.C.** (1995) Effect of selenium supplementation on some blood biochemical parameters in male rats. *Humana Press Inc.* 95, 343-347.
- Vishwanath V, Frank KE, Elmets CA, Dauchot PJ, Monnier VM** (1986) Glycation of skin collagen in type I diabetes mellitus. Correlation with long-term complications. *Diabetes* 35(8):916-21.
- Wall SR, Lopaschuk GD** (1989) Glucose oxidation rates in fatty acid-perfused isolated working hearts from diabetic rats. *Biochim Biophys Acta* 1006(1):97-103.
- Wallace DC** (2008). Mitochondria as Chi. *Genetics* 179, 727–735.
- Watson WH, Yang X, Choi YE, Jones DP, Kehrer JP** (2004). Thioredoxin and its role in toxicology. *Toxicol Sci* 78, 3–14.
- Weckbeker, G., Cory, J.G.** (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of Glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer letters.* 40, 257-264.
- Welch WJ** (1992). Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 72, 1063–1081.

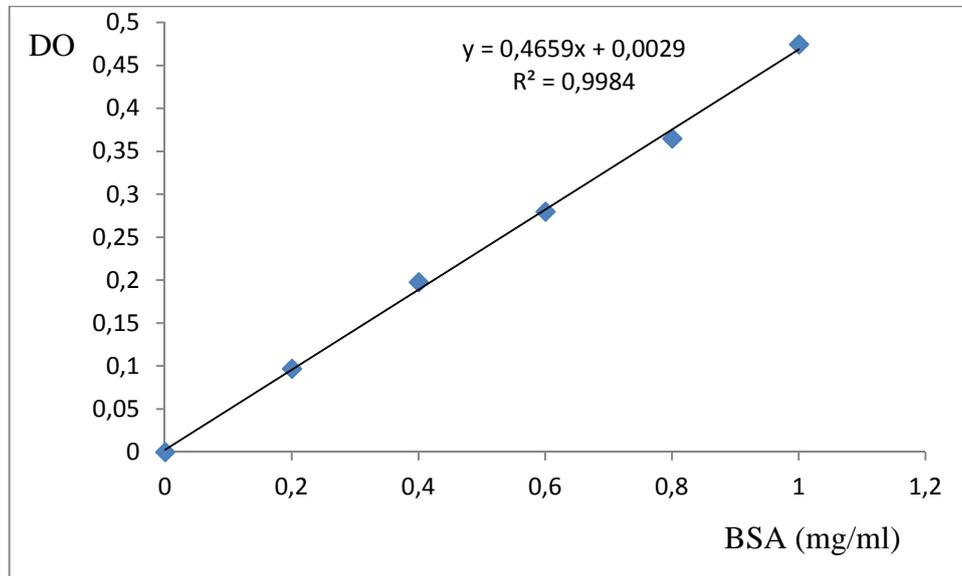
- Wells-Knecht, K.J., Zyzak, D.V., Litchfield, J.E., Thorpe, S.R. and Baynes, J.W.** (1995) Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry*, 34, 3702-9.
- Wenger, C.** (1984). Alkaline phosphatase. Kaplan A et al .Clin chem. The C.V. Mosby Co. Si louis. Tronto. Princeton; 1094-1098.
- West, I.C.** (2000).Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabetic Medicine*; **17**: 171-180.
- Weyer, C., Bogardus, C.** (1999). The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type II diabetes mellitus. *J Clin Invest*; 104: 787-794.
- Wolf, G.**(2005) Mécanismes moléculaires de l'atteinte rénale d'origine diabétique.Flamarion Medecine-sciences université de Hambourg, Allemagne : 205-216 .
- Wolff, S.P. and Dean, R.T.** (1987) Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J*, 245, 243-250.
- World Health Organization, Food and Agriculture Organisation of the United Nations and International Atomic Energy Agency expert group** (1996) Selenium. In:WHO (ed) Trace elements in human nutrition and health. WHO, Geneva, pp 105-122
- Xi-qun Sheng, Kai-xun. H, and Hui-Bi. X.** (2004).New experimental observation on the relationship of selenium and diabetes mellitus. Humana Press Inc. vol ; 99, 241-253.
- Xi-Qun Sheng., Kia-Xun, Huang, and Hui-Bi Xu** (2004). New experimental observation on the relationship of selenium and diabetes mellitus institute of material medica, huazhong university of science and technology: Vol .99: 241-253.
- Xu.Z, Patel.K.P, Lou. M.F, and Rozanski. G.J.** (2002). Up-regulation of K⁺ channels in diabetic rat ventricular myocytes by insulin and glutathione, *Cardiovasc. Res.* 53, 80-88.
- Yagi. K.** (1984). Bioessay 19, p 58-60.
- Ying Foo A.** (1998). Amylase measurement with 2-chloro-4nitrophenyl maltotrioxide as substrate. *Clin Chim* 272; 137-147.
- Yizhen .Xu., Brent. W., Osbone, and Robert. C. Stanton.** (2005) Diabetes causes inhibition of G6PDH via activation of PKA, which contributes to oxidative stress in rat kidney cortex. *Am J Physiol Renal* 289, 1040-1047.
- Yves Patrice Le Treut, Jean-François Seitz, Jean Hardwigsen, Vincent Moutardier** (2006). Hépatomégalie et masse abdominale. Faculté de Médecine de Marseille. 12 : 1-4.

- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ** (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad Biol Med*, 33, 337.
- Zhang R., Zhou J., Jia Z., Zhang Y., Gu G. (2004).** Hypoglycemic effect of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharide in hyperglycemic and alloxan-induced diabetic rats and its mechanism. *Journal of Ethnopharmacology* 90:39- 43
- Zhang, Z., Yu.J and Stanton, RC.,** 2000. A method for determination of pyridine nucleotides using a single extract. *Anal biochem* 285: 163- 167.
- Zhong G.G., Jiang Y., Li Z.B., Zhang B.G., Zhang W.J., Yue G.** (1990). Protective action of selenium and manganese on xanthine and xanthine oxidase induced oxidative damage to cultured heart cells. *Chin Med J* 103: 735–742.

ANNEXES

ANNEXEX

1. Courbe d'étalonnage des protéines tissulaires utilisant le sérum albumine bovine (BSA).



PUBLICATIONS DE L'AUTEUR

1. Protective effect of selenium supplementation on antioxidant defence and cardiovascular diseases in alloxan diabetic rats.
2. Effect of selenium on cardiovascular diseases in alloxan induced diabetic rats.



RESEARCH PAPER

OPEN ACCESS

Protective effect of selenium supplementation on antioxidant defence and cardiovascular diseases in alloxan diabetic rats

S. Boussekine*, N. Bouzerna, R. Rouabhi

Department of Biochemistry, Laboratory of Biochemistry and Microbiology, Badji Mokhtar University, Annaba 23000, Algeria

Key words: Selenium, diabetes, cardiovascular diseases, oxidative stress, rats, Alloxan.

<http://dx.doi.org/10.12692/ijb/4.5.1-10>

Article published on March 08, 2014

Abstract

To investigate the protective effect of selenium supplementation in the cardiovascular diseases associated with diabetes mellitus caused by lipid peroxidation and oxidative stress. Thirty five male albino (wistar) rats of 06 weeks of age were randomly divided into five groups of seven each. Two groups were pre-treated for 10 days by sodium selenite (2 mg/kg.bw/d) via orogastric route. The first group was served as the control, the second as the normal treated intra peritoneally by selenium (1.89 mg/kg.bw/d). Three groups were intra peritoneally injected with alloxan (150 mg/kg.bw) to induce diabetes. One diabetic group treated intra peritoneally by insulin (3UI/100g .bw), another diabetic group (pre-treated by selenium 2 mg/kg.bw/d for 10 days) treated intra peritoneally by selenium (1.89 mg/kg.bw/d) for further three weeks. The administration of alloxan significantly increased blood glucose, total cholesterol, LDL-C, triglycerides, lipids, heart MDA content, GST activity. In contrast blood HDL-C, insulin levels, G6PDH activity, heart GSH, GPx, Catalase activities were significantly decreased. Supplementation of sodium selenite restores the parameters measured compared to untreated diabetic rats and diabetic treated by insulin. To conclude the present study shows that treatment of diabetic rats with sodium selenite prevented cardiovascular diseases induced by hyperlipemia, lipid peroxidation and free radicals generated during diabetes.

* **Corresponding Author:** S.Boussekine ✉ boussekinesam@yahoo.fr

Introduction

Diabetes mellitus is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia, dyslipidemia, and disturb protein metabolism that results from defects in both insulin secretion and/or insulin action. The disease is associated with reduced quality of life and increased risk factors for mortality and morbidity. The long-term hyperglycemia is an important factor in the development and progression of micro- and macrovascular complications which include neuropathy, nephropathy, cardiovascular (CVD) and cerebrovascular diseases (Altan, 2003; Strojek, 2003). The underlying goal of all diabetes treatment and management is to maintain an adequate blood glucose concentration (Charpentier, 2002).

Cardiovascular disease (CVD) is the major cause of death in patients with diabetes (Giugliano et al., 1996). It is estimated that incidence of CVD is three to seven-fold higher for individuals with diabetes than in the non-diabetic population (Rosen et al., 1998). Lipoprotein abnormalities have been identified among the several risk factors that could account for this increase in CVD incidence in diabetes (Assmann and Schulte, 1988). Antioxidant micronutrients are being widely studied for their alleged beneficial properties in the prevention of human diseases, including cancer, arthritis and cardiovascular diseases (Bidlack et al., 1996). Previous studies have shown their efficacy in experimental diabetes mellitus by repressing hepatic glucose production and increasing muscle insulin activity (Guerrero and Rodriguez, 2005). In STZ-induced diabetic rats, daily sodium selenite treatment (15–20 $\mu\text{mol/kg}$ body weight, intraperitoneally) reduced or normalized high blood glucose levels and restored left ventricular pressure parameters without any positive effect on low insulin level (McNeill et al., 1991; Battel et al., 1998). Recently, in our previous studies, we have demonstrated that treatment of STZ-induced diabetic rats with a low amount of sodium selenite (5 $\mu\text{mol/kg}$, intraperitoneally) compared with the others (McNeill et al., 1991; Battel et al., 1998) could protect the ultra structure of heart against diabetes induced alterations, reverse the increase in platelet

aggregation and thromboxane B₂, and restore the altered cardiac mechanical and electrical activities (Ayez et al., 2002; Ayez et al., 2004). In vitro studies had shown also that when rat adipocytes were incubated with sodium selenite, glucose transport was stimulated markedly (Ezaki, 1990). Whether the insulinlike effects of selenium compounds in cultured adipocytes can explain the published beneficial effects in diabetic animals is not well understood yet. Even recently, it has been demonstrated that selenium exerts both insulinlike and non-insulin-like actions in adipocytes (Heart and Sung, 2003).

As summarized earlier, there is ample evidence that selenium compounds can restore some metabolic parameters and, to some extent, diminished cardiac function in experimental diabetes. Selenium is an essential dietary component for mammals, including humans. One of its well-understood functions is that it is present in the active center of glutathione peroxidase, which scavenges various peroxidases and protects macromolecules from oxidative damage (Rotruck et al., 1973). Low concentrations of selenium are essential for the synthesis of selenocysteine-containing enzymes (Koller and Exon, 1986).

Although selenium compounds are commonly used as a dietary supplement for the treatment of selenium-deficiency diseases (Neve, 1991), the effects of these compounds on the altered antioxidant system of diabetic heart have been controversial (Mak et al., 1996; Doi et al., 2001). Thus, we aimed to investigate whether beneficial effects extend to the alterations in the blood lipids parameters, heart lipid peroxidation TBARS, glutathione content, anti oxidative enzyme activities in heart such: glutathione peroxydase GPX, glutathione -S- transferase GST, Catalase (CAT) which have important roles in the antioxidant defense mechanisms.

Materials and methods

Chemicals

Animals and experimental design

Thirty five male albino wistar rats of 06 weeks of age with a body weight ranging from 180-220 g were

obtained from the Pasteur institute (Algeria). Animals were acclimated for 2 weeks under the same laboratory conditions of photoperiod (12 h light: 12 h dark) with a minimum relative humidity of 40 % and room temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Food (standard diet, supplied by the "ONAB, el harrouch", Algeria), and water were available ad libitum. Rats were randomly divided into five groups of seven (7) males each. Two groups were pre-treated for 10 days by sodium selenite (2 mg/kg.bw/d) via orogastric route. The first group was served as the control (con), the second as the normal treated intra peritoneally by selenium (1.89 mg/kg.bw/d) (normal-Se) (Berg et al., 1995). Three groups were intra peritoneally injected with alloxan (150 mg/kg.bw) to induce diabetes (Rotruck and al., 1973). After 72 h alloxan injection; the blood glucose level of the whole blood obtained from the tail vein of the over night fasted animal was tested and those with a blood glucose level above 3 g/l were deemed diabetic. One diabetic group was treated intra peritoneally by insulin (3UI/100g .bw) (DM-Insulin) (Suthagar et al., 2009). Another diabetic group (pre-treated by selenium 2 mg/kg.bw/d for 10 days) was treated intra peritoneally by selenium (1.89 mg/kg.bw/d) (DM- Se) for further three weeks. At the end of experimental period, rats were fasted for 12 hours, and then sacrificed by decapitation and fasting blood sample were collected from the sacrificed animals in heparinised vial and plain vial for hemolysate preparation and for serum preparation respectively. The remaining blood was centrifuged at 2200xg for 15 min at 04°C , and the serum stored at -20°C for biochemical analysis of: glucose, insulin, total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides and total lipids. The total blood for glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity measured.

The heart was rapidly washed with saline and stored at -20°C .

Tissue preparation

1 g of heart was homogenized in 2 ml of buffer solution of phosphate buffered Saline 1:2 (w/v: 1g tissue with 2ml PBS, pH 7.4). Homogenates were centrifuged at 10000xg for 15 min at 4°C and the resultant supernatant was used for the determination

of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) content, and glutathione peroxydase (GPx), glutathione-S- transferase (GST) and catalase activities.

Determination of blood glucose, G6PDH activity, insulin, total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, lipids

Plasma glucose level was assayed with a commercial kit (spin react, Spain ref 41011) and determined by enzymatic colorimetric method using glucose oxidase enzyme (Kaplan, 1984). The Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PDH) activity in erythrocytes was determined by monitoring the NADPH production at 340 nm and at 37° using the Rx monza analyser (Loher and Waller, 1974). Total insulin as determined by electrochimiluminescence method (Sapin et al., 2001). However plasma total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides and total lipids were determined by methods using kits from Spinreact (ref: 1001091, 1001097, 1001311, 1001270) respectively (Naito and Kaplan, 1984; Buccolo, 1973; Kaplan, 1984). LDL determined by Friedewald formula (Friedwald et al., 1972).

Determination of reduced glutathione

Liver glutathione (GSH) concentration was measured utilizing the method described by weckberker and Cory (1988).

Determination of Glutathione peroxidase (GPx)

Glutathione peroxidase (GPx) (E.C.1.11.1.9) activity was measured by the procedure of Flohe and Gunzler (1984). Supernatant obtained after centrifuging 5% heart homogenate at $1500 \times g$ during 10 min followed by $10000 \times g$ for 30 min at 4°C was used for GPx assay. 1ml of reaction mixture was prepared which contained 0.3 ml of phosphate buffer (0.1M, pH7.4), 0.2ml of GSH (2mM), 0.1 ml of sodium azide (10mM), 0.1ml of H_2O_2 (1mM) and 0.3ml of heart supernatant. The reaction was terminated by addition of 0.5ml 5% TCA after 15 min of incubation at 37°C . Tubes were centrifuged at $1500 \times g$ for 5 min and the supernatant was collected. 0.2 ml of phosphate buffer (0.1MpH7.4) and 0.7 ml of DTNB (0.4 mg /ml) were

added to 0.1ml of reaction supernatant. After mixing, absorbance was recorded at 420 nm.

Determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

The lipid peroxidation level in heart homogenate was measured as malondialdehyde (MDA) which is the end product of lipid peroxidation, and reacts with thiobarbituric acid (TBA) as a TBA reactive substance (TBARS) to produce a red coloured complex with a peak absorbance at 532 nm (Buege and Aust, 1984).

Thus, 125 μ l of supernatant were homogenized by sonication with 50 μ l of PBS, 125 μ l of TCA–BHT (trichloroacetic acid–butylhydroxytoluene) in order to precipitate proteins, and then centrifuged (1000 \times g, 10 min, and 4 °C). After wards, 200 μ l of supernatant were mixed with 40 μ l of HCl (0.6M) and 160 ml of TBA dissolved in Tris, and then the mixture was heated at 80 °C for 10 min. The absorbance of the resultant supernatant was obtained at 530 nm. The amount of TBARS was calculated using a molar extinction coefficient 1.56×10^5 M/cm.

Determination of glutathione-S-transferase

Glutathione-S-transferase (GST) (EC2.5.1.18) catalyzes the conjugation reaction with glutathione in the first step of mercapturic acid synthesis. The activity of GST was measured according to the method of Habig *et al.* (1974). The P-nitro benzyl chloride was used as substrate. The absorbance was measured at 340 nm at 30 s intervals for 3min.

Determination of catalase activity

The catalase (CAT) activity was determined according to the method of Aebi (1984). The H₂O₂ decomposition rate was followed by monitoring absorption at 240 nm. One unit of CAT activity is defined as the amount of enzymes required to decompose 1 μ mol of hydrogen peroxide in 1 min. the enzyme activity was expressed as μ mol H₂O₂ consumed /mn/mg protein.

Protein estimation

The protein contents of various samples were determined according to the method of Bradford (1976) by using bovine serum albumin as a standard.

Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) was used to compare multiple group means, followed by student's t- test to determine statistical significance ($p < 0.05$) among the different groups. All statistical analysis were performed using MINITAB software (version 13.31). Results are expressed as means \pm SEM.

Results

Effects of treatments on plasma biochemical parameters

a) Blood glucose, insulin levels and G6PDH activity:

alloxan-induced diabetes in rats produced a significant decrease in blood insulin level (73%), G6PDH activity (23%) and increase in glucose level (75%) compared to the control group. Insulin treatment significantly increase blood insulin level, G6PDH activity respectively by (69%, 15%), and decrease glucose level by 67% compared to no treated diabetic rats. Also selenium treatment significantly increase insulin level and G6PDH activity respectively by (66%, 20%), and decrease significantly the level of glucose by 42% compared to no treated diabetic rats (table 01).

b) Blood total cholesterol, HDL-C, LDL-C, Triglycerides and total lipids

Diabetic rats produced a significant increase in total cholesterol (47%), LDL-C (60%), triglycerides (57%), lipids (33%) and decrease in HDL-C by 4% compared to the control group. However in insulin treatment significantly decrease the T cholesterol, LDL-C, triglycerides and lipids levels respectively by (26% ,39%, 23% ,15%), and increase HDL-C level by 7% compared to no treated diabetic rats. Selenium treatment decrease significantly the levels of T cholesterol, LDL-C, triglycerides and lipids levels respectively by (48% ,63%, 53% ,21%), and increase HDL-C level by 12% compared to no treated diabetic rats (table 01).

Effects of treatments on heart tissue parameters

Alloxan-induced diabetes in rats produced a significant decrease in GSH content by 20% (fig 01), GPx (fig 02), catalase (fig 04) activities respectively by (26%,33%), and increase in GST (fig03)activity (18%),

TBARS (fig 05) content by 47% in heart tissue compared to control group. Insulin treatment

significantly increase GSH content (11%), GPx and catalase activities (11%, 25%) respectively and decrease GST activity by 8% and MDA content by 24% compared to no treated diabetic rats. Sodium selenite treatment significantly increase GSH level by 17%, GPx and catalase activities respectively by (20%, 28%), and increase GST activity by 15% and MDA content by38% compared to no treated diabetic rats.

Table 1. Blood glucose, insulin, total cholesterol, HDL-C, LDL-C, triglycerides, lipids levels and G6PDH activity in control, normal treated with selenium (Normal +Se), diabetic (DM), diabetic treated with insulin (DM+ Insulin) and diabetic rats treated with selenium (DM+ Se).

Parameters & treatments	Experimental groups				
	Cont (n=7)	Normal +Se (n=7)	DM (n=7)	DM+ Insulin (n=7)	DM+ Se (n=7)
Glucose (mmol/l)	3.5±0.11	3.44±0.11	13.87 ± 0.62 ^{abd}	4.49 ± 0.24 ^{abc}	8.04 ± 0.4 ^{abcd}
Insulin (µ UI/ml)	2.34 ± 0.048	2.41 ± 0.04	0.64 ± 0.06 ^{abd}	2.06 ± 0.06 ^{abc}	1.90 ± 0.038 ^{abcd}
G-6-PDH(m UI/10GR)	141.9±2	143.5±1	109.8 ± 3 ^{abd}	130.4 ± 2.2 ^{abc}	136 ± 1.3 ^{abcd}
Cholestérol (mmol/l)	2.48 ± 0.1	2.48 ± 0.21	4.67 ± 0.13 ^{abd}	3.45 ± 0.05 ^{abc}	2.41 ± 0.08 ^{cd}
HDL-C (mmol/l)	0.92 ± 0.04	0.97 ± 0.04	0.88 ± 0.015 ^b	0.90 ± 0.0025 ^b	1.00 ± 0.038 ^{cd}
LDL-C	1.21 ± 0.02	1.17 ± 0.04	3.01 ± 0.08 ^{abd}	1.84 ± 0.07 ^{abc}	1.10 ± 0.08 ^{cd}
Triglycérides (mmol/l)	0.67 ± 0.045	0.65 ± 0.022	1.55 ± 0.14 ^{abd}	1.20 ± 0.031 ^{abc}	0.733 ± 0.051 ^{cd}
Lipides T (mg/dl)	512± 59	497 ± 19	763 ± 33 ^{abd}	652 ± 49 ^{abc}	605 ± 24 ^{abcd}

Values are given as mean ± SEM for group of 7 animals each. $p \leq 0.05$, (a: comparison with cont, b: comparison with normal+Se, c: comparison with DM, d: comparison with DM+ Insulin).

Discussion

It is generally considered that hyperglycaemia is the major factor in the pathogenesis of diabetic complication (Odetti et al., 1996). The persistent hyperglycaemia and the development of diabetic complications results in exaggerated synthesis of free radicals and defective scavenging systems. Results of the present study showed that diabetic rats exhibited a significant increase in plasma glucose level. The beneficial effect of selenium administration on plasma glucose level has several systemic consequences. Firstly, selenium includes stimulation of glucose uptake and regulation of metabolic process such as glycolysis, gluconeogenesis, fatty acid synthesis, and pentose phosphate pathway (Stapleton et al., 1997; Hei et al., 1998). Secondly selenium does activate a key proteins involved in the insulin signal cascade (Stapleton, 2000). Also selenium cause partial restoration of mRNA levels and activities of two key glycolytic enzymes (glucokinase and pyruvate

kinase). It also decreases the elevated mRNA concentration and the activity of a major gluconeogenic enzyme phospho enol pyruvate carboxy kinase (Becker et al., 1996). Also it has ability to restore the expression of both the lipogenic enzymes, glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PDH) and fatty acid synthase (FAS). Increase both G6PDH and FAS, mRNA suggesting that the regulation of expression by the mimetic occur pretranslationally (Berg et al., 1995).

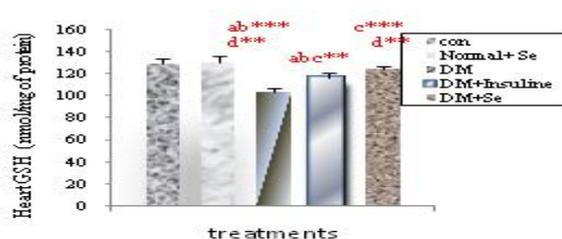


Fig. 1. Reduced glutathione GSH level (nmol/mg protein) in heart of control and treated groups a: comparison with control, b: comparison with normal+Se, c: comparison with DM, d: comparison

with DM+Insulin. Values are means±SEM for seven rats in each group. * p≤0.05, ** p≤0.01, *** p≤0.001.

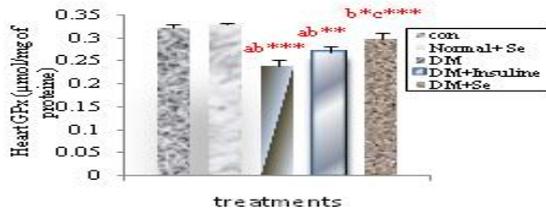


Fig. 2. Glutathione peroxydase GPx activity (µmol/mg protein) in heart of control and treated groups a: comparison with control, b: comparison with normal+Se, c: comparison with DM, d: comparison with DM+Insulin. Values are means±SEM for seven rats in each group. * p≤0.05, ** p≤0.01, *** p≤0.001.

Other study with a medium oral dose of 2 mg/kg/d (11.6 µmol/kg) selenite was able to lower the blood glucose of alloxan-induced kun-min mice (Ding et al., 1997).

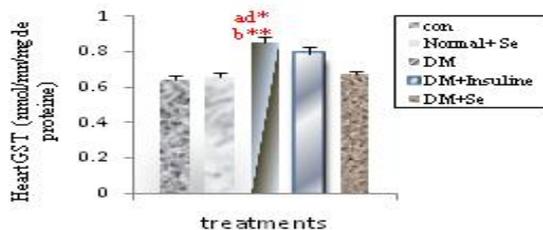


Fig. 3. Glutathione-S-transferase activity (nmol/mg protein) in heart of control and treated groups a: comparison with control, b: comparison with normal+Se, c: comparison with DM, d: comparison with DM+Insulin. Values are means±SEM for seven rats in each group. * p≤0.05, ** p≤0.01, *** p≤0.001.

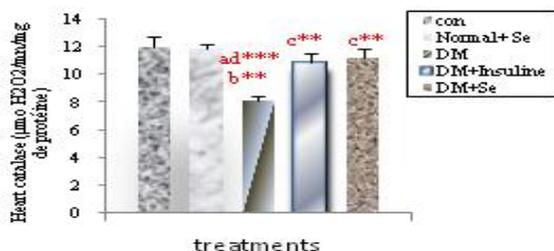


Fig. 4. Catalase (CAT) activity (µmol H₂O₂/mg protein) in heart of control and treated groups a: comparison with control, b: comparison with normal+Se, c: comparison with DM, d: comparison

with DM+Insulin. Values are means±SEM for seven rats in each group. * p≤0.05, ** p≤0.01, *** p≤0.001.

G6PDH activity was decreased in diabetic rats compared with normal control and normal selenium treated rats (table 01). Insulin treatment and selenium treatment normalized the decrease in G6PDH activity in diabetic rats. Other study (Zhang et al., 2000) has shown that high glucose led to increased PKA activity and phosphorylation of G6PDH in cultured bovine aortic endothelial cells. That PKA can directly phosphorylate G6PDH and inhibit G6PDH activity (Zhang et al., 2000).

The present results demonstrated that diabetes significantly increased the levels of total cholesterol, LDL-C, triglycerides, Total lipids. And decreased of HDL-C which did have a direct detrimental effect on heart function, these results are in accordance with those of other investigations (Opie, 1970; Rodrigues and McNeill, 1986; Rodrigues et al., 1986). Administration of sodium selenite significantly ameliorated the adverse influence of alloxan. Thus selenium treatment normalizes the alteration in cholesterol metabolism that occurs in diabetes (Veki et al., 1993). Selenium dependant peroxidase can detoxify a wide variety of peroxides including lipid derived-species (LOOH) present in LDL ox, thus selenium treatment can ameliorate the modification occurring in LDL-cholesterol by oxidative injury (Ness et al., 1994).

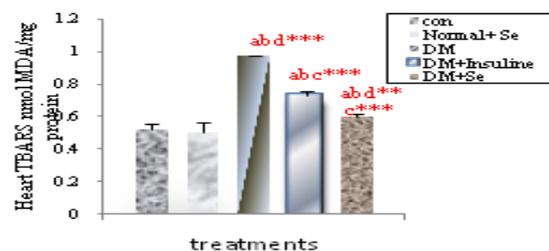


Fig. 5. TBARS (nmol MDA/mg protein) in heart of control and treated groups a: comparison with control, b: comparison with normal+Se, c: comparison with DM, d: comparison with DM+Insulin. Values are means±SEM for seven rats in each group. * p≤0.05, ** p≤0.01, *** p≤0.001.

Oxidative stress markers: TBARS levels were measured as an index of malondialdehyde production

and hence lipid peroxidation. Results indicated a significant increase of TBARS in diabetic animals compared with control animals (fig 05). Insulin and selenium treatment normalized or ameliorated the increase of TBARS level. These results show, as demonstrated by other investigations, that diabetes leads to increased oxidative stress. Thus further evaluations of enzymes and chemicals associated with the antioxidant system were done.

As shown in fig 01, the normal function of GSH coupling relies on a sufficient supply of NADPH. This a decrease in NADPH should lead to decreased GSH levels. Figure 01 shows that GSH levels were significantly decreased in untreated diabetic rats compared with normal control and normal treated by selenium. Insulin treatment ameliorated GSH level however selenium treatment normalized the significant decrease in GSH level in diabetic rats. Examination of other enzymes associated with oxidant stress (glutathione peroxidase, catalase and glutathione-s-transferase) show a significant differences between control and treated rats. There was a decrease in GPx and catalase activities and decrease in GST activity in the diabetic group (fig 2, 3, 4). Although there are clearly other factors responsible for the increased lipid peroxidation such as increased production of reactive oxygen species (Maritim et al., 2003).

Selenium treatment increase significantly GPx, catalase activities and decrease GST activity compared to untreated diabetic rats and insulin treated diabetic rats.

There are a few studies which suggest that selenium levels per se may be important in heart function (Zhong et al., 1990; Koehler et al., 1988).

In conclusion, this study demonstrates that Selenium is known to act to prevent free radical damage to cells. Selenium has been administered to humans to reduce the incidence and severity of Keshan disease, a cardiomyopathy which occurs in selenium-poor areas of China. Theoretically, diabetics who have an

increased incidence of heart disease, may benefit both from an improvement in glucose homeostasis due to selenite treatment as well as from a direct cardioprotective effect of the element, which play an important role in oxidative stress, to near normal values.

References

Aebi. 1984. Catalase . In L. Packer (Ed), methods in enzymology, Academic press, Orlando, **105**: 121-126.

Altan VM. 2003. The pharmacology of diabetic complications. *Current Medicinal Chemistry* **10**, 1317– 1327. DOI: [10.2174/0929867033457287](https://doi.org/10.2174/0929867033457287)

Assmann G, Schulte H. 1988. The Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) study: prevalence of hyperlipidemia in persons with hypertension and/or diabetes mellitus and the relationship to coronary heart disease, *American Heart Journal*. **116**, 1713–1724. DOI: 10.1016/0002-8703(88)90220-7

Ayaz M, Ozdemir S, Ugur M, Vassort G and Turan B. 2004. Effects of selenium on altered mechanical and electrical cardiac activities of diabetic rat, *Arch. Biochemistry and Biophysics*. **426**, 83–90. doi: 10.1016/j.abb.2004.04.008

Ayaz M, Can B, Ozdemir S and Turan B. 2002. Protective effect of selenium treatment on diabetes-induced myocardial structural alterations, *Biological Trace Element Research*. **89**, 215–226. DOI: 10.1385/BTER:89:3:215

Battell M L, Delgatty H L M and McNeill J H. 1998. Sodium selenate corrects glucose tolerance and heart function in STZ diabetic rats, *Molecular Cellular Biochemistry*. **179**, 27–34. DOI: 10.1023/A:1006819227506

Becker DJ, Reul B, Ozcelikay A, Buchent J P, Henquin JC and Brichard SM. 1996. oral selenate improves glucose homeostasis and partly reverses abnormal expression of liver glycolytic and

gluconeogenic enzyme in diabetic rats. *Diabetologia*; **39**, 3-11. DOI: 10.1007/BF00400407

Berg EA, Wu JY, Campbell L, Kagey M And Stapleton SR. 1995. Insulin like effect of vanadate and selenate on the expression of G6PD and fatty acid synthase in diabetic rats. *Biochemistry*, **77**, 919-924.

Bidlack WR. 1996. Interrelationships of food, nutrition health: the National Association of State Universities and Land Grant Colleges White Paper. *American Journal of Nutrition*. **15**, 422-33.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry*, **72**:248-54. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3

Buccolo G, Harold D. 1973. Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. *Clinical Chemistry*. **19(5)**, 476-482.

Buege JA, Aust SD. 1984. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, **105**:302-310.

Charpentier G. 2002. Oral combination therapy for type 2 diabetes. *Diabetes and Metabolism Research and Reviews*. **18 (Suppl3)**, S70- S76.

Ding H, Pen R., Chen J. 1997. Effect of selenite and *allitridi* on the diabetic mice. *Acta Nutr. Sini*. **19**: 384-387.

Doi K, Sawada F, Toda G. 2001. Alteration of antioxidants during the progression of heart disease in streptozotocin-induced diabetic rats, *Free Radical Research*. **34(3)**, 251-261. doi:10.1080/10715760100300231

Ezaki O. 1990. The insulin-like effects of selenate in rat adipocytes, *Journal of Biololy and Chemistry*. **265**, 1124-1130.

Flohe , Gunzler . 1984. Analysis of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol*. **105**, 114-121.

Friedewald WT, Levei RI, Fridrickson DS.1972. Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultra centrifugation. *Clinical and Chemical research*. **18**, 499-502.

Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G.1996. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*. **19**, 257-267. doi: 10.2337/diacare.19.3.257

Guerrero-Romero F and Rodriguez-Moran M. 2005. Complementary therapies for diabetes: the case of chromium. *Magnesium Antioxidants*. **36**, 250-7.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione-S-transferase the first step in mercapturic acid formation. *Journal of Biology and Chemistry*. **249**, 7130-9.

Heart H & Sung C.K. 2003. Insulin-like and non-insulin-like selenium actions in 3T3-L1 adipocytes, *Journal of Cellular and Biochemistry*. **88**, 719-731. Doi: 10.1002/jcb.10395

Hei YJ, Farahbakhshian S, Chen X. 1998. Stimulation of MAP kinase and S6 kinase by vanadium and selenium in rat adipocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **178**, 367-375. DOI 10.1023/A:1006819906820

Kaplan A. 1984. Lipids. *Journal of Clinical Chemistry*, 918-919.

Kaplan A . 1984. Glucose. The C.V Mosby CO. St Louis Toronto. Princlon, *Journal of Clinical Chemistry*. 1032 -1036.

Koehler H, Peters HJ, Pankau H, Duck H.J. 1988. Selenium in cardiology and angiology. *Biological Trace Elements Research*. **15**, 157-167.

- Koller L D and Exon J H.** 1986. The two faces of selenium-deficiency and toxicity are similar in animals and man. *Vet. Research Journal*. **50**, 297–306.
- Lohr, GW, Waller HD.** 1974. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *Method of Enzymatic Analysis*, 3rd Edition- Verlag Chemie, Wehnhelm; p.636.
- Mak DH, Ip SP, Li PC, Poon MK and Ko K. M.** 1996. Alterations in tissue glutathione system in streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **162(2)**, 153–158. DOI: 10.1007/BF00227543
- Maritim AC, Sanders Ra and Watkins JBIII.** 2003. Diabetes oxidative stress, and anti oxidant. A review. *Biochemistry and Toxicology Journal*. **17**, 24–38.
- McNeill JH, Delgatty HLM and Battell ML.** 1991. Insulinlike effects of sodium selenate in streptozotocin-induced diabetic rats, *Diabetes* **40**, 1675–1678. doi: 10.2337/diab.40.12.1675
- Naito HK, Kaplan A.** 1984. Cholesterol. *Clinical and Chemical the C.V Mosby CO. St Louis Toronto. Princeton.* 1194-11206 and 437.
- Naito HK, Kaplan A.** 1984. HDL-Cholesterol. *Clinical and Chemical the C.V Mosby CO. St Louis Toronto. Princeton* :1207-1213 and 437.
- Ness GC, Zhao Z. and Wiggins L.** 1994. Insulin and glucagon modulate hepatic 3-hydroxy-methyl glutaryl-coenzyme A. *Journal of Biological Chemistry*. **269**, 29168-29172.
- Neve J.** 1991. Physiological and nutritional importance of selenium, *Experienta* **47**, 187–193.
- Odetti P, Travers ON, Cosso, L, Noberasco G, Pronzato MA and Marinariu M.** 1996. Good glycemic control reduces oxidation and glycation end-products in collagen of diabetic rats. *Diabetologia*. **39**, 1440-1447. DOI: 10.1007/s001250050596
- Opie LH.** 1970. Effect of fatty acid on contractility and rhythm of the heart. *Nature (London)* **227**, 1055–1066.
- Rodrigues BB, Goyal RK, McNeill JH.** 1986. Effects of hydralazine on streptozotocin induced diabetic rats: Prevention of hyperlipidemia and improvement in cardiac function. *Journal of Pharmacological*. **237**, 292–299.
- Rodrigues BB, McNeill JH.** 1986. Cardiac function in spontaneously hypertensive diabetic rats. *American Journal of Physiology*. **251**, H571–H580.
- Rosen P, Du X, Tschope D.** 1998. Role of oxygen-derived radicals for vascular dysfunction in the diabetic heart: prevention by alpha-tocopherol, *Molecular and Cellular Biochemistry*. **188**, 103–111.
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafemen DG and Hoekstra WG.** 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase, *Science* **179**, 588–590.
- Sapin, R. Le Galudec V, Gasser F, Pinget M, Grucker D.** 2001. Elecsys insulin Assay; Free Insulin Determination and the absence of Cross-Reactivity with Insulin Lispro. *Clinical Chemistry*. **47**, 602-605.
- Stapleton SR, Garlock GL, Foellmi-Adams L.** 1997. Selenium potent stimulator of tyrosyl phosphorylation and activator of MAP kinase. *Biochemica and Biophysica Acta*, **1355**, 259–269. DOI: 10.1016/S0167-4889(96)00140-1
- Stapleton SR.** 2000. Selenium: an insulin mimetic. *Cellular and Molecular life Science*. **57**, 1874-1879. DOI: 10.1007/PL00000669
- Strojek K.** 2003. Features of macrovascular complications in type 2 diabetic patients. *Acta*

Diabetologica, **40 (Suppl 2)**, S334– S337. DOI : 10.1007/s00592-003-0115-x

Suthagar E, Soudamani S, Yuvaraj S ,Ismail khan A, Aruldhas MM, Balasubramanian K. 2009. Effects of streptozotocin induced diabetes and insulin replacement on rat ventral prostate. Biomed pharmacother, **63**, 43-50. Doi: 10.1016/j.biopha.2008.01.002

Veki H, Ohkura Y, Moxoyashiki T, Tominage N. and Morita T. 1993. Increase in lipoprotein lipase activity in isolated rat adipose tissue by selenate. Biology and Pharmacology Bull. **16**, 6-10.

Weckbercker G, Cory JG. 1988. Ribonucleotide reductase activity and growth of Glutathione-dependent mouse Leukemia L1210 cells in vitro. Cancer Letter, **40**, 257-264. PMID: 3289734

Zhang, Z, Yu.J and Stanto, RC. 2000. A method for determination of pyridine nucleotides using a single extract. Analytical biochemistry, **285**, 163- 167. DOI: 10.1006/abio.2000.4701

Zhong GG, Jiang Y, Li ZB, Zhang BG, Zhang WJ, Yue G. 1990. Protective action of selenium and manganese on xanthine and xanthine oxidase induced oxidative damage to cultured heart cells. Chinese Medical Journal. **103**, 735-742. PMID:2123774

Effect of Selenium on Cardiovascular Diseases in Alloxan Induced Diabetic Rats

Boussekine.S

*Department of Biology, Institute of Biology
Laboratory of Bioactive Molecules and Applications
Larbi Tebessi University, Tebessa 12000, Algeria
E-mail: boussekinesam@yahoo.fr*

Bouzerna.N

*Department of Biochemistry, Institute of Biology
Laboratory of Biochemistry and Microbiology
Badji Mokhtar University, Annaba 23000, Algeria*

Abstract

Diabetes mellitus is characterized by a serious of complications that affect many organs.

Aim: To investigate the beneficial effect of selenium (sodium selenite) supplementation in the modulation of cardiovascular diseases associated with diabetes mellitus caused by oxidative stress. **Methods:** Twenty four male albino (wistar) rats of 08 weeks of age were randomly divided into three groups of eight each. The first group was served as the control, the second and third groups were intraperitoneally injected with alloxan (150 mg/kg of body weight) to induce diabetes, and the third group was treated by gavages with sodium selenite (2mg/kg b.w.) for further three weeks. **Results:** the administration of alloxan significantly increased blood glucose, total cholesterol, LDL-cholesterol (LDL-c), triglycerides and total lipids. In contrast, HDL-cholesterol (HDL-c), liver glutathione content and liver glutathione peroxydase (GPx) activities were significantly decreased. Oral administration of Sodium selenite restore the parameters measured compared to untreated diabetic. **Conclusion:** To conclude, the present study shows that selenium exerts antioxidant and anti-hyperglycaemic effects and consequently may alleviate cardiovascular damage caused by hyperlipemia and free radicals generated during diabetes.

Keywords: Cardiovascular diseases- Selenium- Alloxan- Rats- Lipids parameters.

Introduction

Diabetes mellitus is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia, dyslipidemia, and disturb protein metabolism that results from defects in both insulin secretion and/or insulin action. The disease is associated with reduced quality of life and increased risk factors for mortality and morbidity. The long-term hyperglycemia is an important factor in the development and progression of micro- and macrovascular complications which include neuropathy, nephropathy, cardiovascular (CVD) and cerebrovascular diseases [1, 2]. The underlying goal of all diabetes treatment and management is to maintain an adequate blood glucose concentration [3].

Cardiovascular disease (CVD) is the major cause of death in patients with diabetes [4]. It is estimated that incidence of CVD is three to seven-fold higher for individuals with diabetes than in the non-diabetic population [5]. Lipoprotein abnormalities have been identified among the several risk factors that could account for this increase in CVD incidence in diabetes [6]. Antioxidant micronutrients are being widely studied for their alleged beneficial properties in the prevention of human diseases, including cancer, arthritis and cardiovascular diseases [7]. Previous studies have shown their efficacy in experimental diabetes mellitus by repressing hepatic glucose production and increasing muscle insulin activity [8]. In STZ-induced diabetic rats, daily sodium selenite treatment (15–20 $\mu\text{mol/kg}$ body weight, intraperitoneally) reduced or normalized high blood glucose levels and restored left ventricular pressure parameters without any positive effect on low insulin level [9, 10]. Recently, in our previous studies, we have demonstrated that treatment of STZ-induced diabetic rats with a low amount of sodium selenite (5 $\mu\text{mol/kg}$, intraperitoneally) compared with the others [9, 10] could protect the ultra structure of heart against diabetes induced alterations, reverse the increase in platelet aggregation and thromboxane B₂, and restore the altered cardiac mechanical and electrical activities [11, 12]. In vitro studies had shown also that when rat adipocytes were incubated with sodium selenite, glucose transport was stimulated markedly [13]. Whether the insulinlike effects of selenium compounds in cultured adipocytes can explain the published beneficial effects in diabetic animals is not well understood yet. Even recently, it has been demonstrated that selenium exerts both insulinlike and non-insulin-like actions in adipocytes [14].

As summarized earlier, there is ample evidence that selenium compounds can restore some metabolic parameters and, to some extent, diminished cardiac function in experimental diabetes. Selenium is an essential dietary component for mammals, including humans. One of its well-understood functions is that it is present in the active center of glutathione peroxidase, which scavenges various peroxidases and protects macromolecules from oxidative damage [15]. Low concentrations of selenium are essential for the synthesis of selenocysteine-containing enzymes [16].

Although selenium compounds are commonly used as a dietary supplement for the treatment of selenium-deficiency diseases [17], the effects of these compounds on the altered antioxidant system of diabetic heart have been controversial [18, 19]. Thus, we aimed to investigate whether beneficial effects extend to the alterations in the blood lipids parameters, liver glutathione and glutathione peroxidase activity which have important roles in the antioxidant defense mechanisms.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Alloxan ($\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_5$) and sodium selenite (Na_2SeO_3) were purchased from Sigma Chemical Co (St Louis, France) and all other chemicals used in the experiment were of analytical grade.

2.2. Animals and Experimental Design

Twenty-four male normal albino Wistar rats of 8 weeks of age with a body weight ranging from 240–260 g were obtained from the Pasteur institute (Algeria). Animals were acclimated for 2 weeks under the same laboratory conditions of photoperiod (12 h light: 12 h dark) with a minimum relative humidity of 40 % and room temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Food (standard diet, supplied by the “ONAB, el harrouch”, Algeria), and water were available ad libitum. Rats were randomly divided into three groups of eight (8) males each. The first group was served as the control; the two other groups were intra peritoneally injected with freshly prepared alloxan monohydrate solution with a single dose of 150 mg /Kg body weight to induce diabetes [15]. After 72 h alloxan injection; the blood glucose level of the whole blood obtained from the tail vein of the over night fasted animal was tested and those with a blood glucose level above 3 g/l were deemed diabetic. One of two groups with diabetes was treated with sodium selenite at 2 mg/kg body weight per day for 21 days. At the end of experimental period,

rats were fasted for 12 hours, and then sacrificed by decapitation and fasting blood sample were collected from the sacrificed animals in plain vial for serum preparation. The remaining blood was centrifuged at 2200xg for 15 min at 04°C, and the serum stored at -20°C for biochemical analysis of: glucose, total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides and total lipids analysis. The livers were rapidly washed with saline and stored at -20°C.

2.3. Tissue Preparation

1 g of liver was homogenized in 2 ml of buffer solution of phosphate buffered Saline 1:2 (w/v: 1g tissue with 2ml PBS, pH 7.4). Homogenates were centrifuged at 10000xg for 15 min at 4°C and the resultant supernatant was used for the determination of glutathione (GSH) content and glutathione peroxidase activity.

2.4. Determination of Glucose, Total Cholesterol, HDL Cholesterol, Triglycerides, Lipids

Plasma glucose level was assayed with a commercial kit (spin react, Spain ref 41011) and determined by enzymatic colorimetric method using glucose oxidase enzyme [20]. However plasma total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides and total lipids were determined by methods using kits from Spinreact (ref: 41021, 1001097, 41031, 1001270) respectively [21, 22, 23, 24]. LDL determined by Friedewald formula [25].

2.5. Determination of Reduced Glutathione

Liver glutathione (GSH) concentration was measured utilizing the method described by weckberker and Cory (1988) [26].

2.6. Determination of Glutathione Peroxidase (GPx)

Glutathione peroxidase (GPx) (E.C.1.11.1.9) activity was measured by the procedure of Flohe and Gunzler (1984) [27]. Supernatant obtained after centrifuging 5% liver homogenate at 1500xg during 10 min followed by 10000xg for 30 min at 4 °C was used for GPx assay. 1ml of reaction mixture was prepared which contained 0.3 ml of phosphate buffer (0.1M, pH7.4), 0.2ml of GSH (2mM), 0.1 ml of sodium azide (10mM), 0.1ml of H₂O₂ (1mM) and 0.3ml of liver supernatant. The reaction was terminated by addition of 0.5ml 5% TCA after 15 min of incubation at 37°C. Tubes were centrifuged at 1500xg for 5 min and the supernatant was collected. 0.2 ml of phosphate buffer (0.1MpH7.4) and 0.7 ml of DTNB (0.4 mg /ml) were added to 0.1ml of reaction supernatant. After mixing, absorbance was recorded at 420 nm.

2.7. Protein Estimation

The protein contents of various samples were determined according to the method of Bradford (1976) [28] by using bovine serum albumin as a standard.

2.8. Statistical Analysis

Analysis of variance (ANOVA) was used to compare multiple group means, followed by student's t-test to determine statistical significance ($p < 0.05$) among the different groups. All statistical analyses were performed using MINITAB software (version 13.31). Results are expressed as means \pm SEM.

3. Results

3.1. Effects of Treatments on Plasma Biochemical Parameters

The effects of oral administration of sodium selenite on glucose and lipids parameters were indicated in table 01. The experimentally induced diabetes decreased level of HDL-c by 27.5% and increased the level of plasma glucose, total cholesterol, LDL-c, triglycerides and lipids respectively by (64%, 11%, 25%, 35%, 27%) compared to the control group. The treatment of diabetic rats with the sodium selenite increased the level of HDL-c by 25% and restored the content of glucose, total cholesterol, LDL-c, triglycerides and lipids respectively by (31%, 08%, 30%, 15%, 14%) compared to the no treated diabetic rats (Table 01).

Table 01: Determination of biochemical parameters concentrations: glucose, total cholesterol, HDL-c, LDL-c, triglycerides, and lipids, in control, diabetic and diabetic rats treated with selenium.

Parameters	experimental groups		
	Control (n = 8)	NTD (n=8)	DT (Se)
Glucose (mM/l)	6.04 ± 0.27***	16.87 ± 0.49	11.65 ± 0.36***
Chol T (mM/l)	2.84 ± 0.14***	3.18 ± 0.16	2.91 ± 0.14**
HDL-c (mM/l)	1.20 ± 0.033***	0.87 ± 0.046	1.16 ± 0.047***
LDL-c (mM/l)	1.00 ± 0.10***	1.34 ± 0.12	0.94 ± 0.12***
Triglycérides (mM/l)	1.25 ± 0.084***	1.92 ± 0.06	1.63 ± 0.092***
Lipids T (mg/dl)	575.3 ± 29***	789.2 ± 22.8	679.7 ± 21*

Each value is a mean ± SEM. The first comparisons of no treated diabetic rats values (NTD) are with control values. Second comparisons of diabetic treated by selenium (DT (Se)) values are with NTD values. *: p ≤ 0.05. **: p ≤ 0.01. ***: p ≤ 0.001.

3.2. Effects of Treatments on Hepatic Tissue Parameters

Diabetes induced a decrease of GSH content (27%) and GPx activity (24%) in liver tissue compared to the control group. Administration of sodium selenite to the diabetic rats increased the GPx activity (44%) and the GSH content (25%) compared to the diabetic group.

Figure 1: Reduced glutathione (nmol/mg protein) levels in liver of control, control diabetic (NTD) and diabetic treated with selenium (DTSe), after 3 weeks of treatment. Values are given as mean ± SEM. *: p ≤ 0.05. **: p ≤ 0.01. ***: p ≤ 0.001

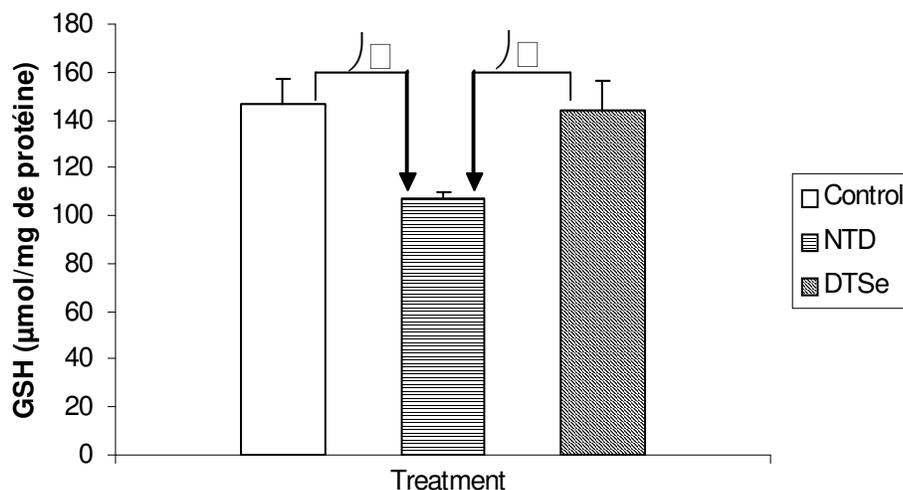
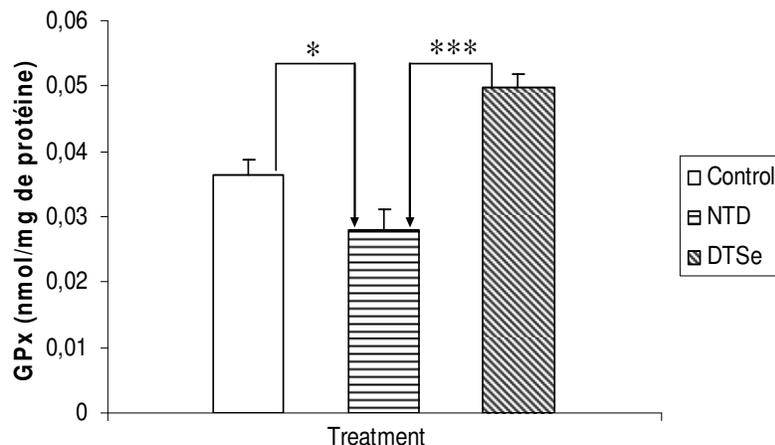


Figure 2: Enzyme activities of GPx ($\mu\text{mol GSH}/\text{mg protein}$) in liver of control, control diabetic (NTD) and diabetic treated with selenium (DTSe), after 3 weeks of treatment. Values are given as mean \pm SEM. *: $p \leq 0.05$. **: $p \leq 0.01$. ***: $p \leq 0.001$.



4. Discussion

This study demonstrates that Selenium is known to act to prevent free radical damage to cells. Selenium has been administered to humans to reduce the incidence and severity of Keshan disease, a cardiomyopathy which occurs in selenium-poor areas of China. Theoretically, diabetics who have an increased incidence of heart disease, may benefit both from an improvement in glucose homeostasis due to selenite treatment as well as from a direct cardioprotective effect of the element.

The plasma glucose levels were reduced in alloxan diabetic rats by the administration of sodium selenite. This observation is in accordance with previous report. Since Ezaki (1990)[13], reported that selenite has insulin-like effects in vitro in rats adipocytes, there were many investigations focused on the insulin-mimicking properties of selenium in vitro as well as in vivo. McNeill and al (1991) [29] proved that selenite showed the insulin-like effect in intact diabetic rats with intra peritoneal sodium selenite injection ($10\text{-}15\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{d}$) for 7 wk restored plasma glucose, food intake and water intake to the control or near the control level. Other studies on oral administration of selenium to diabetic rats or mice also obtained similar results [30]. Our study with a medium oral dose of $2\text{mg}/\text{kg}/\text{d}$ ($11,6\mu\text{mol}/\text{kg}$) selenite was able to lower the blood glucose of alloxan-induced Kun-Ming mice [31], but this insulin-like effect only started to appear conspicuously after 2 wk of selenite treatment, which was in accord with Mc Neill's study (1991), Although there were investigation focused on the mechanism of insulin-like properties of selenium, such as activating key proteins involving in insulin-signal cascade, stimulating glucose up take and regulating metabolic processes like glycolysis, gluconeogenesis, fatty acid synthesis, and the pentose phosphate pathway [32, 33], these hardly provided an eloquent explanation of selenium's characteristics on the blood glucose lowering action as an insulin mimetic such as needing a long time of administration to trigger the decrease of hyperglycemia and its inability to induce the symptoms of hypoglycemia in diabetic animals. Further studies are needed to clarify the mechanism underlying the characterization and specific mode of insulin-like actions of selenium differing from insulin or vanadium.

The present results demonstrated that diabetes significantly increased the levels of total cholesterol, LDL-c, triglycerides, total lipids and decreased of HDL-c which did have a direct detrimental effect on heart function, these results are in accordance with those of other investigations [34, 35, 36]. Oral administration of sodium selenite significantly ameliorated the adverse influence of alloxan. There are a few studies which suggest that selenium levels per se may be important in heart function [37, 38].

GSH is a tripeptide consisting of glycine, cysteine and glutamic acid moieties. Any change in the rate of GSH synthesis or utilization can profoundly influence the redox status of cells [39]. GSH functions to scavenge oxidants or xenobiotics by covalently binding them and transporting the resulting metabolites through an adenosine triphosphate (ATP)-dependent system [40]. It also functions in the synthesis of important macromolecules and in the protection against reactive oxygen compounds [41]. A decrease in GSH levels disorganizes and disorients the mitochondria of the cell, resulting in a reduced supply of ATP, thereby limiting optimal cellular and physiological functions in the diabetic state [42]. Several studies showed that alloxan produces a decrease in the activity of the antioxidant enzymes during the development of alloxan-induced type I DM in liver, pancreas and testis [43, 44]. In our experimental model of DM, it was observed that alloxan administration produced a significant decrease in hepatic GSH content and GPx activity respectively by 23.77%, 26.75%. The diminished of GSH may suggest the possibility of two pathways. The first is due to the higher levels of superoxides and free radicals GSH converts more to oxidized glutathione (GSSG) and the second, is a high rate of conversion of GSH to hydrogen-sulfide (H_2S) during the diabetes process as GSH converts to H_2S in the liver and is ultimately excreted out [45]. Again, by controlling the breakdown of GSH to H_2S as well as by scavenging free radical oxygen, In contrast, sodium selenite raised Hepatic GPx and GSH respectively by (44%, 25.22%) as compared to diabetic group (fig 01, 02). Sodium selenite maintains a higher GSH level which is beneficial for reducing super oxides generated during diabetes.

In conclusion, the study clearly demonstrated the administration of sodium selenite to diabetic rats change glucose and lipids parameters, which play an important role in oxidative stress, to near normal values.

References

- [1] Altan, V.M., 2003. The pharmacology of diabetic complications. *Current Medicinal Chemistry* 10, 1317– 1327.
- [2] Strojek K., 2003. Features of macrovascular complications in type 2 diabetic patients. *Acta Diabetologica* 40 (Suppl 2), S334– S337.
- [3] Charpentier G., 2002. Oral combination therapy for type 2 diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 18 (Suppl 3), S70– S76.
- [4] Giugliano D., Ceriello A., Paolisso G., 1996. Oxidative stress and diabetic vascular complications, *Diabetes Care* 19, 257–267.
- [5] Rosen P., Du X., Tschöpe D., 1998. Role of oxygen-derived radicals for vascular dysfunction in the diabetic heart: prevention by alpha-tocopherol, *Mol. Cell Biochem.* 188, 103–111.
- [6] Assmann G., Schulte H., 1988. The Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) study: prevalence of hyperlipidemia in persons with hypertension and/or diabetes mellitus and the relationship to coronary heart disease, *Am. Heart J.* 116 , 1713–1724.
- [7] Bidlack WR., 1996. Interrelationships of food, nutritiand health: the National Association of State Universities and Land Grant Colleges White Paper. *J Am Coll Nutr.* 15:422–33.
- [8] Guerrero-Romero F, Rodriguez-Moran M., 2005. Complementary therapies for diabetes: the case of chromium. *Magnesium Antioxidants.* 36:250–7..
- [9] McNeill J.H., Delgatty H.L.M., and, Battell M.L., 1991. Insulinlike effects of sodium selenate in streptozotocin-induced diabetic rats, *Diabetes* **40**, 1675–1678.
- [10] Battell M.L., Delgatty H. L. M., and McNeill J. H., 1998. Sodium selenate corrects glucose tolerance and heart function in STZ diabetic rats, *Mol. Cell. Biochem.* **179**, 27–34.
- [11] Ayaz M., Can B., Ozdemir S and Turan B., 2002. Protective effect of selenium treatment on diabetes-induced myocardial structural alterations, *Biol. Trace Element Res.* **89**, 215–226.
- [12] Ayaz M., Ozdemir S., Ugur M., Vassort G ,& Turan B., 2004. Effects of selenium on altered mecanicai and electrical cardiac activities of diabetic rat, *Arch. Biochem. Biophys.* **426**, 83–90.

- [13] Ezaki O., 1990. The insulin-like effects of selenate in rat adipocytes, *J. Biol. Chem.* **265**, 1124–1130.
- [14] Heart H & Sung C.K., 2003. Insulin-like and non-insulin-like selenium actions in 3T3-L1 adipocytes, *J. Cell. Biochem.* **88**, 719–731.
- [15] Rotruck J. T., Pope A. L., Ganther H. E., Swanson A. B., Hafemen D. G, & Hoekstra W. G., 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase, *Science* **179**, 588–590.
- [16] Koller L. D & Exon J. H., 1986. The two faces of selenium-deficiency and - toxicity are similar in animals and man, *Can. J. Vet. Res.* **50**, 297–306.
- [17] Neve J., 1991. Physiological and nutritional importance of selenium, *Experienta* **47**, 187–193.
- [18] Mak D. H., Ip S. P., Li P. C., Poon M. K., & Ko K. M., 1996. Alterations in tissue glutathione system in streptozotocin-induced diabetic rats, *Mol. Cell. Biochem.* **162(2)**, 153–158.
- [19] Doi K., Sawada F., Toda G., 2001. Alteration of antioxidants during the progression of heart disease in streptozotocin-induced diabetic rats, *Free Radical Res.* **34(3)**, 251–261.
- [20] Kaplan LA., Kaplan A., 1984. Glucose. Clin Chem the C.V Mosby CO. St LouisToronto. Princeton, 1032 -1036.
- [21] Naito H.K., Kaplan A., 1984. Cholesterol;. Clin Chem the C.V Mosby CO. St Louis Toronto. Princeton :1194-11206 and 437.
- [22] Naito H.K., Kaplan A., 1984. HDL-Cholesterol;. *Clin Chem the C.V Mosby CO. St Louis Toronto. Princeton* :1207-1213 and 437.
- [23] Buccolo, G., 1973. Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. *Clin Chem*: 19(5); 476-482.
- [24] Kaplan A., 1984. Lipids. Clin Chem : 918-919.
- [25] Friedewald W.T., Levei R.I., Fridrickson D.S., 1972. Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultracentrifugation . Clin Chem, 18; 499-502.
- [26] Weckbercker G., Cory J.G., 1988. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-dependent mouse Leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Letter*, 40: 257.
- [27] Flohe , Gunzler ., 1984. Analysis of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.* 105, 114–121.
- [28] Bradford M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–54.
- [29] McNeill J.H., Delgatty L.M & Battell M.L., 1991. Insulinlike effects of sodium selenate in streptozotocin diabetic rats, *Diabetes*, 40: 1675–1678.
- [30] Ghosh R., Mukherjee B & Chatterjee M., 1994. A novel effect of selenium on streptozotocin induced diabetic mice, *Diabetes Res*, 25: 165–171.
- [31] Ding H., Pen R., Chen J., 1997. Effect of selenite and *allitridi* on the diabetic mice, *Acta Nutr. Sini.* 19: 384–387.
- [32] Stapleton S.R., Garlock G.L., Foellmi-Adams L., 1997. Selenium potent stimulator of tyrosyl phosphorylation and activator of MAP kinase, *Biochim. Biophys. Acta* , 1355: 259–269.
- [33] Hei Y.J., Farahbakhshian S., Chen X., 1998. Stimulation of MAP kinase and S6 kinase by vanadium and selenium in rat adipocytes, *Mol. Cell. Biochem*, 178: 367–375.
- [34] Opie L.H., 1970. Effect of fatty acid on contractility and rhythm of the heart. *Nature (London)* 227: 1055–1066.
- [35] Rodrigues B.B., McNeill J.H., 1986. Cardiac function in spontaneously hypertensive diabetic rats. *Am J Physiol* 251: H571–H580.
- [36] Rodrigues B.B., Goyal R.K., McNeill J.H., 1986. Effects of hydralazine on streptozotocin induced diabetic rats: Prevention of hyperlipidemia and improvement in cardiac function. *J Pharmacol Exp Ther* 237: 292– 299.

- [37] Zhong G.G., Jiang Y., Li Z.B., Zhang B.G., Zhang W.J., Yue G., 1990. Protective action of selenium and manganese on xanthine and xanthine oxidase induced oxidative damage to cultured heart cells. *Chin Med J* 103: 735–742.
- [38] Koehler H., Peters H.J., Pankau H., Duck H.J., 1988. Selenium in cardiology and angiology. *Biol Trace Elem Res* 15: 157–167.
- [39] Deneke S.M., Fonburg B.L., 1988. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol*, 257: L 163-73.
- [40] Yoshida K., Hirokawa J., Tagami S., 1995. Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus : regulation of glutathione synthesis and efflux. *Diabetologia* , 38 : 201 – 10.
- [41] Adams J.D., Lauterburg B.H., Mitchell J.R., 1984. Plasma glutathione and glutathione disulfide in rat: regulation and response to oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther* , 277; 749-54.
- [42] L'Abbe M.R., Trick K.D., 1994. Changes in pancreatic glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in the prediabetic diabetes-prone BB rat. *Proc Soc Exp Biol Med*, 207 : 206-12.
- [43] Soto C.P., Perez B.L., Favari L.P., Reyes J.L., 1998. Prevention of alloxan-induced diabetes mellitus in the rat by silymarin. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 119:125– 129.
- [44] El-Missiry M.A., 1999. Enhanced testicular antioxidant system by ascorbic acid in alloxan diabetic rats. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* , 124: 233–237.
- [45] Bedwal R.S., Nair N., Sharma M.P., Mathur R.S., 1983. Selenium - its biological perspectives. *Med Hypothesis*, 41; 150-9.