

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**



UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE

en vue de l'obtention du diplôme de Magistère en Biologie et physiologie animale

Option : Ecotoxicologie

Thème

**L'Etude de l'effet prophylactique d'antioxydants SOD
mimétiques : le tempol et la Glisodine ® sur le système
antioxydant enzymatique du tissu cardiaque chez un
modèle animal diabétique(le Rat).**

Présentée par :

M^{lle} MESSAOUDI Asma

Devant la commission d'examen :

Président : Mr TAHRAOUI. A.

Directeur de recherche : Mr OUALI. K.

Examineur : Mr KHELILI .K.

Examinatrice : M^{me} DAAS .O.

Professeur

Maître de conférences

Professeur

Maître de conférences

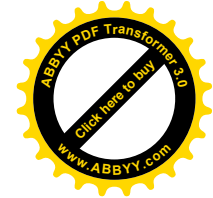
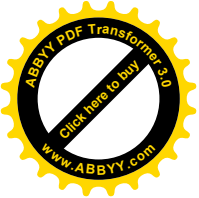
Université d'Annaba

Université d'Annaba

Université d'Annaba

Université d'Annaba

2009-2010



REMERCIEMENTS

*Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur **Abdelkrim Tahraoui** d'avoir accepté de juger ce travail et d'en présider le jury. Je tiens particulièrement à lui exprimer ma grande reconnaissance pour sa disponibilité, de précieux conseils et ses généreux encouragements.*

*Je tiens particulièrement à exprimer ma grande gratitude au Docteur **Kheireddine OUALI** mon directeur de thèse pour votre aide, vos précieux conseils, votre disponibilité, , votre optimisme et votre dynamisme qui font que travailler à vos côtés est un réel plaisir et un réel enrichissement.*

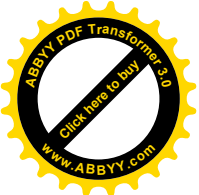
*Mes sincères remerciements vont également à, monsieur le professeur **K. KHELIL** pour avoir répondu favorablement, pour jurer ce travail et également pour sa disponibilité et ses orientations.*

*Je remercie également, madame **O. DAAS** d'avoir bien voulu examiner ce travail. Merci pour votre disponibilité et votre gentillesse.*

*Ma plus sincère gratitude va à madame **OUALI Fouzia**, Je la remercierai pour sa présence, son aide et sa gentillesse de tous les instants.*

*Mes remerciements vont aussi à ma famille : **mes chers parents** ; leur présence et leurs encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais, **mes chères sœurs** que leur chemin soit jalonné de bonheur et de réussite.*

*Un tendre merci à **Sofiane** pour son grand soutien, si compréhensif et ses généreux encouragements, je te souhaite tout le bonheur du monde et que dieu le g*



Résumé

Ce projet a pour but d'étudier et de caractériser les altérations fonctionnelles des cellules endothéliales induits par le stress gluco-oxydant d'un tissu cardiaque chez un model animal (rat diabétique) et examiner les effets préventifs d'un traitement avec antioxydants : la Glisodine ® et Le Tempol (4-Hydroxy-TEMPO ; 4 hydroxy-2,2,6 tetramethylpiperidine-1-oxy) durant 04 semaines.

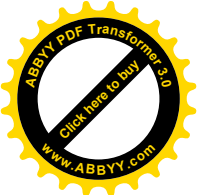
En effet l'administration de la streptozotocine a provoqué un diabète expérimental chez ce model animal révélé par une hyperglycémie. les paramètres métaboliques, biomarqueurs de l'état cardiaque et du stress oxydant ont été mesurés.

Nos résultats indiquent clairement la présence d'une dysfonction endothéliale qui se caractérise par une augmentation du biomarqueurs cardiaques et une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes chez les rats diabétiques non traités. Par contre, le traitement préventif avec antioxydants améliore ou normalise ces paramètres.

Toutefois ces résultats obtenus montrent que la Glisodine et le Tempol peuvent être utilisés comme adjuvant pour un traitement antidiabétique.

MOTS CLES

Diabète, stress oxydant, dysfonction endothéliale, antioxydant ; superoxyde dismutase, le tempol, glisodine.



Summary

The purpose of this project is to study and characterize functional deteriorations of the cells endothéliales induced by the stress gluco-oxidant of has cardiac fabric At animal year model (rat diabetic) and to examines the preventive effects of has treatment with antioxydants:la Glisodine ® and Tempol (4-Hydroxy-Tempo; 4 hydroxy-2,2,6 tetramethylpiperidine-1-oxyl) during 04 weeks.

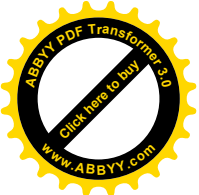
Indeed the administration of the streptozotocine caused an experimental diabetes at this model animal revealed by an hyperglycemia. the metabolic parameters, biomarqueurs of the cardiac state and the oxidizing stress were measured.

Our results clearly indicate the presence of a dysfonction endothéliale which is characterized by an increase in the cardiac biomarqueurs and a reduction in the activity of the antioxydant enzymes in the untreated rats diabetic. On the other hand, the preventive treatment with antioxydants improves or standardizes these parameters.

However these results obtained show that Glisodine and Tempol can be used like additive for a treatment antidiabetic.

MOTS CLES

Diabète, stress oxydant,dysfonction endothéliale,antioxydant ;suproxyde dismutase,le tempol,glisodine.



المخلص

الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير التوتر التاكسدي الناتج من ارتفاع نسبة السكر في الدم على فئران مصابة بالداء السكري واختبار تأثيرا لعلاج الوقائي بالمضادات المؤكسدة على وظائف الخلايا الاطلائية لنسيج القلب عند فئران مصابة بالداء السكري خلال أربع أسابيع .

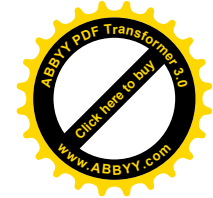
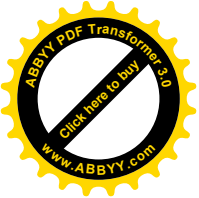
إن تعاطي سترابتزوتوسين يؤدي إلى إصابة الفئران بداء السكري و ارتفاع نسبة السكر في الدم . قياس العوامل الأيضية و الإنزيمية للحالة القلبية و التوتر التاكسدي.

من خلال النتائج التي توصلنا إليها تبين وجود اضطراب واضح في وظائف الخلايا الاندوتيلية مرفوقا بارتفاع إنزيمات القلبية وانخفاض إنزيمات المضادات المؤكسدة عند فئران مصابة بالداء السكري وبدون علاج. على العكس ا لعلاج الوقائي بالمضادات المؤكسدة حسن هذه العوامل.

هذه النتائج المتحصل عليها تدل على أن Tempol و glisodine لديهم الأمكانية العلاجية ضد مرض السكري.

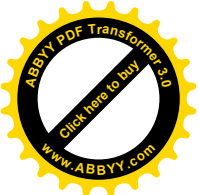
مفتاح الكلمات

مرض السكري- التوتر التاكسدي- المضادات المؤكسدة.



Liste des abréviations

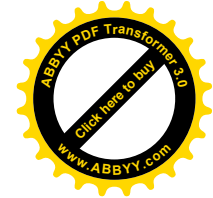
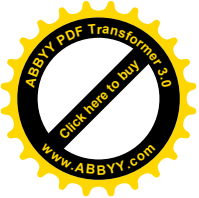
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGE	Produit de glycation
AngII	Angiotensine II
BSA	Albumine sérique bovine
CAT	Catalase
CDNB	Chlorodinitrobenzène
CK	Creatinine kinase
DTNB	Acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque
EDHF	Facteur hyperpolarisé dérivé de l'endothélium
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique sel sodique
ET-1	Endothéline-1
GAE	Groupe Agricole de l'Est, EL Harrouche
GK	Glycérol kinase
GPO	Glycérol phosphate
GSH	Glutathion réduit
GST	Glutathion-S-transférase
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HCl	Acide chlorhydrique
Hk	Hexokinase
LDH	Lactate désydrégénase
LDL	lipoprotéines de faible densité
LDL _{ox}	Lipoprotéines de faible densité oxydées
LPL	Lipoprotéine-lipase
NAC	N-acétylcystéine
NaCl	Chlorure de sodium
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NADP ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme oxydé)
NO	Oxyde nitrique ou monoxyde d'azote
NOS	Synthase de l'oxyde nitrique
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
ONOO ⁻	Peroxynitrite
PGI ₂	Prostacycline
PO	Peroxydase
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SOD	Super oxyde dismutas
SSA	Acide sulfosalysitique
STZ	Streptozotocine
TG	Triglycérides
TXA ₂	Thromboxane A ₂



SOMMAIRE DES FIGURES

N°	FIGURES	Pages
1	Rôle du stress oxydant dans le développement de l'insuffisance cardiaque.	2
2	Représentation schématique du stress oxydatif induit par l'hyperglycémie.	4
3	Protocol experimental	7
4	<i>la structure chimique de de la Streptozotocine</i>	8
5	<i>Mécanisme d'induction du diabète expérimental par la STZ chez le rat.</i>	9
6	<i>la structure chimique du tempol et sa réduction au niveau tissulaire.</i>	9
7	<i>l'activité antioxydante du tempol de type SOD mimétique contre les espèces</i>	10
8	La Glisodine (la SOD + Gliadine), une formule végétale originale.	11
9	<i>Représentation schématique du transit et de l'absorption intestinale de la SOD couplée à la gliadine.</i>	12
10	<i>Courbe des standards MDA</i>	18
11	<i>Variation du poids corporel en gramme chez les rats témoins ,diabétiques et traités.</i>	29
12	<i>poids absolu et relatif du foie chez le lot témoin ,diabetiquet et les lots traités par le tempol et la glisodine.</i>	30

N°	FIGURES	Pages
13	poids absolu et relatif du cœur chez le lot témoin ,diabetique et les lots traités par le tempol et la glisodine.	31
14	Variation de la concentration plasmatique du glucose chez les rats témoins et diabétiques traités par le tempol et la glisodine	33
15	Variation des concentrations en triglycerides et cholestérol chez les rats témoins et diabétiques traités par le tempol et la glisodine.	34
16	Variation de la concentration plasmatique des lipoperoxydes chez les rats témoins et diabétiques traités par le tempol et la glisodine.	35
17	variation de l'activité de la lactate deshydrogénase LDH chez les ratstémoins et diabétiquestraités par le tempol et la glisodine.	36
18	variation de l'activité de la créatine phosphokinase CPK chez les rats témoins et diabétiques traités par le tempol et la glisodine	37
19	Variation de l'activité de la du glutathion réduit en nmol/mg protéine et de la GST chez les rats témoins et traité	39
20	Variation de l'activité de la catalase et de la SOD en U/mg protéine chez les rats témoins et et diabétiques traités par le tempol et la glisodine.	40
21	Rôle du NO dans la régulation moléculaire du processus de vasodilatation	41
22	Mechanism of hyperglycaemia on collagen glycation, AGEformation and collagen cross-linking	43



SOMMAIRE DES TABLEAUX

N°	TABLEAUX	pages
1	Lots expérimentaux	20
2	Courbe de volumes standard de dilution.	21
3	Protocole utilisé pour le dosage de l'activité CAT.	21
4	Protocole utilisé pour le dosage de l'activité GST	22
5	Protocole utilisé pour le dosage du SOD.	22
6	Réalisation de la gamme d'étalonnage.	23
7	Effet de la glisodine et du tempol sur la variation du poids corporel, du foie et de cœur en gramme chez les rats témoins et diabétiques.	24
8	Effet de la glisodine et du tempol sur la variation plasmatique des paramètres métaboliques, le glucose en g/l, les triglycerides, le cholestérol en mg /dl et les lipoperoxydes en nmol/ml chez les rats témoins et diabétiques.	24
9	variation de l'activité de deux marqueur enzymatique de l'état cardiaque la lactate deshydrogénase LDH et la créatine phosphokinase CPK en U/l chez les rats témoins et diabétiques.	25
10	Variation de l'activité de la du glutathion réduit en nmol/mg protéine et de la GST en nmol CDNB/min/mg protéine chez les rats témoins et traités.	25

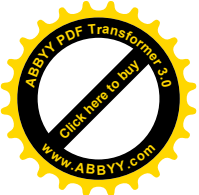
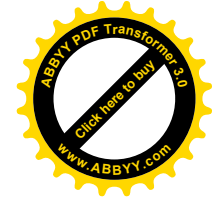
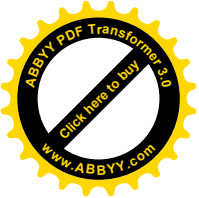
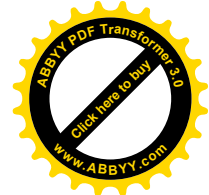
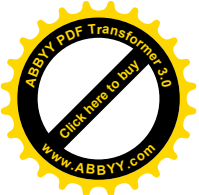


Table des matières

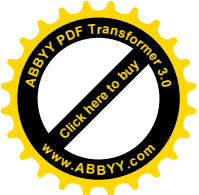
1. INTRODUCTION	1
2. MATERIEL ET METHODES	5
2.1. Matériel biologique	5
2.1.2. Condition d'élevage	5
2.2. Méthodes	7
2.2.1. Traitement des animaux	7
2.2.1.1. Induction du diabète mellitus	7
2.2.1.2. Traitement antioxydant par tempol	8
2.2.1.3. Traitement antioxydant par la SOD végétale (la Glisodine®)	10
Préparation des prélèvements	10
2.2.3.1. Décapitation et prélèvement sanguin	10
2.2.3.1. Dissection et prélèvement des organes	10
2.2.4. Dosages enzymo-colorimétriques	12
2.2.4.1. Dosage du glucose plasmatique	12
A/Principe	12
B/Mode opératoire	12
C/ Calcul de la concentration	12
2.2.4.3. Dosage des triglycérides plasmatiques	13
A/Principe	13
B/Mode opératoire	13
C/ Calcul de la concentration	13
2.2.4.2. Dosage de cholestérol plasmatique	14
A/Principe	14
B/Mode opératoire	14
C/ Calcul de la concentration	14
2.2.4.4. Dosage des lipoperoxydes LPO	15
A/Principe	15
B/Mode opératoire	15
C/ Calcul de la concentration	15
2.2.4.4. Dosage de la lactate déshydrogénase (LDH)	17
A/Principe	18
B/Mode opératoire	18
C/ Calcul de la concentration	18
2.2.4.5. Dosage de la Créatine-kinase (CPK)	18
A/Principe	19
B/Mode opératoire	20
C/ Calcul de la concentration	20
2.3. Exploration du statut antioxydant	20
2.3.1. Dosage de l'activité de la catalase (CAT)	20
A/Principe	21
B/Mode opératoire	21
C/ Calcul de la concentration	21
2.3.2. Dosage de l'activité du glutathion (GSH)	22
A/Principe	22



B/Mode opératoire	22
C/ Calcul de la concentration.....	22
2.3.3 Dosage de l'activité des GST.....	23
A/Principe.....	23
B/Mode opératoire	24
C/ Calcul de la concentration.....	24
2.3. 3.Dosage de l'activité de super oxyde dismutase.....	24
A/Principe.....	24
B/Mode opératoire.....	24
C/ Calcul de la concentration.....	24
2.2.5.2. Dosage des protéines tissulaires.....	25
A/Principe.....	25
B/Mode opératoire	25
C/ Calcul de la concentration.....	26
3.RESULTATS.....	27
3.1.Etude pondérale.....	27
3.1.1 Effet de la glisodine et du tempol sur la variation du poids corporel, du foie et de cœur chez les rats témoins et diabétiques.	27
3.2. Etude des réponses métaboliques.....	30
3.2.1 Effet de la glisodine et du tempol sur la variation plasmatique des paramètres métaboliques, le glucose les triglycerides, le cholestérol chez les rats témoins et diabétiques.	31
3.3. Etude des biomarqueurs de l'état cardiaque.....	34
.. 3.3.1. Effet de la glisodine et du tempol sur la variation de l'activité marqueurs de deux enzymatique de l'état cardiaque la lactate deshydrogénase et la créatine phosphokinase chez les rats témoins et diabétiques.	34
3.4. Analyse du stress oxydant.....	36
3.4.1 Effet de la glisodine et du tempol sur la variation des marqueurs du stress oxydant dans le tissu cardiaque des rats témoins et diabétiques.	36
4. DISCUSSION	41
5. CONCLUSION	46
6. REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES	47



INTRODUCTION



1. Introduction

Le diabète sucré est un désordre métabolique caractérisé par une hyperglycémie chronique et une perturbation des métabolismes glucidique, lipidique et protéique. Il résulte d'une déficience de la sécrétion et/ou de l'activité de l'insuline (Bonnefont & Rousselot, 2002). Les maladies cardio-vasculaires constituent la cause majeure de décès chez les patients diabétiques, la lutte et la prévention de ces complications représentent un véritable problème de santé publique (Laasko, 1997).

L'endothélium vasculaire constitue une interface cellulaire obligatoire entre le sang circulant et la paroi vasculaire. Il est considéré aujourd'hui comme une véritable glande endocrine capable de moduler la plupart des fonctions vasculaires pour maintenir l'homéostasie circulatoire (Lüscher & Noll, 1995 ; Davignon *et al.*, 2004). La régulation du tonus vasculaire, de l'adhésion cellulaire, de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et des processus inflammatoires en sont des exemples (Deanfield *et al.*, 2007). L'endothélium module le tonus et la vasomotricité vasculaire en libérant de nombreux facteurs de relaxation et de contraction (Brenner & Rector, 2004). Parmi les agents vasoconstricteurs, on identifie l'ET-1, le TXA₂, la PGF₂ et l'AngII. En contrepartie, les vasodilatateurs comprennent entre autres le NO, la PGI₂ et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF). Dans des conditions physiologiques normales, il existe un équilibre précis entre les facteurs relaxants et contractants (Boulanger, 1999).

Depuis une vingtaine d'années, les données expérimentales démontrent que l'endothélium vasculaire est une cible privilégiée des facteurs de risque cardiovasculaire (Furchgott *et al.*, 1980). Il peut subir des modifications fonctionnelles, ces modifications subies par l'endothélium sont regroupées sous le terme de « dysfonction endothéliale ». La perte de la vasodilatation dépendante de l'endothélium avec pour médiateur le NO (concept de dysfonction endothéliale) est devenue un indicateur de la dysfonction endothéliale, cet aspect de la dysfonction contribue de manière importante aux différents processus de développement des complications cardiovasculaires (Endemann, 2004).

Le diabète de type 2, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie, l'hyperhomocystéinémie, le tabagisme, l'obésité ou encore Le vieillissement sont autant de facteurs de risque cardiovasculaire associés généralement à une dysfonction endothéliale (Poredos, 2002).

Il y existe réellement des preuves qu'en présence de facteurs de risque cardio-vasculaire, le rôle protecteur de l'endothélium est diminué. L'hyperglycémie est un important facteur de risque de développement de maladies cardio-vasculaires. La relation entre le diabète et les maladies cardiovasculaires précoces est bien établie (Laasko *et al.*, 1997). L'état d'hyperglycémie chronique du diabète sucré conduit à un stress oxydant, c'est-à-dire un déséquilibre entre pro-oxydants et anti-oxydants au profit des premiers. Ce stress oxydant pourrait être impliqué dans les atteintes tissulaires et pourrait représenter un nouveau facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires au cours du diabète (Betteridge, 2000 ; Baynes *et al.*, 1999).

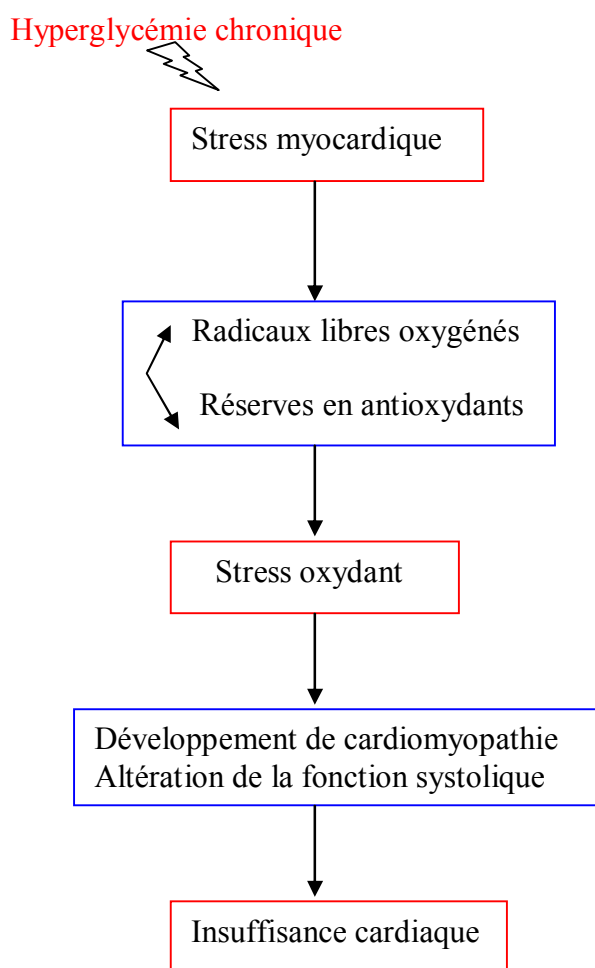
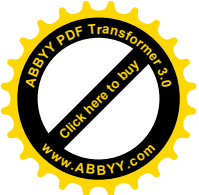


Figure 1 : Rôle du stress oxydant dans le développement de l'insuffisance cardiaque (Signal *et al.* 1998).



Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans la genèse d'un stress oxydant dans des conditions d'hyperglycémie chronique : auto-oxydation du glucose, surproduction de radicaux superoxyde par la chaîne respiratoire mitochondriale et par activation de la NADPH oxydase vasculaire, voie des polyols, et formation de produits de glycation avancée (**Koya King, 1998**). L'augmentation de la production des ROS et la diminution des systèmes d'épuration de radicaux libres ont été décrites dans le diabète. Que les radicaux libres participent aux effets délétères d'une concentration élevée de glucose a été suggéré par plusieurs études montrant qu'un nombre d'épurateurs de radicaux libres prévenait et restaurait l'altération de la relaxation dépendante de l'endothélium chez des animaux diabétiques ainsi que dans des artères normales exposées à des concentrations élevées de glucose (**Tesfamariam et al., 1992**).

Plusieurs études ont montré que le stress oxydatif contribue grandement au développement de la dysfonction vasculaire des cellules endothéliales du diabétique. Ainsi, dans les modèles animaux de diabète, les relaxations dépendantes de l'endothélium peuvent être rétablies par un traitement par des anti-oxydants (**Tesfamariam et al., 1990**).

Dans la plupart des publications scientifiques ont indiqué que de manière générale le dysfonctionnement endothélial résultait d'une réduction de la biodisponibilité du NO. Les raisons d'une diminution de la biodisponibilité du NO dérivé de l'endothélium sont expliquées par la dissociation du NO par des espèces réactives à l'oxygène (ROS) chez les patients diabétiques (**Forgione et al., 2000**) (**Fig.2**). L'anion super oxyde (O_2^-) a été identifié comme étant un médiateur clé dans plusieurs des actions nuisibles des dérivés de l'oxygène. De plus, une production excessive d' O_2^- favorise la réaction entre l' O_2^- et le NO produit par l'enzyme eNOS, ce qui entraîne la production de peroxynitrite ($ONOO^-$) et réduit par conséquent la biodisponibilité du NO pour d'autres réponses biologiques, dont notamment la vasorelaxation dépendante de l'endothélium. Le $ONOO^-$ ainsi formé est un agent oxydant extrêmement puissant, capable d'endommager plusieurs molécules biologiques et de causer d'importants préjudices tissulaires et donc, de contribuer à la dysfonction endothéliale. D'autre part, le $ONOO^-$ a aussi la propriété d'initier la peroxydation des lipides et donc, de contribuer à la formation de LDL oxydées constituant des acteurs majeurs du développement de la plaque d'athérome et du dysfonctionnement vasculaire (**Thomas et al., 2003**).

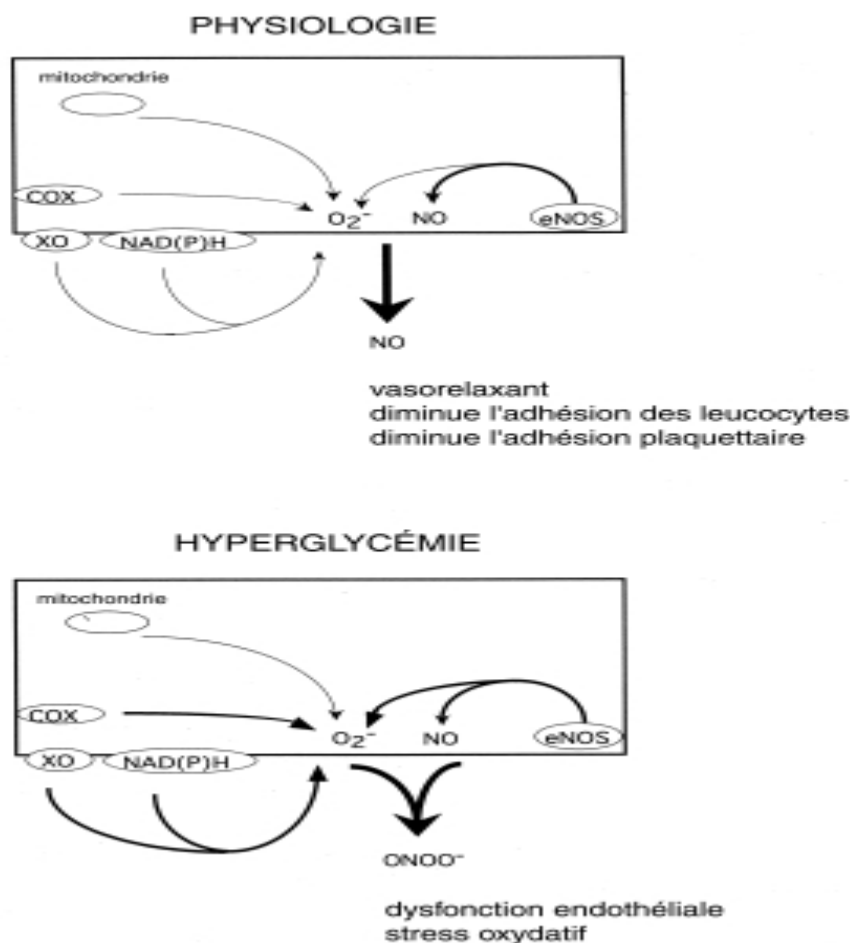
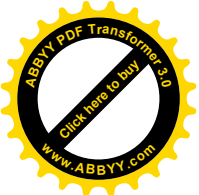


Figure2 : Représentation schématique du stress oxydatif induit par l'hyperglycémie. Cyclooxygénase (COX), xanthine oxydase (XO), phosphate dinucléotide nicotinamide adénine réduit (NADPH) et synthétase endothéliale de l'oxyde nitrique (eNOS) sont des sources potentielles d'anions superoxydes (O_2^-). $ONOO^-$, peroxynitrite (Wever et al. 1998).

Pour faire face aux radicaux libres produits en excès, les cellules possèdent des mécanismes de défense antioxydants endogènes enzymatiques et non enzymatiques. Les antioxydants ont comme principal rôle de neutraliser et de dégrader les radicaux libres toxiques pour les tissus. Parmi les différents antioxydants, les plus connues sont les enzymes suproxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et les vitamines A, C et E (Laight et al., 2000).



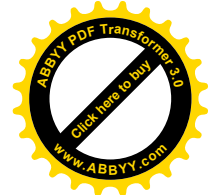
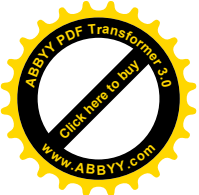
Plusieurs études ont démontré l'importance de la SOD dans le maintien de la réactivité vasculaire. En fait, elle est l'enzyme antioxydante qui protège l'organisme contre les anions O_2^- la plus importante dans toutes les cellules vasculaires. La SOD catalyse la dismutation de l' O_2^- de la manière suivante :



Il arrive cependant que dans certaines situations particulières, comme par exemple dans le cas d'hyperglycémie, les quantités produites d' O_2^- excèdent la capacité antioxydante locale. Il s'en suit alors un stress oxydant au niveau des cellules endothéliales qui altère leur fonction normale ([Wassmann et al ., 2004](#)).

Devant ces situations, le concept d'une thérapie à l'aide d'antioxydants ([Muzykantov et al ., 2004](#)), dans le but de renforcer les défenses antioxydantes endogènes pour une protection plus efficace contre le stress oxydatif, représente une perspective et une voie thérapeutique crédible et d'intérêt scientifique et public.

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence que le stress gluco-oxydant induit une perturbation au niveau des antioxydants cardiaque qui est à l'origine contribuant de la survenue des complications cardiovasculaires lors d'un diabète expérimentale chez le rat. D'autre part est ce que le traitement des rats diabétiques par des antioxydants SOD mimétiques le tempol (4-hydroxy-2, 2, 6,6-tétraméthylpipéridine-*N*-oxyl) et la glisodine une super oxyde dismutase végétale pourrait renverser cette situation et de rétablir les capacités de défense des antioxydants endogènes.



MATERIEL ET METHODES

2.2. Méthodes

2.2.1. Traitement des animaux

2.2.1.1. Induction du diabète mellitus

Le diabète est induit par une seule injection de streptozotocine (MO, Sigma Chemical) par voie intra péritonéale à raison de 60mg/kg, préparée extemporanément dans du tampon citrate buffer de 0.05M pH = 4.5.

La Streptozotocine

La streptozotocine (STZ) est un antibiotique possédant une activité diabétogène dérivant d'un sucre aminé : la D-glucosamine. La STZ est l'un des agents toxiques, isolée à partir d'une culture de streptomyces achromogènes ([Herr et al., 1960](#)). Elle induit un diabète expérimental de type 1 chez les animaux de laboratoires en agissant sur les cellules β du pancréas, transportée par les mêmes transporteurs du glucose (GLUT2) ([Schneidl et al., 1994](#)). Elle provoque une fragmentation de l'ADN des cellules β pancréatiques par la formation des radicaux libres menant à une réduction des niveaux des nucléotides et de NAD cellulaires, ceci aboutit à une nécrose rapide des cellules β du pancréas ([Okamoto, 1981 ; Yamamoto et al., 1981](#)).

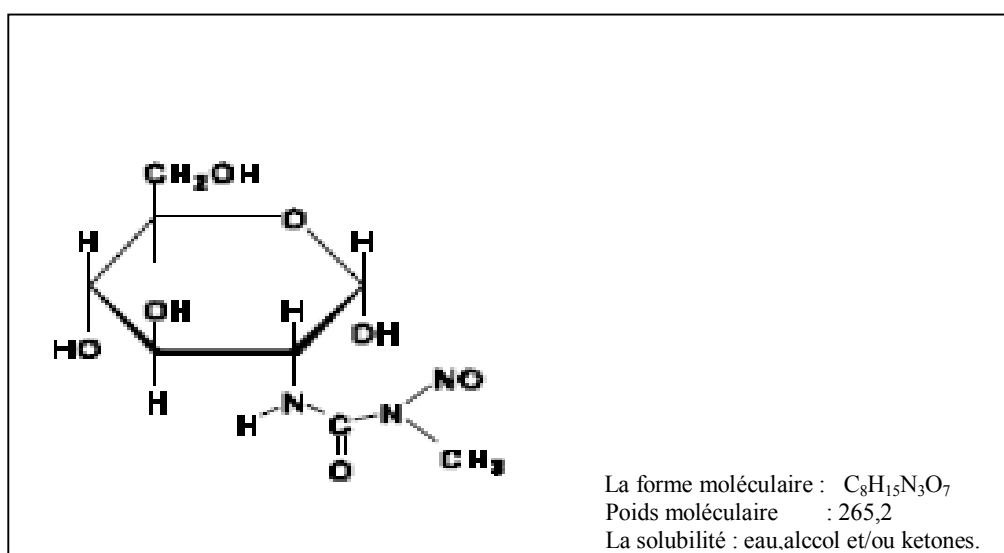


Figure4 : la structure chimique de la Streptozotocine

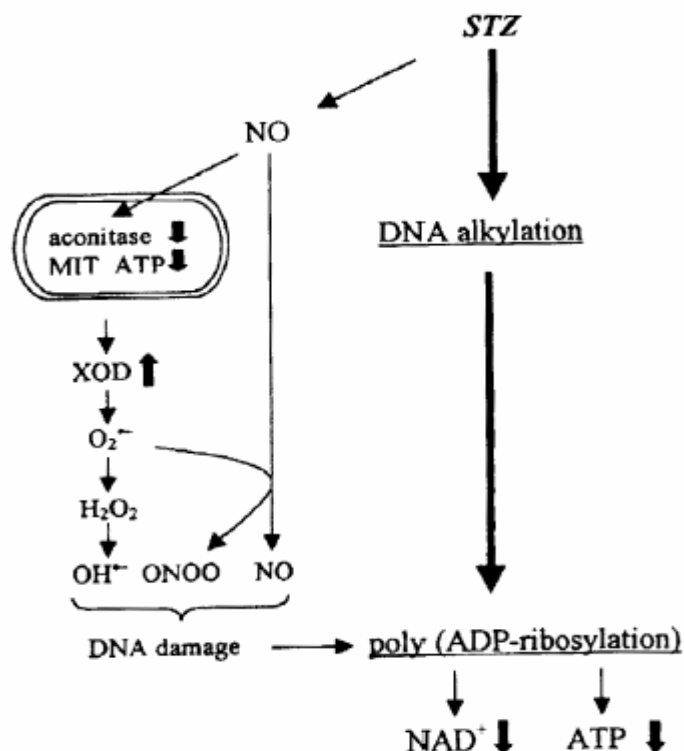


Figure 5. Mécanisme d'induction du diabète expérimental par la STZ chez le rat. MIT: mitochondrie, XOD: xanthine oxydase. (Szkudelski, 2001).

2.2.1.2. Traitement antioxydant par le tempol

Le Tempol (4-Hydroxy-TEMPO ; 4 hydroxy-2,2 ,6 tetramethylpiperidine-1-oxyl) est un radical libre de nitroxy ou nitroxyde (figure 4), stable, soluble dans l'eau ou éthanol, perméable aux membranes, de faible toxicité, lipophile et considéré comme étant non-immunologique (Zollner *et al.*,1997). Il est du type SOD mimétique (Mitchell *et al.*,1990) et contrairement aux SOD endogènes, le tempol ne requière pas la présence d'ions métalliques pour agir. Ces effets bénéfiques ont été observés dans des modèles animaux d'inflammation, d'hypertension, de diabète et de dysfonction de la cellule endothéliale (Cuzzocrea *et al.*,2001., Schnackenberg *et al.*,2001). Le Tempol atténue les effets de l'O₂⁻ in vitro, réduit la formation du HO[•], atténue les effets cytotoxiques du H₂O₂ et du ONOO⁻ (Cuzzocrea *et al.*,2000).

De plus, le tempol a l'avantage d'être de petite taille (poids moléculaire de 172,25 g*mol/l).Il réagit très rapidement avec l'anion O₂⁻ pour le neutraliser (vitesse de réaction du tempol avec l'O₂⁻ à pH =7 varie entre 1,1 x 10³ à 1,3 x 10⁶ M⁻¹ s⁻¹) (Onuma *et al.*,2004).

À ce jour, il n'y a pas d'étude concernant la toxicité du tempol chez l'humain. Par contre, quelques études utilisant des préparations de cellules isolées, et une étude où une solution de tempol (70mg/ml d'une solution d'éthanol à 70%) a été appliquée sur la peau ont été publiées.

Nous avons administré le tempol par voie intra péritoneale à raison de 10 mg/kg/j après quatre semaines de l'induction du diabète et pendant 30 jours.

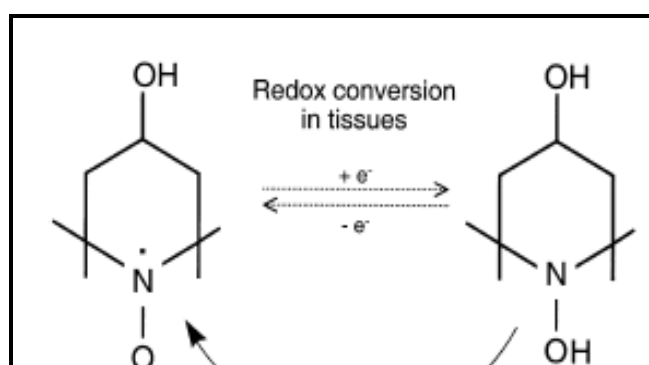


Figure6: la structure chimique du tempol et sa réduction au niveau tissulaire.

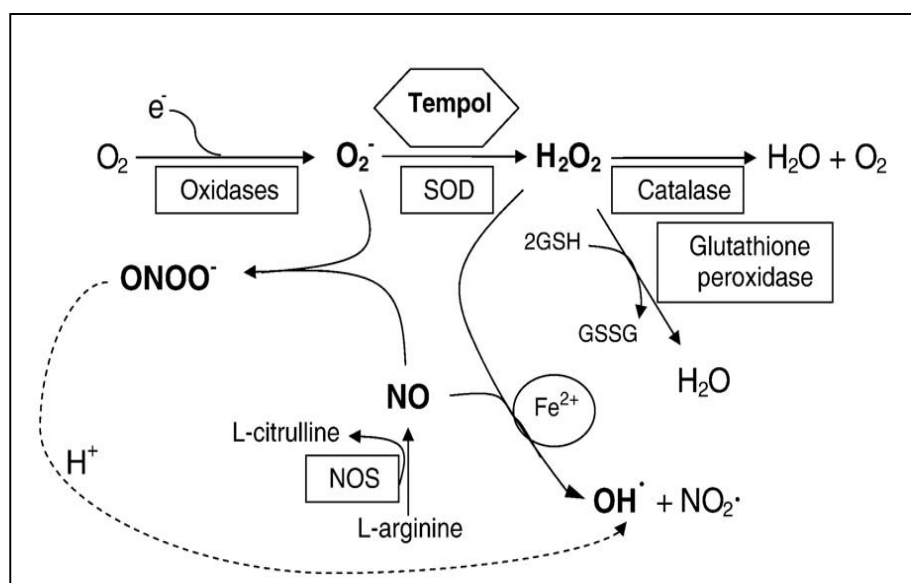


Figure 7 : l'activité antioxydante du tempol de type SOD mimétique contre les espèces radicalaires au niveau vasculaire.

Les Oxydases, comme NADPH oxydase ou la xanthine oxydase, transfèrent un électron à l'oxygène, ce qui le converti en superoxide (O_2^-). La Superoxide dismutase (SOD) convertit l'anion superoxide en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui peut être converti en H_2O par la catalase ou la glutathion peroxydase. Le H_2O_2 pourrait se convertir en radical hydroxyle ($OH^\cdot$) en présence du fer réduit (Fe^{2+}). Le superoxide peut réagir avec de l'oxyde nitrique (NO) pour former le peroxynitrite ($ONOO^-$), un radical instable qui se décompose rapidement en $OH^\cdot$.

2.2.1.3. Traitement antioxydant par la SOD végétale (la Glisodine ®)

Puissante enzyme antioxydante naturelle, la SOD agit à la source même de la réaction en chaîne induite par les espèces réactives de l'oxygène et constitue donc le premier et l'un des principaux maillons du processus de défense contre les radicaux libres. Malheureusement, en raison de la fragilité de sa structure moléculaire, la SOD non protégée est inactivée dans le tube digestif. Grâce à un procédé de couplage à la gliadine, protéine extraite du blé, on dispose désormais d'une SOD d'origine végétale (extrait de melon riche en SOD) bioactive par voie orale. Plusieurs études in vivo chez l'animal ainsi qu'une étude clinique chez des volontaires sains ont effectivement confirmé le maintien de l'activité antioxydante de l'enzyme SOD après absorption par voie orale, action par ailleurs combinée à des propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices. (Dugas, 2002 ; Ouldoukis *et al.*, 2004)

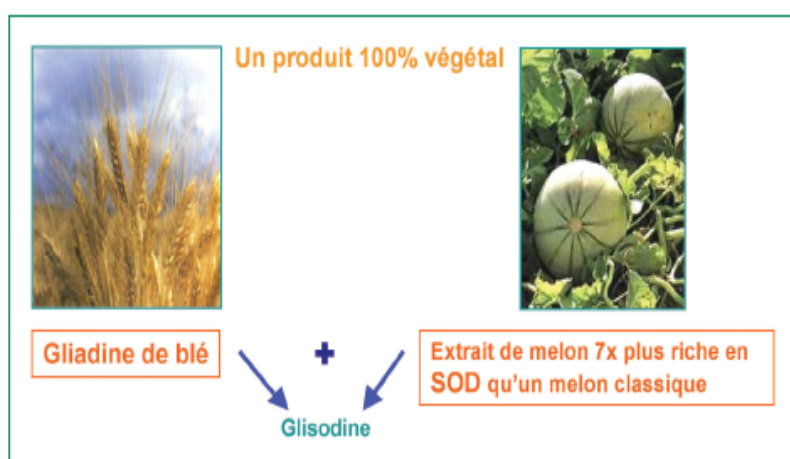


Figure 8: La Glisodine (la SOD + Gliadine), une formule végétale originale.

Nous avons utilisés la Glisodine, une formule végétale, constituée d'un extrait de melon (*Cucumis melo* LC) riche en SOD, couplé à une molécule de gliadine, protéine extraite du blé. La gliadine est une prolamine végétale (biopolymère) qui empêche non seulement la digestion de la SOD dans l'estomac mais favorisent également la livraison de la molécule bio active dans la muqueuse intestinal.

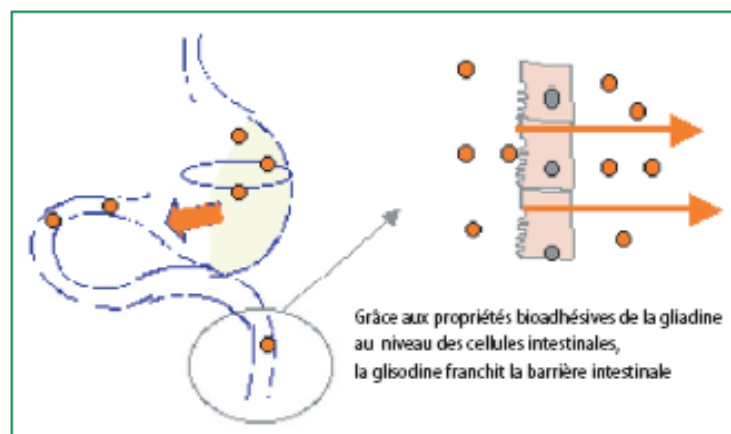


Figure 9: Représentation schématique du transit et de l'absorption intestinale de la SOD couplée à la gliadine.

La Glisodine est administré *per os* à raison de 300 mg/Kg/j pendant 4 semaines toute la période. La solution mère étant préparée extemporanément dans du NaCl 9%.

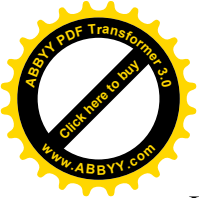
2.2.3. Préparation des prélèvements

2.2.3.1. Décapitation et prélèvement sanguin

Les prélèvements sanguins sont effectués par décapitation après 8 semaines de l'induction du diabète expérimentale. Ils doivent s'effectuer rapidement et proprement, car divers facteurs sont susceptibles d'altérer ou de modifier la qualité du plasma. Pour chaque lot décapité, Le sang est recueilli dans des tubes contenant de l'EDTA, puis centrifugé à 5000tr/min pendant 15 minutes; le plasma obtenu est aliquoté en plusieurs fractions dans des tubes Eppendorf et conservé a une température de -20° C pour les dosages biochimiques (glucose, cholestérol triglycérides) et les dosages enzymatiques (LDH, CPK et LPO).

2.2.3.1. Dissection et prélèvement des organes

Après sacrifice, l'animal est fixé en décubitus dorsal sur une plaque en liège ; une incision est pratiquée de l'orifice uro-génital jusqu'au cou, le foie et le cœur sont prélevés à l'aide d'une pince fine sous glace et pesés à l'aide d'une balance de précision.



Le cœur est broyé dans du tampon phosphate saccharosé (pH =7.5) puis conservé à -20° C pour le dosage du glutathion réduit (GSH), de la glutathion-S-transférase (GST), de la catalase (CAT), de la glutathion et de la super oxyde dismutase (SOD).

2.2.4. Dosages enzymo-colorimétriques

2.2.4.1. Dosage du glucose plasmatique

A/Principe

Le dosage du glucose plasmatique a été effectué par la méthode de glucose oxydase selon **Trinder (1969)**. Le glucose est oxydé en acide gluconique et l'eau oxygénée libérée, réagit sous l'action d'une peroxydase avec le phénol et l'4-amino-2-phénasone, pour former le quinonéimine qui est un complexe coloré en rosé, l'intensité de la coloration étant proportionnelle à la concentration du glucose dans l'échantillon.

B/Mode opératoire

Dans des tubes à essai ; pipeter :

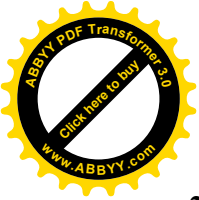
	Blanc	Etalon	Echantillon
Etalon	-	10µl	-
Echantillon	-	-	10 µl
Réactif	1.0ml	1.0ml	1.0ml

On mélange à l'aide d'un agitateur et on laisse incuber pendant 10 minutes à 37°. La lecture de la densité optique (DO) se fait à 505 nm contre le blanc réactif. La coloration est stable pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.

C/ Calcul de la concentration

La concentration du glucose plasmatique est calculée par la formule suivante :

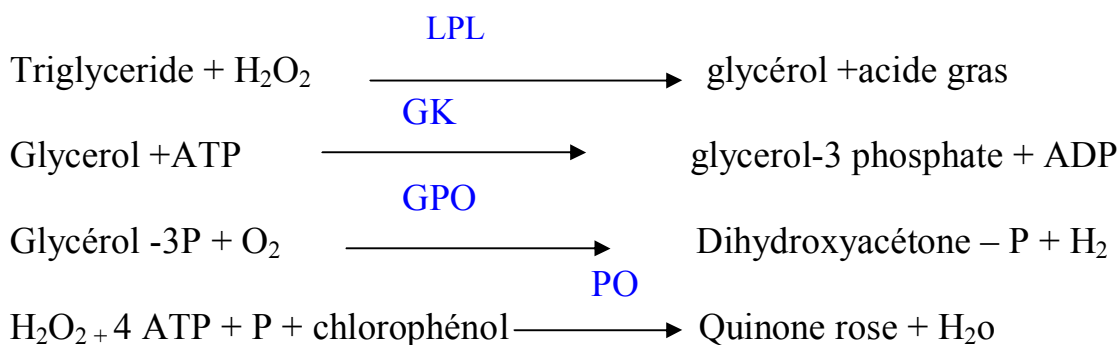
$$[\text{Glucose}] \text{ g/l} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times n \quad (n: \text{valeur de l'étalon} = 1 \text{ g /l})$$



2.2.2.4.2. Dosage des triglycérides plasmatiques

A/Principe

Les triglycérides sont enzymatiquement hydrolysés en glycérol et en acides gras libres par la lipoprotéine-lipase. Le glycérol sous l'effet de la glycérol kinase forme le glycérol - 3-phosphate qui est oxydé en H_2O_2 selon les quatre réactions suivantes selon **Young et Pestaner, 1975**:



B/Mode opératoire

Dans des tubes à essai ; pipeter :

	Blanc	Etalon	Echantillon Etalon
Etalon	-	10µl	-
Echantillon	-	-	10 µl
Réactif	1.0ml	1.0ml	1.0ml

On mélange à l'aide d'un agitateur et on laisse incuber 10 minutes à 37°. La lecture de la densité optique « DO » est effectuée à 546 nm contre le blanc réactif. La coloration est stable pendant 60 minutes à l'abri de la lumière.

C /Calcul de la concentration

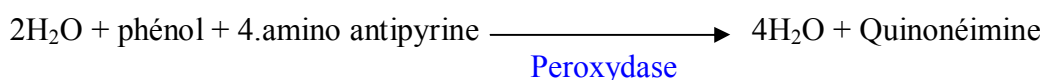
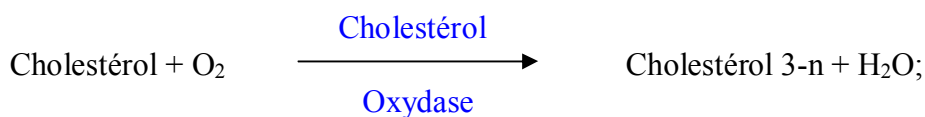
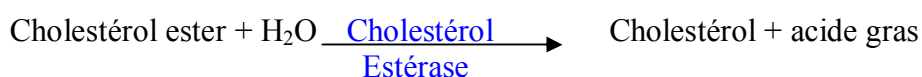
La concentration des triglycérides plasmatiques est calculée de la manière suivante

$$\text{TG mg / dl} = \frac{\text{DO dosage}}{\text{DO étalon}} \times n \quad (n = \text{valeur de l'étalon } 200 \text{ mg / dl}).$$

2.2.4.3. Dosage de cholestérol plasmatique

A/Principe

Le cholestérol et ses esters sont libérés à partir des lipoprotéines par les détergents. La cholestérol estérase hydrolyse les esters et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est formé dans la réaction d'oxydation enzymatique du cholestérol sous l'action de la cholestérol oxydase, ce dernier réagit avec le phénol pour produire le quinonéimine selon les réactions ci-dessous (Thomas et Labor, 1992).



B /Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Etalon
Etalon	-	10 µl	-
Echantillon	-	-	10 µl
Réactif	1ml	1ml	1ml

On mélange à l'aide d'un vortex et on laisse incubé pendant dix minutes à 37°. On lit la densité optique DO à 546 nm contre le blanc réactif. La coloration est stable pendant trente minutes à l'abri de la lumière.

C/Calcul de la concentration

La concentration du cholestérol plasmatique est obtenue par la formule suivante :

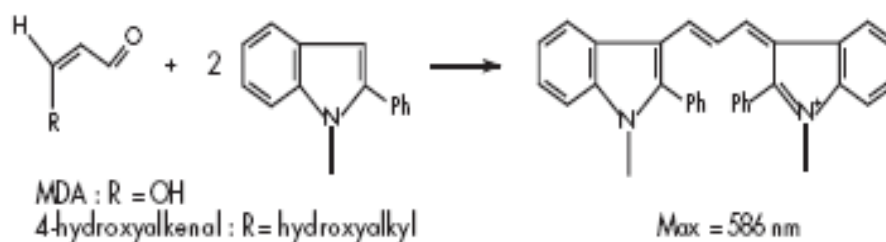
$$[\text{Cholestérol}] \text{ mg/dl} = \frac{\text{DO dosage}}{\text{DO étalon}} \times n \quad (n : \text{valeur de l'étalon} = 200 \text{ mg/dl}).$$

2.2.4.4. Dosage des lipoperoxides LPO

La peroxydation de lipide est un mécanisme bien établi des dommages cellulaires chez les deux plantes et animaux et est employée comme indicateur de l'effort oxydant dans les cellules et les tissus. Les peroxydes de lipide sont instables et se décomposent pour former une série complexe de composés y compris les composés carbonyles réactifs. Les peroxydes polyinsaturés d'acide gras produisent du malondialdéhyde (MDA) et de 4 hydroxyalkenals (HAE) sur la décomposition. Ces substances l'en tandem fournissent un biomarker simple pour la mesure de peroxydation générale de lipide. La méthode LPO-586 est plus adaptée pour mesurer MDA en combinaison avec 4 hydroxyalkenals.

A. Principe

L'analyse LPO-586 est basée sur la réaction d'un réactif chromogène, N-méthyl-2-phenylindole (R1), avec MDA et 4 hydroxyalkenals à 45°C. Une molécule le hydroxyalkenal de MDA ou de 4 réagit avec 2 molécules de réactif R1 pour rapporter a chromophore stable avec l'absorbance maximale à 586 nanomètre.



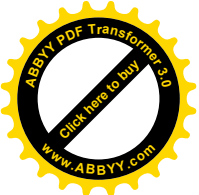
Réactifs

- Réactif R1 N-méthyl-2-phenylindole in acetonitrile, 3 × 18 mL
- Réactif R2 Methanesulfonic (MSA), 1 × 16.5 mL
- MDA standard 1,1,3,3- Tetramethoxypropane (TMOP) in Tris- HCL, 1×1 mL
- Diluant Fer ferrique en méthanol, 1 × 30 mL.

B. Mode opératoire

La procédure expérimentale du dosage du MDA est le suivante:

- Préparer les standards selon le tableau 06 dans les tubes à essai de verre clairs ou des tubes de microcentrifuge de polypropylène.
- Ajouter 200 µl de l'échantillon à un tube à essai de verre.
- Ajouter 650 µl du réactif R1 dilué.



- Mixer le mélange doucement par le vortex.
- Ajouter 150 µl du HCl concentré (12 N).
- Mixer bien le mélange.
- Incuber à 45°C pour 60 minutes.
- Centrifuger les échantillons troubles à 1500 tr/min pendant 10 minutes pour obtenu d'un surnageant claire. Le surnageant clair est transféré dans une cuvette pour la mesurer de l'absorbance à 586 nm.

C. Calcule de la concentration

On utilise les données standard, calculent le A_{586} nette pour chacun standard en soustrayant (A_0) la valeur blanche de chacune des valeurs de A_{586} standard. Tracer le A_{586} nette contre [MDA], et exécuter une analyse de régression linéaire de A_{586} sur [MDA] :

$$[A_{586}] = a [MDA] + b$$

$$[MDA] = \frac{A_{586} - b}{a} \cdot df$$

[MDA] : Concentration en µM de MDA dans l'échantillon, A_{586} : Absorbance net à 586 nm de l'échantillon, df : Facteur de dilution, a : Coefficient de régression (pente) et b : Interception.

Tableau 2: Courbe de volumes standard de dilution

Target concentration of standard in reaction mixture, µM	0	0.50	1.00	2.00	3.00	4.00
Volume of 20 µM standard to add (mL)	0	25	50	100	150	200
Volume of diH₂O or buffer used for diluting or mixing sample to add (mL)	200	175	150	100	50	0

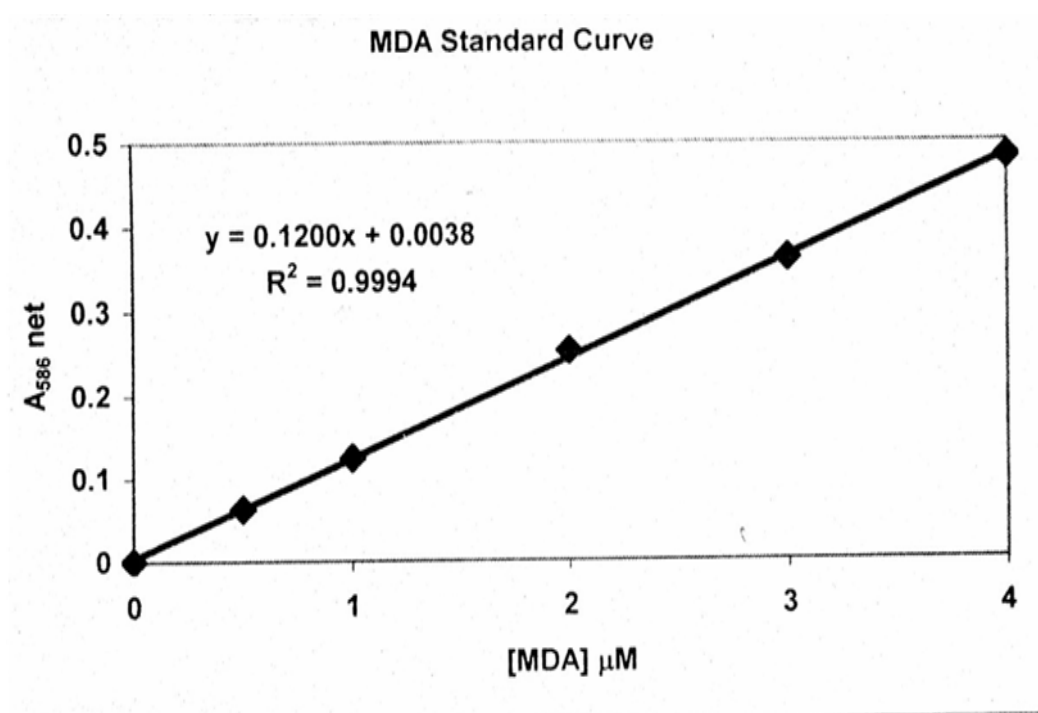


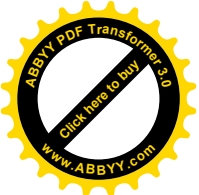
Figure 10: *Courbe des standards MDA*

2.2.4.4. Dosage de la lactate déshydrogénase (LDH)

La lactate déshydrogénase est une enzyme très répandue dans les tissus, en particulier dans le myocarde, le foie, les muscles et les reins.

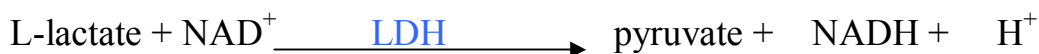
La (LDH) se trouve dans le sérum sous formes de cinq isoenzymes qui peuvent être séparés par électrophorèse, chaque isoenzyme est un tétramère composé de deux sous unités différentes qui ont été dénommées cœur et muscle, selon leur chaîne polypeptidique. On compte deux homotétramères, la LDH-1 (cœur) et la LDH-5 (muscle), et trois isoenzymes hybride.

Des taux élevés de LDH sont observés en état de choc ainsi que dans différentes maladies telles que l'anémie mégaloblastique, le cancer, les affections pulmonaires, et en cas d'infarctus du myocarde ([Zimmerman et Henry, 1984](#) ; [Schumann et al., 2002](#)).



A/ Principe

La LDH catalyse la transformation du L-lactate en pyruvate et réduit le NAD en NADH ; la vitesse d'augmentation du NADH est proportionnelle à l'activité catalytique de la LDH qui sera mesurée par photométrie.



B/ Mode opératoire

La solution de travail est obtenue par mélange d'une tablette de RI avec R2

Réactif	quantité
RI	Imidazo 65 mmol/l l 6 mmol/l Pyruvate
R2	NADH 0.18 mmol/l

Tubes	25 à 30° C
Solution de travail (mL)	3.0ml
Echantillon {(il)	100 µl

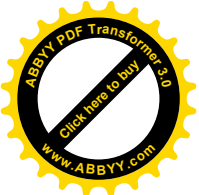
A l'aide d'un agitateur , on mélange et on laisse incuber pendant 1 minute. La lecture de l'absorbance (A) de l'échantillon à 340 nm pendant 3 min à intervalle d'une minute .

C/Calcul de l'activité enzymatique

L'activité de la LDH est calculée par la formule suivante :

$$\Delta A/\text{min} \times 4925 = \text{UI/L LDH}$$

25 à 30° C



2.2.4.5. Dosage de la Créatine-kinase (CPK)

La Créatinine-Kinase (CK) est une enzyme dimère qui se présente sous quatre formes différentes : une isoenzyme mitochondriale et trois isoenzymes cytosoliques , la CK-MN (présente dans le muscle strié), la CK-BB (présente dans le cerveau) et la CK-MB (présente dans le myocarde) .Les déterminations d'activités de la CK et des isoenzymes de la CK sont utilisées pour le diagnostic et le suivi de l'infarctus du myocarde et d'affections musculaires comme la paralysie pseudo hypertrophique de type Duchenne.

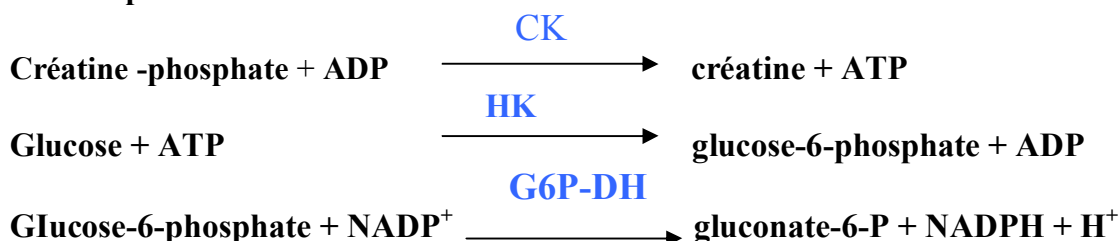
En cas de lésions de cellules du myocarde comme dans l'infarctus aigu du myocarde ,la CK est libérée des cellules lésées du myocarde ; une augmentation du taux de CK dans le sang peut,dans certains cas ,déjà être observée 4 heures après un infarctus. Le taux de CK atteint un maximum après 12 à 24 heures et retombe à nouveau dans le domaine de la normale après 3à4 jours.

La méthode de détermination de l'activité de la CK à l'aide de Créatine-phosphate et d'ADP a d'abord été décrite par **Oliver**, modifiée par **Rosalki**, puis optimisée par **Szasz**.

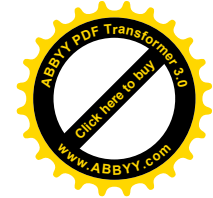
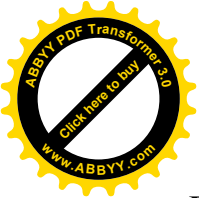
La CK est rapidement inactivée par oxydation des groupes SH du site actif. Après addition de N-acétylcystéine (NAC) l'enzyme peut être réactivée. La présence de diadénosine-pentaphosphate **et** d'AMP élimine l'interférence de l'adénylate-kinase

Des méthodes standardisées de détermination de l'activité de la CK avec réversibilité de l'oxydation de la CK et activation de cette dernière par la N-acétylcystéine ont été recommandées en 1977 par la société allemande de chimie clinique (**DGKC**) et en 1990 par la fédération internationale de chimie clinique (IFCC). La IFCC a confirmé cette recommandation en 2002 et étendu la méthode pour la détermination à 37° C. La présente méthode est dérivée de la formulation recommandée par l' IFCC.

A/Principe



La quantité de NADPH formée est proportionnelle à l'activité de la CPK. et mesurée par photométrie .



B/Mode opératoire

Les réactifs utilisés pour obtenir la solution de travail il faut mélangé le contenu de R2 avec 15ml de RI

RI	Imidazol pH 7.0	100 mmol/l
	Glucose	20 mmol/l
	Magnésium acétate EDTA	10 mmol/l 2 mmol/l
R2	ADP	2 mmol/l
	NADP	2 mmol/l
	Hexokinase HK	2500 UI/l
	G6PD	1500 UI/l
	N-ACétyl cystéine	20 mmol /l
	CPK	30 mmol/l

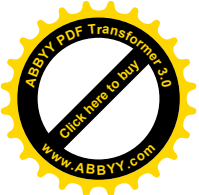
Tubes	25 à 30° C
Solution de travail (ml)	1.0ml
Echantillon (ul)	40 ul

A l'aide d'un agitateur, on mélange et on laisse incuber pendant 2 minutes. La lecture de l'absorbance (A) de l'échantillon à 340 nm pendant 3 min à intervalle d'une minute.

C/Calcul de l'activité enzymatique

L'activité de la CPK est calculée par la formule suivante :

$$AA/min \times 4127 = UI/L \text{ CPK} \quad 25 \text{ à } 30^\circ \text{ C}$$



2.3. Exploration du statut antioxydant

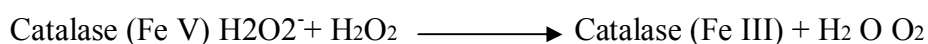
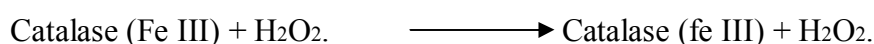
2.3.1. Dosage de l'activité de la catalase (CAT)

- **Préparation de l'homogénat**

- Mettre 500 mg du coeur en présence de 4 ml d'une solution de Tampon Phosphate à 0.1 M. On effectue un broyage du mélange aux ultrasons pendant 35 secondes à une température de 4°C et on centrifuger à 500 tours/ min pendant 15 minutes.

A. Principe

Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tétramétriques, chaque unité porte 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 oxygénées, en accélérant la réaction spontanée de dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) toxique pour la cellule, en eau et en oxygène (Regoli et Principato, 1995).



B. Mode opératoire:

L'activité catalase (CAT) est mesurée selon Luck (1963) et Aebi (1983) à l'aide d'un spectrophotomètre par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en faisant réagir dans 100 mM de tampon phosphate

pendant 1 mn à pH 7.5, 100 µl de H₂O₂ 5500 mM sur 20 µl du sang hémolysé, à une température d'incubation de 25°C. Les réactifs ont pour origine Sigma Aldrich. Les résultats ont été exprimés en µmole d'H₂O₂ par minute et par mg protéine.

Tableau 3: Protocole utilisé pour le dosage de l'activité CAT.

Réactifs	ESSAI	BLANC μ l
T. phosphate 100 Mm; pH= 7.5	780	800
H₂O₂ 500 mM	200	200
Homogénat	20	0

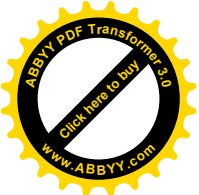
On note que la quantité d'homogénat doit être déterminée en fonction de la quantité des protéines qui est comprise entre 8 et 12 g/dl soit une quantité de 10 à 20 μ l d'homogénat. L'activité décroissant rapidement, il est important de mettre toujours le même temps entre le pipetage et le moment où l'on place la cuve dans le durant 60 secondes de mesure; le coefficient d'extinction étant de 0.040Mm.cm, l'activité CAT peut être calculée selon l'équation suivante:

$$\text{CAT } (\mu\text{mol}/\text{mn}/\text{mg Hb}) = \frac{(\Delta \text{DO} \times 10)}{\epsilon \times L \times X}$$

ϵ : coefficient d'extinction , $L = 1$, X : protéine en mg

2.3.2. Dosage de l'activité du glutathion (GSH)

Le glutathion (8-glutamyl-cystéinyl-glycine) est un tripeptide constitué d'acide glutamique, cystéine et de glucine. Le GSH est requis pour l'activité de plusieurs enzymes, dont il participe avec la glutathion réductase à l'établissement de ponts disulfures dans de nombreuses protéines et dans des hormones polypeptidiques et prend part au métabolisme des xénobiotiques. Présent dans la majorité des tissus, le glutathion joue un rôle principal dans la réduction de tout peroxyde organique et non organique, en présence de la glutathion peroxydase (GPx). ainsi, il intervient dans les réactions de neutralisation des maladies intermédiaires toxiques produits par la méthylation de quelques médicaments, hormones, électrolytes et des matières étrangères du corps en présence de la glutathion S-transférase (GST), et par conséquent dans l'élimination de leur toxicité.



A. Principe

Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro 5-mercapturique, ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5.5-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (Réactif d'Ellman) par les groupement (-SH) du glutathion. Le glutathion hépatique est dosé selon la méthode de **Weckbecker et Cory**, (1988) en utilisant le spectrophotomètre.

B. Mode opératoire

- Prélever 0.8 ml de l'homogénat.
- Ajouter 0.2 ml d'une solution d'acide sulfosalysitique (SSA) 0.25%.
- Agiter et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 minutes.
- Prélever 0.5 ml du surnageant.
- Ajouter 1 ml du tampon Tris-EDTA, contenant 0.02 M d'EDTA; pH = 9.6.
- Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque à 0.01 M (dissous dans le méthanol absolu 99%).
- Laisser pendant 5 minutes dans la température ambiante pour la stabilisation de la couleur. La réaction colorimétrique se développe instantanément.
- Mesurer l'absorbance optique à 412 nm.

La concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante:

$$[\text{GSH}] \text{ nmol GSH/mg de protéines} = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1.525}{13100 \times 0.8 \times 0.5 \times [\text{protéines}]}$$

DO : densité optique.

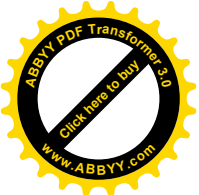
1 : le volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8 ml homogénat + 0.2 ml SSA).

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

13100 : coefficient d'absorbance (concernant le groupement -SH à 412nm).

0.8 : le volume de l'homogénat trouvé dans 1 ml.

0.5 : le volume du surnageant trouvé dans 1.525 ml.



2.3.3. Dosage de l'activité des GSTs

Les glutathion-S-transférases représentent une famille d'enzymes multifonctionnelles essentiellement cytosoliques, impliquées dans diverses opérations de transports de biosynthèses intracellulaires (Poonkuzhali *et al.*, 2001). Les GSTs représentent une importante famille enzymatiques dont la fonction est de conjuguer le glutathion réduit (GSH) à des composés électrophiles par formation d'un pont thioéther. Les produits sont ensuite métabolisés en acides mercapturiques puis excrétés dans les déchets liquides (bile, urine). La fonction des GSTs, la plus étudiée en ce qui concerne la prévention de la pollution dans l'environnement, demeure leur propriété de catalyser des réactions de conjugaison entre un peptide, le glutathion, et des macromolécules comme les acides nucléiques (ARN, ADN). De ce fait, la conjugaison du glutathion avec certains substrats représente une étape dans la formation de composés moins toxiques et plus hydrosolubles que les molécules de départ (Chatterjee *et al.*, 1984).

A. Principe

La mesure de l'activité des GSTs consiste à fournir à l'enzyme un substrat en général du chlorodinitrobenzène (CDNB), qui réagit facilement avec de nombreuses formes de GST et du glutathion. La réaction de conjugaison de ces deux produits entraîne la formation d'une molécule nouvelle qui absorbe la lumière à 340 nm de longueur d'onde.

Il est possible de quantifier cette absorption au moyen d'un spectrophotomètre et la valeur de la densité optique mesurée à 340 nm est directement proportionnelle à la quantité de conjugué formée, elle-même liée à l'intensité de l'activité GST (Habig *et al.*, 1984). Les mesures de l'activité GST globale ont été réalisées en utilisant le CDNB (1-Chloro, 2,4-Dinitro Benzène) qui est un substrat des différentes iso-enzymes de la GST, ce qui permet la mesure globale des activités GSTs (Stein *et al.*, 1998).

B. Mode opératoire

La méthode utilisée dans cette étude pour doser les GSTs est de Habig *et al.* (1984); celle-ci consiste à faire agir les GSTs contenues dans le cytosol sur un mélange GSH + CDNB à 37°C et à pH = 6.5. La variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée pendant 1 min à 340 nm.

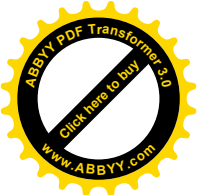


Tableau 4: Protocole utilisé pour le dosage de l'activité GST.

Réactifs	Blanc (μL)	Essai (μL)
Tampon phosphate pH=6.5	850	830
CDNB (20mM)	50	50
GSH (100mM)	100	100
Homogénat	—	20

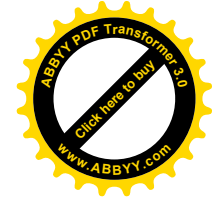
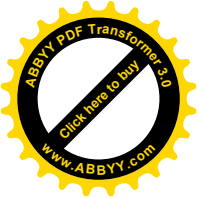
Le protocole du dosage se réalise dans des cuves en quartz. Ces cuves ont été incubées à 37°C durant la manipulation. La valeur de la densité optique correspondant au blanc (conjugaison spontanée du substrat) a été ensuite retranchée à la valeur de chaque essai afin de mesurer la variation due uniquement à l'activité de l'enzyme. Sachant que le coefficient d'extinction du GSH-CDNB, est de 9.6 Mm⁻¹. L'activité de la GSH a été mesurée par la formule suivante:

$$\text{Activité GST (}\mu\text{mol/min/mg de protéines)} = \frac{\Delta\text{DO essai} - \Delta\text{DO blanc}}{9.6 \times [\text{protéines}]}$$

2.3.4. Dosage de l'activité de super oxyde dismutase

L'activité de la super oxyde dismutase (SOD) est mesurée par la méthode de **Deschamps** et **Fridovich** (1971) modifiée par **Oberley** et **Spitz** (1985) utilisant comme substrat la xanthine sigma 18 mM et la xanthine oxydase diluée à 0.25U/ml dans du nitrobleu de tétrazolium, la réaction commence après avoir rajouté 10 μl de l'échantillon.

L'absorbance due à la conversion de la xanthine par la xanthine oxydase en acide urique et anion super oxyde est lue sur un spectrophotomètre à 525 nm pendant 6 min. L'activité de la SOD est exprimée en Unité de xanthine oxydée par min/mg protéine.



$$(\text{xantine oxydée } 50\% \text{ U / min / mg prot.}) = \frac{\text{DO/min} \times 3 \times 60}{-6.22 \times 0.2 \times \text{mg prot}}$$

Tableau 5 : Protocole utilisé pour le dosage du SOD.

Réactifs	Blanc (μL)	Essai (μL)
Tampon phosphate INT pH=6.5	850	840
Xanthine	100	100
Xanthine oxydase	50	50
Homogénat	0	10
NTB	1ml	1ml

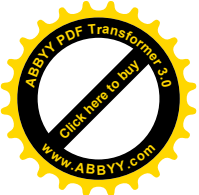
2.3.5. Dosage des protéines tissulaires

A. Principe

Les ions cuivriques dans un milieu alcalin interagissent avec les ions peptidiques des protéines formant un complexe coloré (Weichselbaum, 1946 ; Gornall *et al.*, 1949).

B. Mode opératoire

La quantification des protéines a été déterminée selon la méthode de Bradford (1976), nous avons utilisé 100 μl du surnageant de chaque organe homogénéiser avec 4 ml de bleu brillant de comassie (BBC) (G250), (Merck) comme réactif.

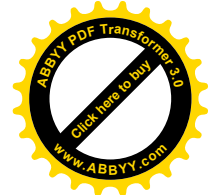
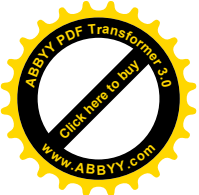


Le mélange est agiter et laisser à T° ambiante pendant 5 mn pour la stabilisation de la couleur (pour le blanc à la place du surnageant on met l'eau distillée). La lecture s'effectue à une longueur d'onde de 595 nm.

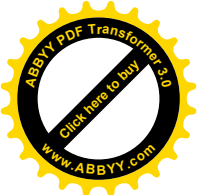
Pour la gamme d'étalonnage nous avons utilisé le sérum albumine de bœuf (Sigma, France) comme standard selon les indications ci dessous :

Tableau 6 : Réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution d'Albumine (BSA µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4



RESULTATS



3. Analyse statistique des résultats

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyennes et écart-type. Nous avons utilisés le test d'analyse de la variance à deux critères de classification ANOVA et le test de Tukay pour comparer les moyennes entre elles d'une part et entre celles des témoins d'autre part.

3.1. Etude pondérale

3.1.1 Effet de la glisodine et du tempol sur la variation du poids corporel, du foie et de cœur chez les rats témoins et diabétiques.

Les variations pondérales exprimées en gramme des rats chez les lots témoin (T), diabétique (D), diabétique traité par la glisodine (DS) et diabétique traité par le tempol (DT) sont rassemblées dans le tableau 7 et fig 9.

❖ *Evaluation du poids corporel*

Nos résultats montrent une diminution très significative du poids corporel chez les rats diabétiques par rapport aux rats du lot T (D: 209 ± 8.05 , DS: 240.8 ± 15.1 et DT : 243.1 ± 8.66 vs T: 291 ± 14.76 , $P < 0.05$ et $P < 0.01$). En revanche, le traitement des rats diabétiques par la glisodine ou le tempol a atténué significativement cette variation (DS : $240.8 \pm 15.1^*$ et DT : $243.1 \pm 8.66^*$).

❖ *variation du poids absolu et relatif du foie et de cœur*

Concernant le poids du foie absolu et relatif, nos résultats révèlent une augmentation significative chez les rats des lots D et DS par rapport au lot T (D : $8.58 \pm 0.51^*$, DS : $8.64 \pm 1.23^*$ et DT : 7.91 ± 0.97^{ns}), cependant le traitement par le tempol a atténué remarquablement le poids hépatique absolu et relatif ou les valeurs rejoignent celles du lot témoin (tableau 7, fig 10).

Les résultats biométriques suggèrent un effet plus marquant du tempol par rapport à la glisodine.

Tableau 7 : poids corporel, du foie et de cœur en gramme chez les rats témoins, diabétiques et traités.

Lots	Poids corporel	Poids absolu du foie	Poids relatif du foie	Poids absolu du cœur	Poids relatif du cœur
Témoin	291 ± 14,76	7,68 ± 1,20	2,6 ± 0,32	1,13 ± 0,09	0,401 ± 0,02
D	209 ± 8,05**	8,58 ± 0,51*	4,23 ± 0,43*	0,81 ± 0,07*	0,375 ± 0,007*
DS	240,8 ± 15,1*	8,64 ± 1,23*	3,58 ± 0,29*	0,91 ± 0,15*	0,387 ± 0,009*
DT	243,1 ± 8,66*	7,91 ± 0,97 ^{ns}	3,25 ± 0,24 ^{ns}	0,95 ± 0,12 ^{ns}	0,391 ± 0,01

Valeurs exprimées en $m \pm \sigma$ (n= 6) et analysées par ANOVA one-way suivi du test de Tukey's pour la comparaison multiple entre les différents groupes.

- ** p< 0.01 vs T, * p < 0.05 vs T,
- NS non significatif.

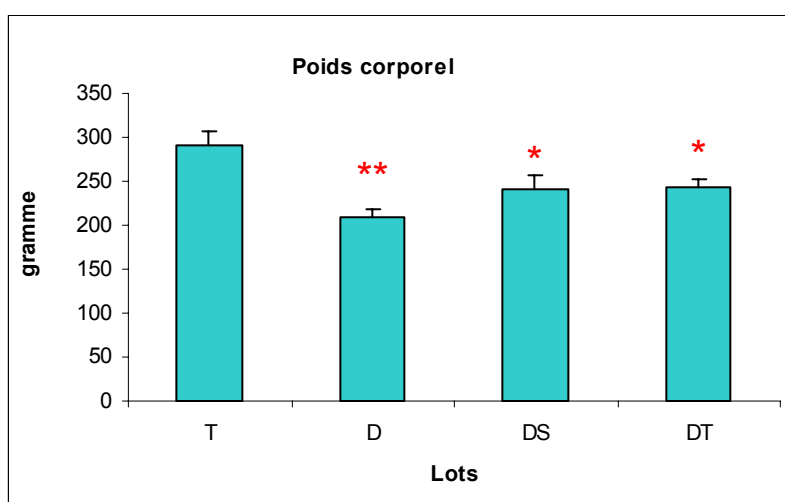


Figure 11 : Variation du poids corporel en gramme chez les rats Témoins, diabétiques et traités.

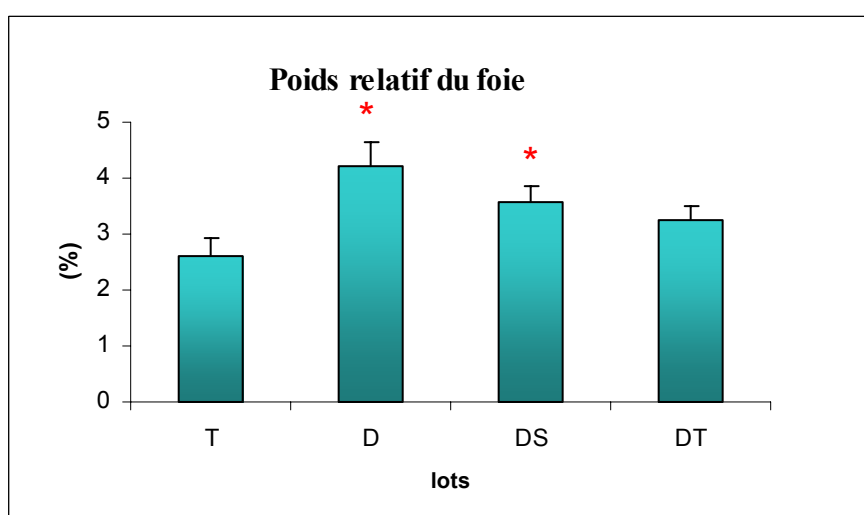
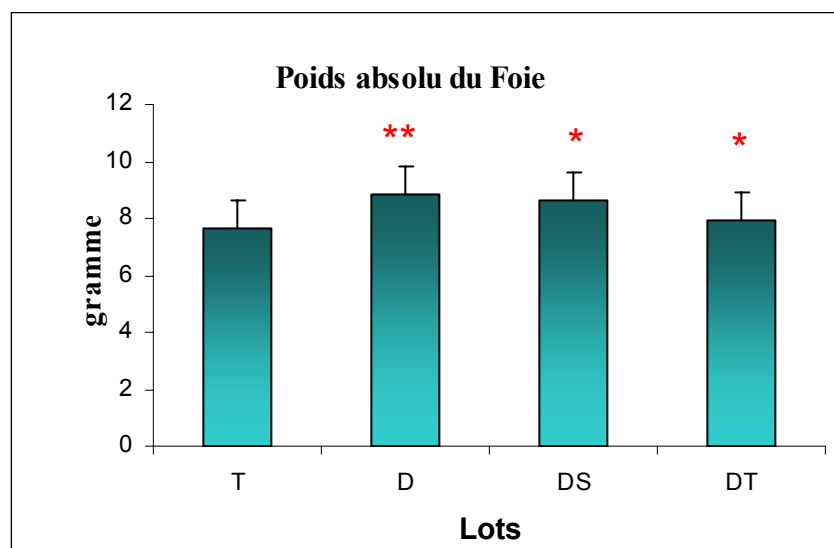


Figure12 : poids absolu et relatif du foie chez le lot temoin ,diabetique et les lots traités par le tempol et la glisodine.

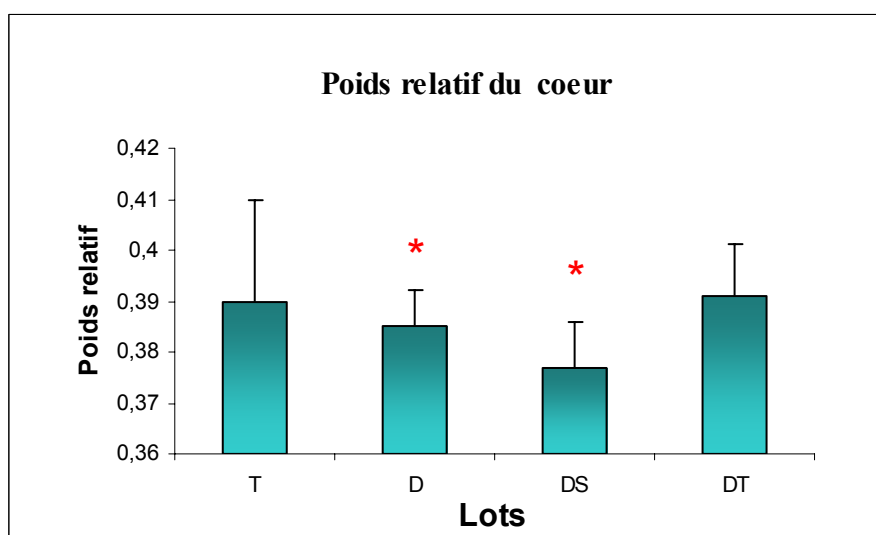
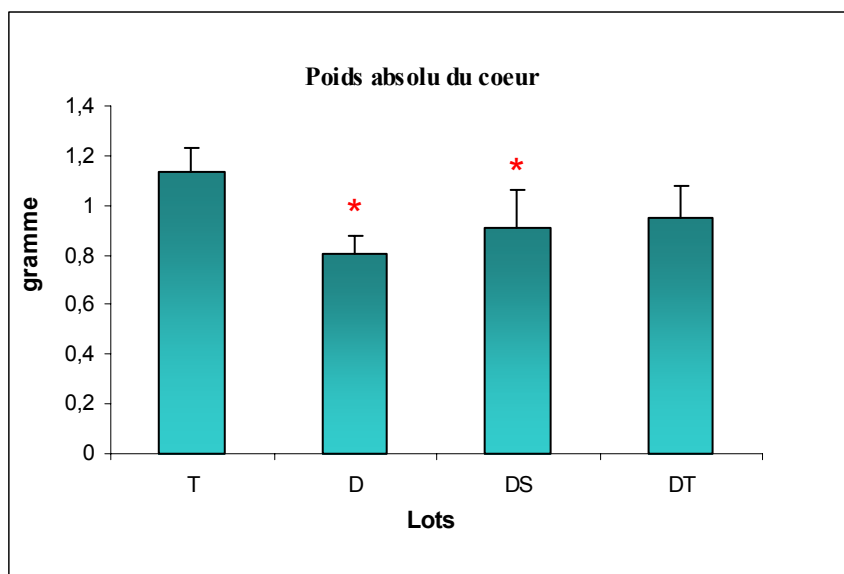
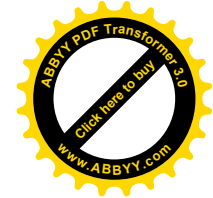
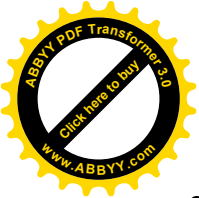


Figure13 : poids absolu et relatif du cœur chez le lot témoin ,diabetique et les lots traités par le tempol et la glisodine.



3.2. Etude des réponses métaboliques

3.2.1 Effet de la glisodine et du tempol sur la variation plasmatique des paramètres métaboliques, le glucose les triglycérides, le cholestérol chez les rats témoins et diabétiques.

les variations plasmatiques des paramètres métabolique des rats chez les lots témoin (T), diabétique (D) ,diabétique traité par la glisodine (DS) et diabétique traité par le tempol (DT) sont rassemblées dans le tableau 8et les figures 12, 13et 14.

- ***Concentration plasmatique en glucose***

Les resultas concernant la variation de la concentration du glucose plasmatique révèlent une hypérglycémie chez tous les lots diabétiques par rapport au témoin. Cependant les adjuvants utilisés en l'occurrence la glisodine et le tempol ont eu un effet hypoglycémiant révélé par une diminution de la concentration du glucose chez les rats traités (D : $2.96 \pm 0.56^{**}$, DS : $2.10 \pm 0.36^{*a}$ et DT : $2.01 \pm 0.22^{*a}$).

- ***Concentration plasmatique en triglycérides***

Les résultats révèlent un accroissement très significatif de la concentration plasmatique des triglycérides chez les animaux diabétiques non traités et significatif chez les rats traités le lot DT par rapport aux animaux témoins (D : $236.1 \pm 11.9^{**}$, DS : $132.8 \pm 9.8^{*a}$ et DT : $176.5 \pm 12.4^{*}$) En revanche les deux antioxydants semble avoir un effet positif en atténuant hypertriglycédirimie.

- ***Concentration plasmatique en cholestérol***

La teneur plasmatique en cholestérol augmente significativement chez les rats diabétiques traités ou non par rapport au témoin . le traitement par la glisodine semble rétablir cette augmentation (DS : 68.4 ± 5.8 vs D : 91.2 ± 5.3 p < 0.05) .

- ***Concentration plasmatique en lipoperoxydes (LPO)***

Les résultats obtenus montrent une augmentation de la peroxydation lipidique chez les rats diabétique en comparaison aux rats témoins (D : 18.6 ± 2.3 vs T : 10.9 ± 1.8 , P < 0.01). En revanche le traitement des rats et principalement par la glisodine a diminué cet effet peroxidasique par rapport au rats diabétique non traités. (DS : 13.2 ± 1.5 et DT : 15.8 ± 3.1 vs D : 18.6 ± 2.3 , P < 005).

Tableau 8 : Variation plasmatique des paramètres métaboliques, le glucose en g/l, les triglycérides, le cholestérol en mg /dl et les lipoperoxydes en nmol/ml chez les rats témoins , diabétiques et traités par le tempol et la glisodine.

Lots	Glucose g/l	Triglycérides mg/dl	Cholestérol mg/dl	LPO nmol/ml
Témoin	1,16 ± 0,36	98,7 ± 4,6	52,8 ± 3,1	10,9 ± 1,8
D	2,96 ± 0,56**	236,1 ± 11,9**	91,2 ± 5,3*	18,6 ± 2,3**
DS	2,10 ± 0,36*a	132,8 ± 9,8*a	68,4 ± 5,8*a	13,2 ± 1,5*a
DT	2,01 ± 0,22*a	176,5 ± 12,4*	74,1 ± 6,2 *	15,8 ± 3,1 *

Valeurs exprimées en $m \pm \sigma$ (n= 6) et analysées par ANOVA one-way suivi du test de Tukey's pour la comparaison multiple entre les différents groupes.

- ** p< 0.01 vs T, * p < 0.05 vs T
- a : p< 0.05 vs D.

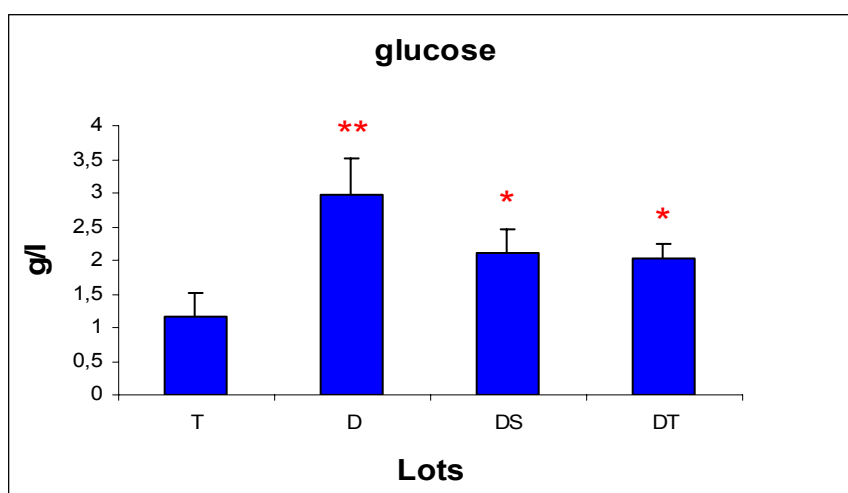


Figure 14 : Variation de la concentration plasmatique du glucose chez les rats témoins et diabétiques traités par le tempol et la glisodine.

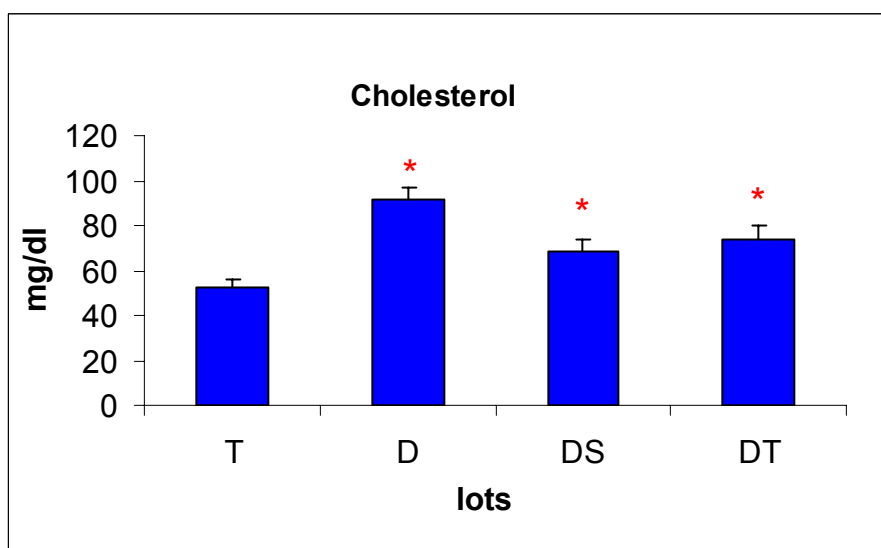
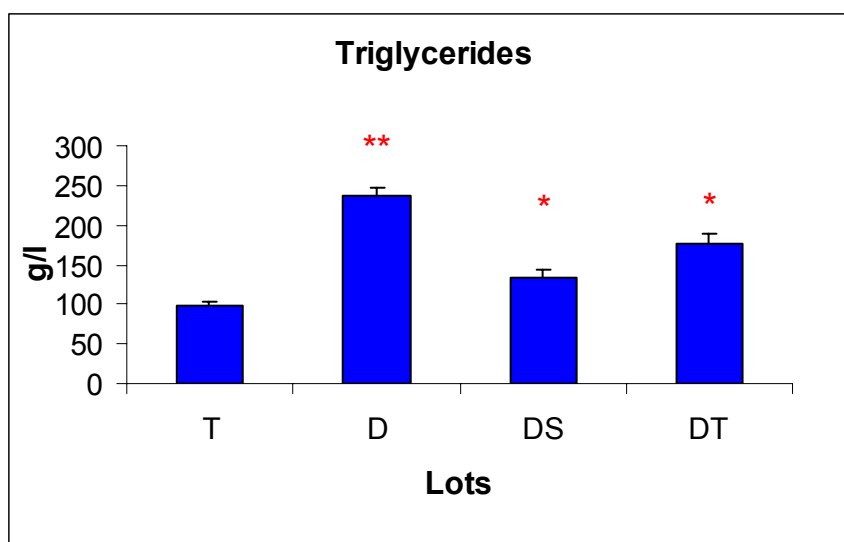


Figure 15 : *Variation des concentrations en triglycerides et cholestérol chez les rats témoins et diabétiques traités par le tempol et la glisodine.*

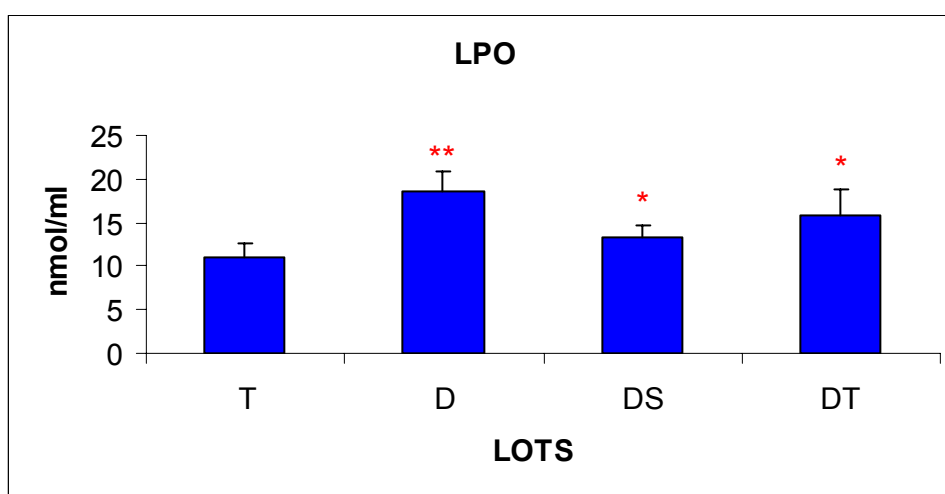


Figure 16: Variation de la concentration plasmatique des lipoperoxydes chez les rats témoins et diabétiques traités par le tempol et la glisodine.

3.3. Etude des biomarqueurs de l'état cardiaque

Cette étude repose sur l'évaluation de deux paramètres enzymatique spécifique à l'état du cœur en l'occurrence la CPK et LDH.

3.3.1. Effet de la glisodine et du tempol sur la variation de l'activité de deux marqueur enzymatique de l'état cardiaque la lactate deshydrogénase et la créatine phosphokinase chez les rats témoins et diabétiques.

Nos résultats obtenus révèlent une augmentation des activités de la LDH et de la CPK chez tous les lots diabétiques par rapport au lot témoin (LDH : D 128.6 ± 2.88 vs T : 68.53 ± 2.33 ; CPK : D 119.6 ± 3.6 vs T : 59.8 ± 2.9 ; $P < 0.01$). En revanche, le traitement des rats diabétique par les deux SOD mémitiques engendre une diminution de l'activité des deux enzymes, LDH et la CPK mais cette diminution est plus significative après supplémentation de la glisodine en comparaison au tempol. (LDH D : 128.6 ± 2.88 vs DS : 82.4 ± 3.3 et DT : 96 ± 3.1 , $P < 0.05$; CPK : D : 119.6 ± 3.6 vs DS : 81.1 ± 2.5 et DT : 88.9 ± 3.2 , $P < 0.05$).

Tableau9 : variation de l'activité de deux marqueur enzymatique de l'état cardiaque la lactate deshydrogénase LDH et la créatine phosphokinase CPK en U/l chez les rats témoins et diabétiques.

Lots	LDH U/l	CPK U/l
Témoin	68,53 ± 2,33	59,8 ± 2,9
D	128,6 ± 2,88**	119,6 ± 3,6**
DS	82,4 ± 3,3*a	81,1 ± 2,5*a
DT	96 ± 3,1*a	88,9 ± 3,2*

Valeurs exprimées en $m \pm \sigma$ (n= 6) et analysées par ANOVA one-way suivi du test de Tukey's pour la comparaison multiple entre les différents groupes.

- ** $p < 0.01$ vs T, * $p < 0.05$ vs T.
- a : $p < 0.05$ vs D.

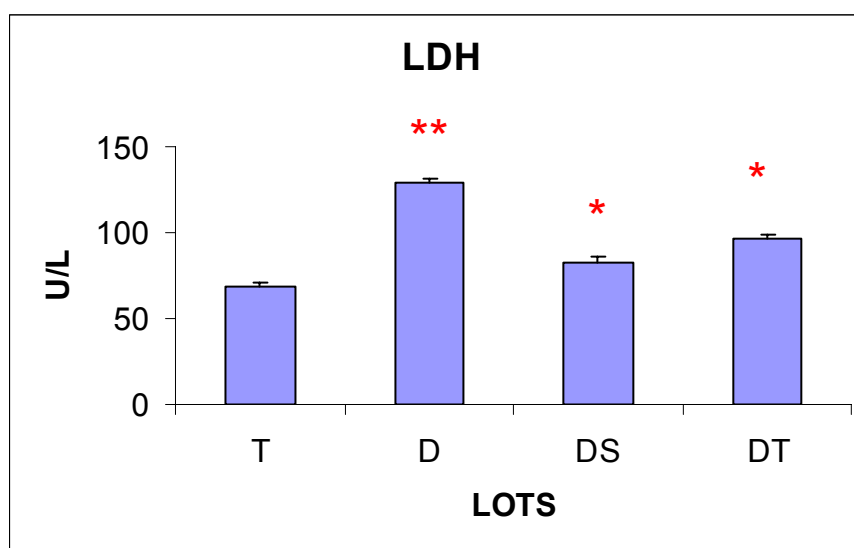


Figure17 : variation de l'activité de la lactate deshydrogénase LDH chez les rats témoins et diabétique traités par le tempol et la glisodine.

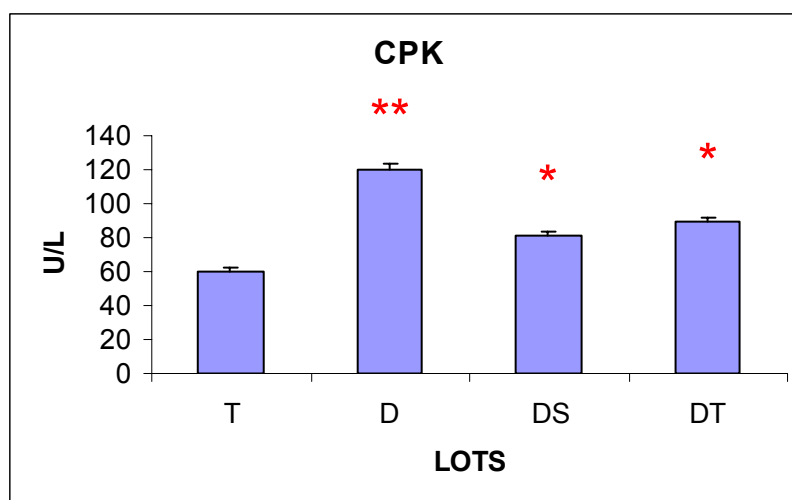


Figure18 : variation de l'activité de la créatine phosphokinase CPK chez les rats témoins et diabétiques traités par le tempol et la glisodine.

3.4. Analyse du stress oxydant

Cette analyse repose sur la quantification des paramètres enzymatiques et non enzymatiques relatifs à l'état du stress oxydatif (OSS) au niveau cardiaque principalement la teneur en GHS, l'activité de la SOD, de la catalase et de la GST. .

3.4.1 Effet de la glisodine et du tempol sur la variation des marqueurs du stress oxydant dans le tissu cardiaque des rats témoins et diabétiques.

➤ Teneur cardiaque en glutathion réduit

Nos résultats montrent que la teneur hépatique en glutathion réduit décroît très significativement chez le lot D par rapport au lot T (T : 51.2 ± 2.9 vs D : 21.8 ± 2.2 , $P < 0.01$) cette chute s'est améliorée considérable après l'administration du tempol et notamment de la glisodine (D : 21.8 ± 2.2 vs DT: 30.5 ± 3.8 et DS : 39.7 ± 2.5 ; $P < 0.05$) . (Tab.10,fig12)

➤ Teueur cardiaque en gluthation S-transférase

De même, les résultats concernant l'activité de la GST font observer une diminution très significative de l'activité de la GST cardiaque chez le lot diabétique par rapport au lot témoin (T : 112.8 ± 6.4 vs D : 59.8 ± 5.2 , $P < 0.01$).

Le traitement par la SOD a induit une activité GST qui est significativement supérieurs à celle des rats diabétique non traités (DS : 88.6 ± 7.1 vs D : 59.8 ± 5.2 ; $P < 0.05$) (*Tab.10,fig12*).

➤ *Teneur cardiaque en catalase*

Concernant L'activité de la catalase, nos résultats révèlent qu'il existe une diminution chez l'ensemble des lots traités par rapport au témoin , cette diminution est très significative chez le lot D par rapport au lot T .En revanche , le traitement par le tempol et la glisodine a rétabli significativement la teneur en CAT qui reste faible par rapport à celle des témoins (*Tab.11,fig18*).

➤ *Teueur cardiaque en suproxyde dismutase*

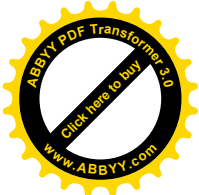
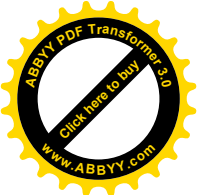
On constate que l' activité de la SOD diminue significativement chez le lot diabétique par rapport au lot témoin par contre le traitement par la glisodine et tempol augmente significativement l'activité de la SOD par rapport au lot D qui reste faible comparativement au lot T .(*Tab .11,fig18*)

Tableau10 :Variation de l'activité de la du glutathion réduit en nmol/mg protéine et de la GST en nmol CDNB/min/mg protéine chez les rats témoins et traités.

Lots	Témoin	D	DS	DT
GSH nmol/mg	51.2 ± 2.9	$21.8 \pm 2.2^{**}$	$39.7 \pm 2.5^{*a}$	$30.5 \pm 3.8^{*}$
GST nmol/min/mg	112.8 ± 6.4	$59.8 \pm 5.2^{***}$	$88.6 \pm 7.1^{*a}$	$69.5 \pm 4.6^{*}$

Valeurs exprimées en $m \pm \sigma$ (n= 6) et analysées par ANOVA one-way suivi du test de Tukey's pour la comparaison multiple entre les différents groupes.

- $*p < 0.05$ vs T ; $**P < 0.01$ vs T .
- a : $P < 0.05$ vs D.



DISCUSSION

4. Discussion

Les études dans le domaine vasculaire ont permis de démontrer l'importance de l'endothélium et du NO dans l'homéostasie vasculaire et circulatoire. Des preuves substantielles ont permis de démontrer que les réponses dépendant de l'endothélium étaient altérées dans les modèles animaux et chez les patients atteints de maladie cardio-vasculaires. La dysfonction endothéliale s'est avérée un événement critique dans le développement de maladies cardiovasculaires. En effet, la dysfonction endothéliale se traduit par une perte de la capacité vasorelaxante dépendante de l'endothélium dans les vaisseaux. Cette altération s'explique principalement par une diminution de la biodisponibilité du NO, facteur vasorelaxant d'origine endothéliale (Muzykantov, 2001).

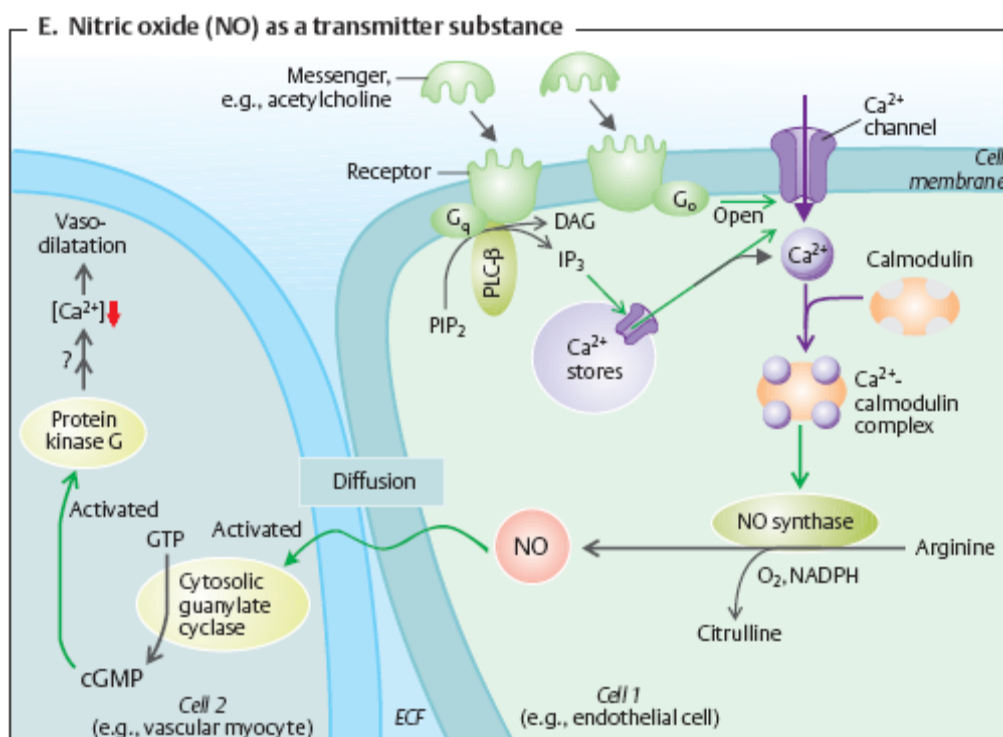
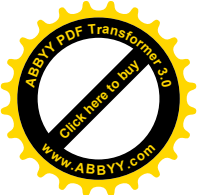


Figure 21: Rôle du NO dans la régulation moléculaire du processus de vasodilatation (Muzykantov, 2001).

Bien que les mécanismes par lesquels le diabète contribue à la dysfonction endothéliale ne soient pas complètement compris. Des preuves importantes reliant l'hyperglycémie et les dysfonctions des cellules endothéliales viennent d'études d'incubation in vitro dans lesquelles l'exposition d'artères à des concentrations élevées de glucose entraîne une dysfonction endothéliale similaire à ce qui est observé chez les animaux diabétiques (Tesfamariam et al., 1990).



Ainsi un nombre croissant d'évidences tend à indiquer le stress oxydatif comme l'une des principales causes de la réduction de biodisponibilité du NO et subséquemment dans la dysfonction endothéliale induite par l'hyperglycémie ([Griendling et al., 2000](#) ; [Di Virgilio, 2004](#)).

Depuis quelques années, plusieurs études s'intéressent aux effets bénéfiques des antioxydants sur la santé vasculaire. En conséquence, dans les modèles animaux de diabète, les relaxations dépendantes de l'endothélium peuvent être rétablies par un traitement à base d'anti-oxydants. Il a été démontré qu'une administration aiguë de vitamine C améliore la vasodilatation dépendante de l'endothélium chez les patients DID et DNID ([Ting et al., 1996](#) et [Timimi et al., 1998](#)).

Notre travail a pour objectif de déterminer l'effet prophylactique de deux antioxydants le tempol et la glisodine sur les réponses métaboliques et le statut antioxydant cardiaque au cours d'une glycotoxicité expérimentale induite chez le rat.

Nos résultats ont montré clairement, une hyperglycémie et une augmentation des niveaux des triglycérides, du cholestérol et une diminution du poids corporel chez les rats diabétique par rapport aux témoins. De plus, ces manifestations biochimiques liées au diabète sont corrélées significativement avec une augmentation des activités de la CPK et la LDH. En effet, Christopher et al. (2003) ont montré que le profil de la CPK est un des marqueurs enzymatiques du dommage du muscle cardiaque et que l'élévation sérique de la CPK était associée à une cardiomyopathie chez le rat diabétique. De plus [Awaji et al., 1990](#) et [Pon Velayutham et al., 2007](#) ont mis en évidence un phénomène nécrotique au niveau du cœur des rats diabétiques associé à une augmentation de l'activité de l'aspartate transaminase AST et de la LDH cardiaque ; justifiant ainsi que ces deux enzymes pourraient être utilisé comme marqueurs spécifiques de la nécrose du myocarde. Nos résultats qui illustrent une nette augmentation de la CPK et de la LDH chez les femmes diabétiques sont donc en accord avec les travaux cités et admettent en conséquence, un effet glucotoxique sur le myocarde. Dans ce sens un ensemble de travaux publiés récemment sur le diabète et le dysfonctionnement endothélial ([Bonnefont-Rouselot et al., 2002](#) ; [Huet et Duranteau 2008](#) ; [Pellegrin et al., 2008](#)) s'accordent pour un effet glucotoxique inhérent d'un stress oxydant. Ce dernier provoque une augmentation de la production des radicaux libres tel que l'anion super- oxyde et des AGE (advanced glycation end products) qui pourraient altérer la synthèse du collagène et monoxyde d'azote facteurs principales dans la myorelaxation (**fig.6**)

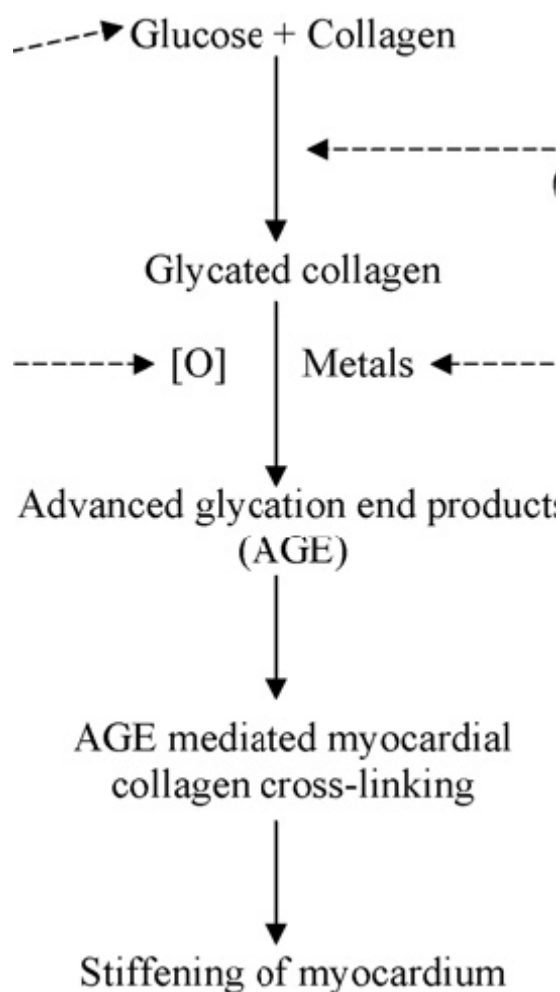
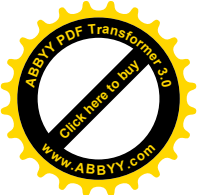


Figure22: *Mechanism of hyperglycaemia on collagen glycation, AGE formation and collagen cross-linking (Pon Velayutham et al. (2007) .*

Le traitement des rats diabétiques par le tempol ou la glisodine a amélioré partiellement les réponses biochimiques et principalement celle de la CPK et LDH marqueurs en puissance de l'intégrité du tissu cardiaque. En effet, chez l'humain, une équipe anglaise a isolée des anneaux d'artère radiale provenant de patients hypertendus avec hypercholestérolémie qu'ils ont mis en présence ou non de tempol. Ils ont démontré que le traitement au tempol d'anneaux d'artères radiales diminue la réponse contractile et réduit la production de superoxydes engendrés par l'angiotensine II dans ces artères (Puntmann et al ,2005). Ceci suggère un effet tempol et glisodine sur la transmission cholinergique via l'activation de NO synthétase enzyme responsable de la synthèse du NO.

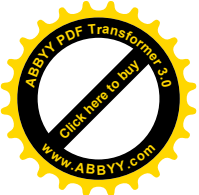


De plus, plusieurs études ont montré que le stress oxydant contribue au développement de la résistance à l'insuline entraînant une perturbation de l'insulinosécrétion ([Galili et al., 2007](#) et [Ouali et al., 2007](#)). Ainsi une étude récente confirme le développement de la résistance à l'insuline qui se traduit par une diminution de l'action gluco-régulatrice de l'insuline chez des rats diabétiques traités par la streptozotocine. Cet effet est rétabli par la supplémentation d'antioxydants de type SOD mimétique ([Park et al., 2006](#) ; [Blendea et al., 2005](#)). Ceci confirme clairement nos résultats relatifs aux activités enzymatiques, révélant un déclin du statut antioxydant (GHS, GST, CAT et SOD) chez les rats diabétiques et une nette amélioration de ce dernier chez les rats diabétiques traités. Toutefois le mécanisme d'action de ces antioxydants SOD mimétiques reste encore mal connu.

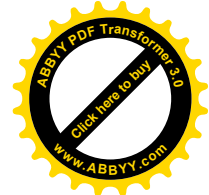
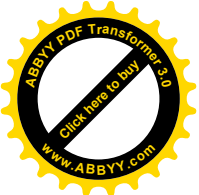
Certaines études ont montré clairement le potentiel thérapeutique des mimétiques de la SOD en tant que adjuvant améliorant la fonction endothéliale et les désordres cardiovasculaires associés à une élévation du stress oxydatif vasculaire. En conséquence, le tempol améliore aussi la vasodilatation dépendante de l'endothélium induite par l'acétylcholine dans des artérioles afférentes rénales de lapins rendus diabétiques suite à un traitement à l'alloxane ([Schnackenberg et al., 2001](#)). De plus, Onuma et ses collaborateurs ont démontré que le tempol pouvait augmenter la biodisponibilité du NO et ainsi influencer des mécanismes impliqués dans le contrôle du débit sanguin médullaire chez des rats nourris avec un régime fructosé induisant une hypertension ([Onuma et Nakanishi, 2004](#)).

Le diabète sucré induit des changements dans la teneur des antioxydants naturels qui protège les cellules de l'effet toxique des radicaux libres provenant de l'hyperglycémie ([Anu et al., 2007](#)).

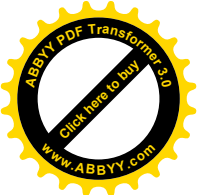
Nos résultats montrent un effet plus efficace de la glisodine en comparaison à celui du tempol concernant la teneur en GSH et l'activité des enzymes antioxydantes. Ce ci explique le pouvoir antioxydant de la glisodine à renforcer la défense des antioxydants endogènes. Plusieurs études ont démontré l'importance de la SOD dans le maintien de la réactivité vasculaire. En fait, elle est l'enzyme antioxydante contre les O_2^- la plus importante dans toutes les cellules vasculaires ([Yki-Jarvinen et Westerbacka, 2000](#)). La SOD catalyse la dismutation de l' O_2^- en $O_2 + H_2O_2$.



Nos résultats révèlent une augmentation significative de l'activité de la SOD après un traitement par le tempol et la glisodine. Ces résultats démontrent clairement que ces antioxydants capables de mimer la SOD endogène en accélérant sa fonction dans la dismutation de l'anion super oxyde. Cet effet semble d'intérêt clinique important dans le cas des traitements des altérations cardiovasculaires chez les diabétiques. En conclusion nos résultats montrent que le stress oxydatif peut être considéré comme un dénominateur commun sous-jacent à la dysfonction endothéliale dans ces conditions. Il serait intéressant en perspective de mener des travaux sur ce modèle animal diabétique en prolongeant la durée des traitements afin d'évaluer l'effet préventif de ces molécules.



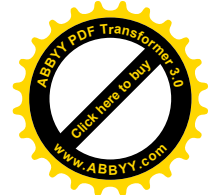
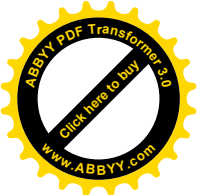
CONCLUSION ET PERSPECTIVES



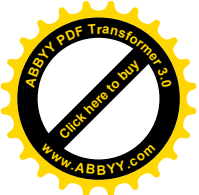
5- Conclusion et perspectives

Nos résultats suggèrent que :

- L'hyperglycémie non contrôlée pourrait à long terme affecter la fonction cardiovasculaire et ceci est révélé par l'augmentation des deux marqueurs enzymatiques la CPK et notamment la LDH et aussi par la diminution de la défense antiradicalaire.
- La présence d'une dysfonction endothéliale est un facteur prédictif de la survenue des anomalies cardiovasculaires chez les diabétiques.
- Le contrôle rigoureux de la glycémie reste le meilleur moyen de l'amélioration de la fonction endothéliale et de la prévention des altérations cardiovasculaires chez les diabétiques, néanmoins l'utilisation des adjuvants naturels à pouvoir antioxydant semble ouvrir une nouvelle voie thérapeutique prometteuse dans la prévention des pathologies liées à l'insulino-déficiences.
- En perspective il serait intéressant de confectionner un modèle animal diabétique rat Zucker et rat obèse qui nous permettrons d'étudier d'une part cet aspect pathologique lié à l'hyperglycémie et comprendre les mécanismes biochimiques impliqués dans le dysfonctionnement endothélial et d'autre part essayer de nouvelles voies thérapeutiques telles que l'utilisation d'antioxydants enzymo-mimétiques.
- Evaluation de la teneur du NO car son inactivation par l'augmentation de la production des radicaux libres notamment, l'anion super oxyde semble être une des caractéristiques du diabète qui explique les anomalies de la vasodilatation.
- Une étude immuno-histochimique des marqueurs apoptotiques tels que la β catéine et la C117 au niveau cardiaque apporterait certainement des réponses claires concernant l'effet des antioxydants utilisés.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



References bibliographiques

Anu,C.,Abbas,A.,Sohail,A.,Raj,K.S.,2007.Indian herbs result in hypoglycemic responses in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutrition Research*.**27**:161-168.

Awaji,Y.,Hashimoto,H.,Matsui,Y.,et al.,1990.Isoenzyme profiles of creatin kinase,lactate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in the diabetic heart:comparaison with hereditary and catecholamine cardiomyopathies.*cardiovasc Res*.**24**:547-54.

Baynes ,J.W., Thorpe ,S.R., 1999. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm.*Diabetes*.**48**: 1-9.

Beauchamps C.,Fridovich,L., 1971. Superoxide dismutase : improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44** :276-287.

Betteridge ,D.J., 2000.What is oxidative stress? *Metabolism*.**49**: 3-8.

Blendea, M.C., Jacobs ,D., Stump, C.S., et al., 2005.Abrogation of oxidative stress improves insulin sensitivity in the Ren-2 rat model of tissue angiotensin II overexpression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.**288**:353-9.

Bonnefont-Rousselot.,Bastard,J.P.,Delattre,J.,2002.Oxidative stress,vascular function and atherosclerosis.*Nutrition clinique et métabolisme*.**16**:260-267.

Boulanger, C. M., 1999. Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heartfailure. *J Mol Cell Cardiol.* **31**:39-49.

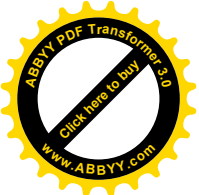
Brenner & Rector - The kidney; Saunders, 7th, 2004.

Chatterjee, S.K., Bhattacharya, M., Barlow ,J.J., 1984. Murine monoclonal antibodies against galactosyltransferase from the ascites of ovarian cancer patients.*CancerRes*.**12**:572532.

Christopher,C. L.,Mathhurat,L.N.,Genitta,G.,Cyrus,I.,Sundar,S.J.,2003.Omega-3polynsaturated fatty acids inhibit the accumulation of PAS- positive material in the myocardium of STZ-diabetic rats.*free radic Res*.**34**:251-61.

Cuzzocrea ,S., McDonald, M.C., Mota-Filipe, H., Mazzon ,E., Costantino., G,Britti D, et al., 2000. Beneficial effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheu* ;**43**:320–8.

Cuzzocrea, S., Riley, D.P., Caputi, A.P., Salvemini ,D., 2001. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev*; **53**:135–59.



Davignon, J., Ganz, P., 2004.Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* .**109**:III27-32.

Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ., 2007.Endothelial function and dysfunction.*testing and clinical relevance. Circulation.***115**:1285–95.

Di Virgilio, F., 2004. New pathways for reactive oxygen species generation in inflammation and potential novel pharmacological targets. *Curr Pharm Des.* **10**: 1647-52.

Dugas, B., 2002. Glisodin®, a nutraceutical product that promotes the oral delivery of superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med.* **33**: S64

Endemann DH, Schiffrin, E.L., 2004.Endothelial dysfunction.*J Am Soc Nephrol.***15**:1983-92.

Forgione, M.A., Loscalzo, J., 2000.Oxidant stress as a critical determinant of endothelial function. *Drug News Perspect.,* **13**: 523-529.

Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V ., 1980.The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle to acetylcholine. *Nature.***288**: 373-376.

Habig, H.W., Pabst, M.J ., Jakoby , W.B., 1984.Glutathione – S – Transferases. The first Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation, *J. Biol Chem* .**249**:7130 – 7139.

Herr, R.R ., Eble , T.E., Bergy ., M .E ., Jahnke , H.K., 1960.Isolation and characterization of streptozotocine . *Antibiotics Annu.* **7**: 236 – 240.

Huet, O., Duranteau, J., 2008.Dysfonction endothéliale : rôle des radicaux libres . *Reanimation.***17** :387-392.

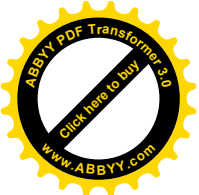
Hwang, J., et al., 2003. Pulsatile versus oscillatory shear stress regulates NADPH oxidase subunit expression: implication for native LDL oxidation. *Circ Res.***93**: 1225-32.

Galili, O., Versari , D., Sattler , K.J., et al., 2007. Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; **292**:904-11.

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

Koya D., King, G.L., 1998. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*; **47**:859-66.

Laakso, M., 1995.Epidemiology of diabetic dislipidemia. *Diabetes Review* .**3**:408-422.



Laight, D.W., et al., 1998. Investigation of oxidant stress and vasodepression to glyceryl trinitrate in the obese Zucker rat in vivo. *Br J Pharmacol*, **125**: 895-901.

Laight, D.W., Carrier ,M.J., Anggard ,E.E., 2000.Antioxidants, diabetes and endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res*;47: 457-64.

Landmesser ,U., Spiekermann ,S., Dikalov ,S., Tatge H., Wilke, R ., Kohler, C ., Harrison, **Hornig,D.G., Drexler ,B .H .,2002.**Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* **106**:3073-3078.

Luck, H., 1963.Catalase .In : Bergmeyer,H.U. (Ed.),Methods of Enzymatic Analysis. *Academic Press, New York*. 885-888.

Matsumoto, K., M.C. Krishna, and J.B. Mitchell., 2004. Novel pharmacokinetic measurement using electron paramagnetic resonance spectroscopy and simulation of in vivo decay of various nitroxyl spin probes in mouse blood. *J Pharmacol Exp Ther*, **310**:1076-83.

Metz, J.M., et al.,2004. A phase I study of topical Tempol for the prevention of alopecia induced by whole brain radiotherapy. *Clin Cancer Res*. **10**: 6411-7.

Mitchell J.B., et al., 1990. Biologically active metal-independent superoxid dismutase mimics. *Biochemistry*. **29**: 2802-7.

Muzykantov, V.R., 2001.Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium. *J Control Release*.**71**: 1-21.

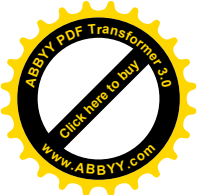
Okamoto, H., 1960. Regulation of promisin synthesis in pancreatic islets and a new aspect to insulin-dependant diabetes. *Mol-cell biochim*.**37**:43-61.

Onuma , S., Nakanishi, K., 2004. Superoxide dismutase mimetic tempol decreases blood pressure by increasing renal medullary blood flow in hyperinsulinemic hypertensive rats. *Metabolism*, **53**:1305-8.

Oliver, I .T., *Biochem J*.61:116.

Ouali, K., 2007.Etude des capacités au stress chez le rat et la ratte gestante diabétiques. Approches Métaboliques, Endocriniennes, Histologiques et Toxicologiques.

Ouldoukis, I., Conti ,M., Krauss, P, et al., 2004. Supplementation with gliadin-combined plant superoxide dismutase extract promotes antioxidant defences and protects against oxidative stress. *Phytother Res* **18** : 957-62.



Park, H., Hasegawa, G., Obayash ,H., et al., 2006. Relationship between insulin resistance and inflammatory markers and anti-inflammatory effect of losartan in patients with type-2 diabetes and hypertension. *Clin Chim Acta*.**374**:129-34.

Pellegrin,M.,Mazzolao,L.,Berthelot,A.,Laurant,P.,2008.Endothelial dysfunction and cardiovascular risk.Exercise protects endothelial function and prevents cardiovascular disease. *Science &Sport in press*.

Puntmann, V.O., et al., 2005. Role of oxidative stress in angiotensin-II mediated contraction of human conduit arteries in patients with cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol*, **43**: 277-82.

Pon Velayutham,A.B.,Kuruvimalai,E.S.Periasamy,Chennam,S.S.,2007.Green tea attenuates diabetes induced Maillard-type fluorescence and collagen cross-linking in the heart of streptozotocin diabetic rats. *Pharmacological Research*.**55**:433-440.

Poredos, P., 2002.Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Pathophysiol Haemost Thromb*, **32**: 274-7.

Regoli , F.M., Principato ,G., 1995.Gluthathione, Gluthathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel *Mytilus galloprovincialis*;exposed to metal under field and laboratory conditions : implications for the use of biomarkers. *Aquatic Toxicology* .**31**:143-164 .

Rosalki, S.B., 1967. *J Lab Clin Med* .69:696.

Schnackenberg, C.G. , Wilcox, C.S. 2001.The SOD mimetic tempol restores vasodilation in afferent arterioles of experimental diabetes. *Kidney Int*,**59**(5): p. 1859-64.

Stein, E.A., 1998. Prevention of heart disease: is LDL reduction the outcome of choice? Absolutely yes .*Value Health*. **2**:120-4.

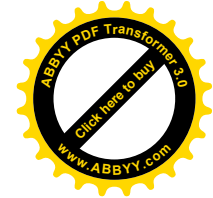
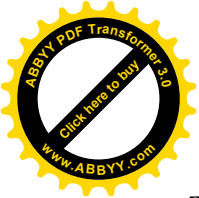
Szasz, G., et al. , 1976. *Clin chem*.22:650.

Schnedl ,W.J, Ferber, S., Johnson, J.H, Newgard, C.B., 1994 .STZ -transport and cytotoxicity: specific enhancement in Glut-2 expressing cells. *Diabetes* .**43**: 1326-1333.

Tesfamariam ,B.,Brown ,M.L,Cohen ,R.A. 1990. Elevated glucose promotes generation of endothelium-derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. *J Clin Invest*. **85** : 929-932.

Tesfamariam ,B.,1994. Free radicals in diabetic endothelial dysfunction. *Free Radic Biol Med*.**16** :383-391.

Timimi ,F.K.,Ting,H.H,Haley,E.A.,et al., 1998. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*. **31** : 552 557.



Ting, H.H., Timimi, F.K., Boles, K.S., et al. 1996. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* **97**: 22-28.

Thomas et labor., 1992. Lab. Diag. 4thed.

Thomas, S.R., Chen, K., Keaney, J.F., 2003. Oxidative stress and endothelial nitric oxide bioactivity. *Antioxid Redox Signal.* **5**: 181-94

Touyz, R.M., et al. ,2004. Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens*, **22**: 1141-9.

Trinder, P., 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* **6**:24.

Weckbecker, G., Cory, J.G. , 1988. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Lett.* **30**:257-64.

Yamamoto, H., Uchigata, Y., Okamoto, H., 1981. DNA strand breaks in pancreatic islets by in vivo administration of alloxan or streptozotocine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **3**:1014-20.

Yki-Jarvinen, H., Westerbacka, J., 2000. Vascular actions of insulin in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* **24**: 25-8.

Young, D., Pestaner, L. , 1975. *Clin. Chem.* **21**: 5.

Zimmerman, H.J., Henry, J.B., 1984. Dans: Henry JB, éd. *Clinical Diagnosis and Management by laboratory Methods*. 17^{ème} édition. Philadelphie: WB Saunders. 251-282.

Zollner, S., et al., 1997. Nitroxides increase the detectable amount of nitric oxide released from endothelial cells. *J Biol Chem*, **272** 23076-80.

