



Ecole Doctorales des Sciences de la Vie et de la Santé

## THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du grade de  
Docteur en Sciences de l'Université de Strasbourg

**Discipline : Physiologie et biologie des organismes-populations-interactions**

# Prévention du stress oxydant dans le diabète et ses complications par des antioxydants d'origine naturelle

Présentée par  
**Nathalie AUBERVAL**

Soutenue le 24 septembre 2010

Membres du jury et invités :

Mme Séverine SIGRIST  
Mme Valérie SCHINI-KERTH  
M. Emmanuel ANDRÉS  
Mme Fabienne FOUFELLE  
M. Jean-Max ROUANET  
Mme Agnès NEUVILLE-MÉCHINE

PhD, responsable du laboratoire  
Professeur à la Faculté de Pharmacie  
Professeur en Diabétologie  
Directrice de Recherche INSERM  
Maître de Conférence  
Professeur en Anatomopathologie

Directrice de thèse  
Co-directrice  
Rapporteur interne  
Rapporteur externe  
Rapporteur externe  
Examinateur

Mme Nathalie JEANDIDIER  
M. Michel PINGET

Professeur en Diabétologie  
Professeur en Diabétologie

Invitée  
Invité

Je remercie Monsieur le Professeur Michel PINGET pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, le Centre européen d'étude du Diabète, et pour m'avoir soutenue tout au long de ces trois années de thèse.

Je remercie grandement Madame le Professeur Valérie SCHINI-KERTH pour avoir codirigé ce travail et pour m'avoir ouvert les portes de son équipe au sein du Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie de la Faculté de Pharmacie.

J'adresse également mes remerciements aux membres du jury :

- Madame Fabienne FOUFELLE, que j'ai eu l'occasion d'écouter lors d'une conférence à la SFD sur le stress du réticulum endoplasmique et dont la présentation m'avait énormément plu,
- Madame le Professeur Agnès NEUVILLE-MÉCHINE, pour m'avoir conseillée en histologie et partagé des observations sous le microscope,
- Monsieur le professeur Emmanuel ANDRÈS, pour avoir eu l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail de diabétologie,
- Et enfin, Monsieur Jean-Max ROUANET, pour avoir également accepté de faire partie du jury et pour son travail sur les polyphénols.

Je n'oublierais pas non plus d'adresser mes profonds remerciements et ma sympathie à Madame le Professeur Nathalie JEANDIDIER, qui a su me guider vers des choix judicieux et qui a su m'apporter toute la compréhension et la réflexion médicale qui pouvait me manquer, en tant que chercheur et non clinicienne.

Je remercie tous ceux que j'ai pu côtoyer de près ou de loin, je pense notamment aux chimistes de la faculté de chimie de Strasbourg, Monsieur le Professeur André FOUGEROUSSE et Monsieur Philippe CHABERT, merci pour vos conseils et votre aide dans ce domaine.

En faisant un petit détour à l'Hôpital Civil, j'adresse mes remerciements au Docteur Cécile DEHARVENGT, j'ai beaucoup aimé travailler avec toi, lors de la mise en place du protocole stress oxydant sur les patients, merci de ton aide. Puis en continuant mon détour par la faculté de Pharmacie, je voudrais adresser ma gratitude à Cyril, merci de ta gentillesse et de tes conseils fort avisés pour certaines manips ; Camille et Jean, un gros MERCI pour votre implication dans la mise au point difficile de la cytométrie sur mes modèles et à Christian aussi pour toutes mes questions ennuyeuses sur le choix des fluorochromes !

De retour au labo,

Le plus gros de mes mercis va à ma responsable et directrice de thèse, Séverine. Sache qu'il n'est pas facile d'écrire un remerciement, il y a beaucoup de choses à dire... mais je vais faire simple. Durant ces trois années, tu m'as guidée d'une main de maître et le résultat est là aujourd'hui, plus que positif, et pas uniquement au niveau professionnel. Merci pour ta confiance, tes conseils aguerris du début jusqu'à la fin de l'aventure. Comme tu dis, les bébés chercheurs ont du mal à quitter le CeeD, je crois que tu vas avoir un exemple de plus... Sache que pour certains (je dirais plutôt certaines) d'entre nous, tu représentes un « modèle » de réussite en conjuguant à la fois, les plans professionnel et privé. Mais cela, tu le dois à ta force intérieure, ne change pas. Souvent je me suis dit « j'aimerais être un jour être ce qu'elle est » (je ne fayote pas, c'est vrai !). J'aimerais aussi te remercier pour m'avoir aidée et « ouvert la porte » quand j'en ai eu besoin, simplement Merci.

Que serait le labo sans ses joyeux lurons : William et Allan, les compères de toujours ; Kévin, courage, c'est bientôt ton tour ; une petite pensée également pour Rachid et François, pour l'un la thèse est achevée, pour l'autre... j'espère que tu vas bientôt finir ! Un petit mot aussi pour ne pas oublier notre animalier préféré, Claude. Merci pour toutes les bêtises et blagues que tu racontes (bien que tu ne sois pas le seul...) et qui me font sourire.

Je n'ai aucunement oublié les filles du labo !!! Elodie, trouve ici tous mes remerciements pour ta gentillesse, ton rendement inégalable au travail, c'est grâce à toi que j'ai pu finir à temps. Merci aussi pour l'orthographe et la grammaire... Nathalie R, merci d'avoir été ma copine de bureau pendant plusieurs mois, tout ce qui a attiré au chocolat me fera toujours penser à toi ! Sabrina, merci d'avoir été avec nous, pendant un temps trop court à mon avis, mais cela a été réel plaisir de te connaître ainsi que ta petite famille et la charmante Dédé (qui me fait plus penser au cochon du jeu de l'oie), j'espère qu'on ne s'oubliera pas ! Un gros Merciiiiii tout particulier à Nathalie S. Tu as su prendre sous ton aile la petite lorraine que je suis et me faire découvrir de superbes endroits et surtout de bons restos... Merci pour cela, pour ton amitié et commence par une verveine le matin (lol). La dernière personne que je voudrais remercier, c'est Stéphanie. Je t'ai connue en pharma, et j'ai beaucoup apprécié de travailler avec toi, la preuve aujourd'hui, Stress Oxydant va continuer par toi et je suis fière que ce soit toi qui reprennes le flambeau ! Merci pour ton amitié, ton aide et ta gentillesse... et promets moi de ne plus faire de cuves à organes isolés jusque 20h, j'ai eu la trouille ce coup-là.

Un gros merci aussi aux NewThera Girls, Gigi qui est partie au pays des horlogers et Akkiz, ma compagne de câlin pour me remonter le moral : Merci ! Je n'oublie pas non plus Pierre et Jean-Christophe.

Une petite pensée également pour les stagiaires qui m'ont aidé tout au long de ma thèse, Alex, Emilie, Ramadhani et Marion, Merci pour votre implication.

Merci aussi à tout le personnel de la grande maison IPS Strasbourg, je pense notamment aux filles de l'ASDIA, du résoDIA, la communication et l'administration.

Aux présents et aux absents qui m'ont soutenu et aidé ; Maman, Papa, Zazou et Xav, vous me manquez malgré la conjoncture.

Enfin, je terminerais en remerciant la personne que j'aime, Sylvain. Merci d'avoir suivi tout ce travail fatigant, et de t'y être intéressé, bien que la bio ne soit pas ta passion. A toi mon cœur, merci pour ton aide quotidienne, ton soutien sans faille, dans les moments faciles, comme les difficiles, dans les moments de doutes et de remises en question. Merci d'avoir partagé de nombreux moments avec moi, pourvu que ça continue, et je n'en doute pas. Enfin, Merci pour ton amour et ta gentillesse sans bornes.

Merci à toutes les autres personnes que j'ai connu mais que je n'ai pas citées.

J'espère n'avoir oublié personne, dans le cas contraire... merci.

# Sommaire

SITUATION DU PROJET DE RECHERCHE .....	20
INTRODUCTION .....	22
I. Le diabète .....	22
A. Métabolisme et contrôle de la glycémie.....	22
1. Maintien de la glycémie .....	22
2. Le pancréas – les îlots de Langerhans.....	22
a) La fonction exocrine.....	23
b) La fonction endocrine.....	23
3. Glucagon et Insuline .....	24
a) Le glucagon : structure, biosynthèse, sécrétion et mécanisme d'action.....	24
b) L'insuline : structure, biosynthèse, sécrétion et mécanisme d'action .....	26
B. La pathologie diabétique .....	29
1. Le diabète.....	29
2. La prévalence .....	30
3. Le diabète de type 1 .....	31
a) Physiopathologie du diabète de type 1.....	31
b) Facteurs génétiques et facteurs déclenchants .....	31
c) Production d'auto-anticorps.....	32
d) Mécanisme de destruction de la cellule $\beta$ .....	32
4. Diabète de type 2.....	34
a) Intolérance au glucose.....	34
b) Cas particuliers de l'intolérance au glucose : l'hyperinsulinisme .....	34
c) Facteurs de risque.....	35
d) Mécanisme de l'insulino-résistance .....	36
e) Apoptose des cellules $\beta$ .....	37
C. Les complications liées au diabète .....	38
1. Les complications aiguës .....	38
a) L'hyperglycémie.....	38
b) L'hypoglycémie .....	38
2. Les complications chroniques .....	39
a) Microangiopathies .....	40
b) Macroangiopathies .....	41
3. Pathologie associées au diabète de type 2 : la stéatose hépatique .....	41
a) Généralités .....	41
a) Stéatose microvésiculaire et macrovésiculaire .....	42
b) Formation de la stéatose hépatique.....	43
D. Les traitements du diabète.....	43
1. L'insulinothérapie et ses analogues .....	43

2.	La greffe de pancréas .....	48
3.	La transplantation d'îlots de Langerhans .....	48
4.	Les mesures hygiéno-diététiques .....	48
a)	L'alimentation.....	48
b)	L'activité physique.....	49
5.	Les traitements médicamenteux.....	49
a)	Les antidiabétiques oraux (ADO).....	49
b)	Les incrétines et incrétino-mimétiques.....	50
II.	Le stress oxydant et le diabète .....	50
A.	Le stress oxydant et les systèmes de défenses.....	50
1.	Définition du stress oxydant .....	50
2.	Les entités oxydantes et leur production.....	51
a)	La production des entités oxydantes au niveau cellulaire .....	52
b)	Les facteurs environnementaux comme source de ROS .....	53
3.	Rôle physiologique des entités oxydantes .....	53
a)	Messagers intra et extracellulaire.....	54
b)	Régulation du tonus vasculaire et autre fonction du NO .....	54
c)	Défense immunitaire et « Burst Oxydatif » .....	54
4.	Les cibles biologiques du stress oxydant .....	55
a)	Les lipides.....	55
b)	Les acides nucléiques.....	56
c)	Les protéines.....	57
d)	Les sucres .....	58
5.	Le stress oxydant et les pathologies .....	58
a)	L'ischémie re-perfusion .....	58
b)	L'athérosclérose.....	58
c)	Le cancer.....	59
d)	Les maladies neurodégénératives .....	59
e)	L'âge.....	59
f)	Le diabète .....	59
B.	Implications du stress oxydant dans le diabète et pathologie associée .....	60
1.	Glutotoxicité liée à l'hyperglycémie.....	60
a)	L'auto-oxydation du glucose .....	60
b)	La voie des polyols.....	61
c)	La voie de la PKC.....	62
d)	Glycation des protéines et formation des AGEs .....	62
2.	Stress oxydant et hyperinsulinisme (cas du diabète de type 2).....	64
3.	Molécules pro-oxydantes et antioxydantes de la cellule $\beta$ .....	64
a)	Enzyme pro-oxydante : la NADPH oxydase .....	64
b)	Défenses antioxydantes des cellules $\beta$ .....	65
4.	Effet du stress oxydant sur l'insulino-sécrétion et l'insulino-résistance.....	65
III.	Préventions par les antioxydants .....	67

A.	Généralités.....	67
1.	Définition .....	67
2.	Les systèmes de défenses antioxydants .....	68
a)	Les enzymes antioxydantes.....	68
b)	Les systèmes antioxydants non enzymatiques et leurs effets .....	70
3.	Pourquoi avons-nous besoin des antioxydants de l'alimentation ?.....	74
4.	Risques des antioxydants .....	76
5.	Etudes épidémiologiques .....	76
a)	Etudes ATBC et CARET.....	76
b)	Etude SU.VI.MAX.....	76
B.	Les antioxydants dans le diabète .....	77
1.	Les vitamines, coenzyme et oligo-éléments .....	77
2.	Les composés d'origine naturelle non vitaminique .....	78
a)	Les flavonoïdes en général .....	78
b)	Le curcumin .....	79
C.	Les polyphénols.....	79
1.	Généralités sur les polyphénols.....	79
2.	Le french paradox .....	80
3.	Quelques polyphénols du raisin .....	81
a)	Le resvératrol ( <i>trans</i> ) .....	81
b)	Le resvératrol <i>cis</i> .....	81
c)	La procyanidine B2.....	82
4.	L'effet antioxydant des polyphénols .....	82
5.	Effet des polyphénols de vin rouge dans la pathologie diabétique .....	83
D.	Le thé.....	83
1.	Généralités sur le thé.....	83
a)	Les principes actifs .....	83
2.	Effets généraux de l'EGCG .....	85
3.	Effet du thé vert et de l'EGCG sur le diabète .....	87
E.	L'exercice physique : oxydant ou antioxydant ?.....	87
	OBJECTIFS .....	90
	MATERIELS ET METHODES.....	91
I.	Etudes des antioxydants sur des cellules bêta pancréatiques .....	91
A.	Matériels.....	91
1.	Lignée cellulaire.....	91
2.	Molécules antioxydantes.....	91
3.	Molécules induisant un stress oxydant.....	92
B.	Méthodes .....	92
1.	Viabilité cellulaire.....	92
2.	Détection de l'apoptose par cytométrie en flux (Annexine V-PE).....	93
3.	Détection de l'apoptose par cytométrie en flux (Caspase 8 et 9).....	94
4.	Mesure de la production de peroxyde d'hydrogène par cytométrie en flux (DCFH-DA).....	94
5.	Etudes des gènes du stress oxydant et des défenses antioxydantes par RT-qPCR array ...	95
6.	Enzymes antioxydantes CAT et SOD.....	97
7.	Détection des protéines carbonylées par ELISA.....	97
8.	Mesure de la peroxydation lipidique.....	98
9.	Analyses statistiques .....	99
II.	Etudes des antioxydants <i>in vivo</i> chez le rat hyperinsulinique .....	99

A.	Mise au point du modèle animal .....	99
B.	Etudes des antioxydants et de l'exercice physique .....	100
C.	Méthodes .....	101
1.	Masse des animaux et préparation des biberons d'antioxydants / placebo.....	101
2.	Sacrifices, prélèvement des organes et dissections des artères .....	101
3.	Etudes biochimiques plasmatiques .....	102
a)	Dosage des protéines totales .....	102
b)	Etude de la glycémie .....	102
c)	Dosage du C-peptide .....	103
d)	Dosage de la proinsuline .....	103
e)	Dosage des triglycérides.....	104
f)	Etude de l'inflammation par la protéine C-réactive.....	104
4.	Etude du stress oxydant.....	104
a)	Dosage des lipides peroxydés par la méthode TBARS.....	104
b)	Dosages des protéines carbonylées du plasma .....	105
5.	Congélation et inclusions des organes prélevés .....	105
a)	Congélation à sec .....	105
b)	Congélation en OCT .....	106
c)	Inclusions d'organes en paraffine .....	106
6.	Etudes histologiques .....	106
a)	Mise en évidence des plaques d'athérome dans l'aorte .....	106
b)	Coupe au microtome et déparaffinage de lames.....	107
c)	Coloration hématoxyline / éosine .....	107
d)	Coloration au trichrome de Masson.....	108
e)	Mise en évidence de ROS tissulaire .....	108
7.	Etude immuno-histologique : immuno-marquage insuline.....	109
8.	Analyses statistiques .....	110
	RÉSULTATS .....	111
I.	Étude <i>in vitro</i> du stress oxydant et prévention par des antioxydants .....	111
A.	Mise au point du modèle de stress oxydant.....	111
B.	Étude des effets des antioxydants sur la viabilité des cellules .....	113
C.	Effet préventif des antioxydants.....	115
D.	Etude de l'apoptose par l'annexine-V .....	118
E.	Etude de l'apoptose par les caspases 8 et 9.....	119
F.	Étude de l'expression des gènes du stress oxydant .....	120
G.	Étude de l'expression des enzymes antioxydantes : catalase et superoxyde dismutase.....	123
H.	Quantification de la production intracellulaire d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	125
I.	Conséquence du stress oxydant.....	127
1.	Sur la quantité de lipides peroxydés .....	127
2.	Étude de la carbonylation des protéines.....	129
II.	Étude <i>in vivo</i> de l'effet des antioxydants sur un modèle de rats intolérants au glucose .....	131
A.	Mise au point du modèle de diabète de type 2 .....	131
1.	Effet des régimes normocalorique ou hypercalorique sur la glycémie .....	131
2.	Effet des deux régimes sur la C-peptidémie .....	133
3.	Effet des régimes alimentaires sur la prise de masse des animaux .....	134
4.	Effet des traitements sur l'histologie du pancréas .....	135



a)	Coloration Hématoxyline / Éosine .....	135
b)	Mesure de la taille des îlots après coloration Hématoxyline / Éosine.....	136
c)	Coloration au trichrome de Masson.....	138
5.	Effet des traitements sur l’histologie du foie .....	139
a)	Coloration Hématoxyline / Éosine .....	139
b)	Coloration au trichrome de Masson.....	140
B.	Étude <i>in vivo</i> de l’effet des antioxydants .....	142
1.	Étude du stress oxydant.....	142
a)	Dosage des lipides peroxydés par la méthode TBARS.....	142
b)	Effet des traitements sur la carbonylation des protéines.....	145
2.	Étude métabolique.....	148
a)	Masse des animaux.....	148
b)	Glycémie plasmatique .....	151
c)	C-peptidémie.....	152
d)	Pro-insulinémie.....	155
e)	Étude histologique du pancréas .....	157
f)	Marquage du pancréas à la DHE.....	166
g)	Dosage des triglycérides.....	169
h)	Dosage de la protéine C-réactive.....	172
3.	Complications cardiovasculaires : dépôt de plaques d’athérome dans l’aorte.....	174
4.	Complication hépatique .....	176
a)	Étude de la masse des foies .....	176
b)	Étude histologique par la coloration Hématoxyline / Éosine .....	178
c)	Marquage du foie à la DHE.....	182
	Discussion <i>in vitro</i> .....	186
	Discussion <i>in vivo</i> .....	193
	Conclusions.....	204
	Perspectives.....	206
	Bibliographie.....	208
	Communications .....	242
	Valorisation des compétences, « un Nouveau Chapitre de la thèse ».....	244

## Liste des abréviations

4-HNE	4-hydroxynonenal
ADO	Anti diabétiques oraux
ADP	Adénosine di-phosphate
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AEC	3-amino-9-éthyl-carbazole
AGEs	Advanced Glycation End products
AGNE	Acide gras non estérifié
ALAT	Alanine-Amino Transférase
AMPc	Adénosine mono-phosphate cyclique
AOC	Appellation d'origine contrôlée
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASAT	Aspartate amino transférase
ATBC	Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer
ATP	Adénosine tri-phosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
BB	Bio Breeding
BER	Base Excision Repair
BSA	Bovine Serum Albumin
CARET	$\beta$ -Carotene and Retinol Efficacy Trial
CAT	Catalase
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COX	Cyclo-oxygénase
CPA	Cellule présentatrice de l'antigène
Cu	Cuivre
DAG	Diacylglycérol
DAISY	Diabetes Autoimmunity Study in the Young
DID	Diabète insulino-dépendant
DMF	Diméthylformamide
DMLA	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
DNase	Désoxyribonucléase

DNID	Diabète non insulino-dépendant
DPP-4	Dipeptidyl peptidase-4
EGCG	Épigallocatechine gallate
Fe	Fer
G6P	Glucose 6 phosphate
GABA	$\gamma$ -amino butyrique acid
GAD	Glutamic acid decarboxylase
GK	Goto-Kakizaki
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
GLUT 4/2	Glucose transporter
GMPc	Guanosine mono-phosphate cyclique
Gpx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GRPP	Polypeptide lié à la glicentine
GSH	Glutathion (forme réduite)
GSSG	Glutathion (forme oxydée)
HIT-T15	Hamster insulinoma T15
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HX	Hypoxanthine
IA-2	Islet Antigen 2
IAA	Insulin Auto-Antibody
IDF	International Diabetes Federation
IFN $\gamma$	Interféron $\gamma$
IKK $\beta$	I $\kappa$ B kinase $\beta$
IL-1 $\beta$	Interleukine 1 $\beta$
IL-2	Interleukine 2
IMC	Indice de masse corporelle
iNOS	Inductible NOS
ip	intra-péritonéal
IP	Intermediate Peptides
IRS	Insulin receptor substrate
iv	intra-veineux
K $^+$	Potassium
kb	kilo base
kDa	kilo Dalton

LDL	Low Density Lipoprotein
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDA	Malondialdéhyde
MIN-6	Mouse insulinoma
Mn	Manganèse
MPFG	Fragment proglucagon majeur
MPO	Myéloperoxidase
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme oxydée)
NADPH, H <sup>+</sup>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
NADPH oxydase	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase
NASH	Non alcoholic steatosis hepatitis
NER	Nucleotide excision repair
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	Nitric oxyde
NOD	Non Obese Diabetic
NOS	Nitric oxide synthase
NS	Non significatif
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PB2	Procyanidine B2
PBS	Phosphate-buffered saline
PFA	Paraformaldéhyde
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PN	Polynucléaire neutrophile
PP	Poly Peptides
PPARγ	Peroxisome proliferator-activated receptor γ
RAGE	Receptor of advanced glycation end products
Rc	Resvératrol <i>cis</i>
RCS	Reactive chlorine species
RE	Réticulum endoplasmique
RINm5F	Rat insulinoma m5F
RNase	Ribonucléase

RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
Rt	Resvératrol <i>trans</i>
Se	Sélénium
SOD	Superoxyde dismutase
STZ	Streptozotocine
SU.VI.MAX	SUplémentation en VIamines et Minéraux Anti-oXydants
TBA	Thio barbituric acid
TBARS	Thio Barbituric Acid Reactive Substances
TCA	Trichloroacétique acid
TCR	T cell receptor
TMB	3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
Tyr	Tyrosine
UI	Unité internationale
UV	Ultraviolet
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
XO	Xanthine oxydase
Zn	Zinc

## Liste des figures

Figure 1 : Représentation d'Haworth du D-glucose.....	22
Figure 2 : Anatomie du pancréas.....	23
Figure 3 : Distribution des différents types cellulaires dans un îlot de Langerhans (Cabrera <i>et al.</i> , 2006).....	24
Figure 4 : Structure primaire du glucagon (D'après G. Dolisi).....	24
Figure 5 : Structure du proglucagon et synthèse des différents peptides dans les cellules $\alpha$ (D'après Taylor et Francis group, 2010).....	25
Figure 6 : Mécanisme de sécrétion du glucagon de la cellule $\alpha$ (source personnelle).....	25
Figure 7 : Voie de signalisation du glucagon dans la cellule hépatique (D'après Jaspard E, 2008).....	26
Figure 8 : Structure primaire de l'insuline (D'après G. Dolisi).....	27
Figure 9 : Transcription et traduction de l'insuline (Raynal et Cortie, ouvrage « Le diabète de type 2: aspect fondamentaux »).....	27
Figure 10 : Mécanisme de libération de l'insuline de la cellule $\beta$ (source personnelle).....	28
Figure 11 : Transduction du signal par l'insuline (source personnelle, d'après Voet & Voet, Edition de Boeck, 2005).....	29
Figure 12 : Prévalence du diabète traité par département en 2007 (régime général de l'assurance maladie française ; Kusnik-Joinville <i>et al.</i> , données INVS 2008).....	30
Figure 13 : Mécanisme de destruction auto-immune de la cellule $\beta$ dans le diabète de type 1 (modifié d'après Pirot <i>et al.</i> , 2008).....	33
Figure 14 : Hyperinsulinisme et diabète de type 2 (données personnelles).....	34
Figure 15 : Facteurs contribuant à l'apoptose des cellules $\beta$ (Source personnelle).....	37
Figure 16 : Les complications cardiovasculaires liées au diabète (Dossier Santé Diabète de type 2, GSK, 2009).....	39
Figure 17 : Théorie du double hit pour le développement des NAFLD (Buqué <i>et al.</i> , 2008).....	42
Figure 18 : Exemple de stéatose micro et macrovésiculaire (D'après le Dr Antonini, CHB- Hôpital Paul Brousse).....	42
Figure 19 : Etapes métabolique conduisant à la formation de la stéatose hépatique (Robichon <i>et al.</i> , 2008).....	43
Figure 20 : Caractéristiques des différentes classes d'analogues de l'insuline (liste non exhaustive).....	44
Figure 21 : Schéma basal/bolus physiologique de l'insuline.....	45
Figure 22 : Sites d'injections préférentiels d'insuline ou analogues de l'insuline (Source : "Mon guide de l'injection" BD, 2009).....	45
Figure 23 : Photographie d'une pompe à insuline externe, reliée à un cathéter sous-cutané.....	46
Figure 24 : Photographie d'une pompe à insuline implantable.....	47
Figure 25 : Dispositif du pancréas artificiel implanté.....	47
Figure 26 : Dispositif du pancréas artificiel à pompe externe.....	47
Figure 27 : Chaîne respiratoire de la mitochondrie.....	51
Figure 28 : Schéma récapitulatif des sources des ROS, des enzymes impliquées dans la défense antioxydantes et des cibles biologiques (source personnelle).....	52
Figure 29 : Réaction de Fenton.....	53
Figure 30 : Schéma de peroxydation lipidique (D'après Douste-Blazy and Mendy, 1988).....	55
Figure 31 : Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires (d'après Favier, 2003).....	57
Figure 32 : Représentation selon la projection de Fischer du glucose et de sa forme $\beta$ -D-glucopyranose (Thornalley <i>et al.</i> , 1999).....	60

Figure 33 : Voie des polyols et autres voies du catabolisme du glucose (Thèse de C. Januel, 2003).	61
Figure 34 : Conséquences de l'activation de la PKC induite par l'hyperglycémie (Brownlee, 2005).	62
Figure 35 : Formation des AGEs par la voie de Maillard (Thèse de C. Januel, 2003).	63
Figure 36 : Représentation schématique de la NADPH de type phagocytaire sous forme active (Ray and Shah, 2005).	65
Figure 37 : Effet du stress oxydant sur l'insulino-sécrétion.	66
Figure 38 : Mécanisme de résistance à l'insuline induite par les ROS (source personnelle, d'après Voet & Voet, Edition de Boeck, 2005).	67
Figure 39 : Déséquilibre entre les molécules pro-oxydantes et les systèmes de défenses antioxydantes lors du stress oxydant (source personnelle).	68
Figure 40 : Pyramide des systèmes de défenses antioxydants (source personnelle).	68
Figure 41 : Formule semi-développée du glutathion réduit (GSH).	71
Figure 42 : Structure chimique de l'alpha-tocophérol ou vitamine E (d'après Flora <i>et al.</i> , 2008).	71
Figure 43 : Structure l'acide L-ascorbique (d'après Flora <i>et al.</i> , 2008).	71
Figure 44 : Structure du $\beta$ -carotène (d'après Flora <i>et al.</i> , 2008).	72
Figure 45 : Tableau des principaux flavonoïdes (Garcia-Lafuente <i>et al.</i> , 2009).	73
Figure 46 : Tableau récapitulatif mais non exhaustif des aliments les plus riches en antioxydants (Wu <i>et al.</i> , 2004).	75
Figure 47 : Les différentes de polyphénols.	79
Figure 48 : Illustration du French Paradox (Olivier Danchin, 2000).	80
Figure 49 : Formule du resvératrol <i>trans</i> ou <i>trans</i> -3, 4', 5' trihydroxystilbène (Orallo <i>et al.</i> , 2002).	81
Figure 50 : Formule du resvératrol <i>cis</i> .	81
Figure 51 : Formule de la procyanidine B2 ou épicatechine-(4 $\beta$ -8)-épicatechine (Li and Jiang, 2007).	82
Figure 52 : Les catéchines du thé (Higdon and Frei, 2003).	84
Figure 53 : Capacité antioxydante de l'EGCG Teavigo® (DSM Nutritional Product).	85
Figure 54 : Chromatogramme des composants du thé vert et du thé noir (Stewart <i>et al.</i> , 2005).	86
Figure 55 : Effet de l'exercice contre un stress sédentaire (adapté de Radak <i>et al.</i> , 2000).	88
Figure 56 : Analyses des résultats par le logiciel Cytosoft 5.3.	94
Figure 57 : Plan de plaque des gènes « Rat oxidative stress and antioxydant defense » (PARN065A, SABiosciences)	96
Figure 58 : Etude de deux solutions de Teavigo par HPLC.	100
Figure 59 : Nage des rats en piscine (source personnelle).	101
Figure 60 : Viabilité en % des cellules RINm5F en présence de quantités croissantes de peroxyde d'hydrogène pendant 30 minutes.	111
Figure 61 Viabilité en % des cellules RINm5F en présence de quantités croissantes de streptozotocine (STZ) pendant deux heures.	112
Figure 62 : Viabilité en % des cellules RINm5F en présence de quantités croissantes d'un mélange d'hypoxanthine (HX) et de xanthine oxydase (XO) pendant une heure.	112
Figure 63 : Viabilité des cellules RINm5F en % après une incubation d'une heure en présence d'extrait de polyphénols de vin rouge.	113
Figure 64 : Viabilité des cellules RINm5F en % après une incubation d'une heure en présence de resvératrol <i>trans</i> .	113
Figure 65 : Viabilité des cellules RINm5F en % après une incubation d'une heure en présence de resvératrol <i>cis</i> .	114
Figure 66 : Viabilité des cellules RINm5F en % après une incubation d'une heure en présence de l'EGCG.	114
Figure 67 : Viabilité des cellules RINm5F en % après une incubation d'une heure en présence de procyanidine B2.	115

Figure 68 : Viabilité des RINm5F en % en présence des molécules antioxydantes pré-incubées une heure avant l'induction d'un stress oxydant par 40µmol/L de peroxyde d'hydrogène. ....	116
Figure 69 : Viabilité des RINm5F en % en présence des molécules antioxydantes pré-incubées une heure avant l'induction d'un stress oxydant par 25mmol/L de STZ, pendant 2 heures. ....	116
Figure 70 : Viabilité des RINm5F en % en présence des molécules antioxydantes pré-incubées une heure avant l'induction d'un stress oxydant par 0,25mmol/L d'HX et 10mU/mL de XO, pendant une heure. ....	117
Figure 71 : Quantification de l'apoptose des cellules RINm5F en % en présence de peroxyde d'hydrogène pendant une heure et de cinnamaldéhyde oxydé pendant 24 heures. ....	118
Figure 72 : Quantification de l'apoptose en % par l'activation des caspase 8 et 9 de cellules RINm5F soumises à des concentrations de peroxyde d'hydrogène pendant 30 minutes. ....	119
Figure 73 : Quantification de l'apoptose en % par l'activation des caspase 8 et 9 de cellules RINm5F soumises à un stress par le peroxyde d'hydrogène, en présence ou non d'antioxydants pré-incubés pendant une heure. ....	120
Figure 74 : Clustergramme de l'expression des gènes du stress oxydant. ....	121
Figure 75 : Expression différentielle des gènes entre les groupes témoin et soumis à un stress oxydant par H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	122
Figure 76 : Expression des enzymes antioxydantes CAT et SOD en % rapportée à celle de la β-actine, dans les cellules RINm5F en présence d'un stress induit par 40µmol/L d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et en présence ou non d'antioxydants. ....	123
Figure 77 : Expression des enzymes antioxydantes CAT et SOD en % rapportée à celle de la β-actine, dans les cellules RINm5F en présence d'un stress induit par 25mmol/L de STZ et en présence ou non d'antioxydants. ....	124
Figure 78 : Expression des enzymes antioxydantes CAT et SOD en % rapportée à celle de la β-actine, dans les cellules RINm5F en présence d'un stress induit par un couple HX/XO et en présence ou non d'antioxydants. ....	125
Figure 79 : Quantification de la production d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> intracellulaire par analyse du pourcentage de cellules marquées à la DCF, en présence d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 40µmol/L pendant 30 minutes, et/ou d'antioxydants pendant une heure. ....	125
Figure 80 : Quantification de la production d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> intracellulaire par analyse du pourcentage de cellules marquées à la DCF, en présence de STZ 25mmol/L pendant 2 heures, et/ou d'antioxydants pendant une heure. ....	126
Figure 81 : Quantification de la production d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> intracellulaire par analyse du pourcentage de cellules marquées à la DCF, en présence d'HX/XO pendant une heure, et/ou d'antioxydants pré-incubés une heure. ....	127
Figure 82 : Peroxydation lipidique par mesure du MDA en µmol/L sur des cellules RINm5F en présence d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 40µmol/L et/ou d'antioxydants. ....	127
Figure 83 : Peroxydation lipidique par mesure du MDA en µmol/L sur des cellules RINm5F en présence de STZ à 25mmol/L pendant deux heures, et/ou d'antioxydants pendant une heure. ....	128
Figure 84 : Peroxydation lipidique par mesure du MDA en µmol/L sur les cellules RINm5F en présence de 0,25mmol/L d'HX et de 10mU/mL de XO pendant une heure, et/ou d'antioxydants pré-incubés pendant 1 heure. ....	129
Figure 85 : Protéines carbonylées en nmol/mg de protéines totales dans les cellules RINm5F en présence d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 40µmol/L pendant 30 minutes et/ou d'antioxydants pré-incubés pendant 1 heure. ....	129
Figure 86 : Protéines carbonylées en nmol/mg de protéines totales dans les cellules RINm5F en présence de 25mmol/L de STZ pendant 2 heures et/ou d'antioxydants pré-incubés pendant 1 heure. ....	130
Figure 87 : Protéines carbonylées en nmol/mg de protéines totales dans les cellules RINm5F en présence de 0,25mmol/L d'HX associés à 10mU/mL pendant 1 heure et/ou d'antioxydants pré-incubés pendant 1 heure. ....	131



Figure 88 : Glycémie plasmatique en g/L des rats nourris par l'alimentation normocalorique pendant 0, 2, 4 et 7 mois. ....	131
Figure 89 : Glycémie plasmatique en g/L des rats nourris par l'alimentation hypercalorique pendant 0, 2, 4 et 7 mois. ....	132
Figure 90 : Glycémie plasmatique en g/L des rats nourris par les alimentations normocalorique ou hypercalorique pendant 0, 2, 4 et 7 mois. ....	132
Figure 91 : Mesure du taux de C-peptide plasmatique chez des animaux ND et HFD après deux mois de régimes, en condition à jeun et post-prandiale 30 minutes. ....	133
Figure 92 : Mesure du taux de C-peptide plasmatique chez des animaux après 7 mois de régimes ND ou HFD, en condition à jeun ou post-prandiale. ....	134
Figure 93 : Mesure de la masse des rats nourris par l'alimentation normocalorique ou hypercalorique, tout les mois, pendant 7 mois.....	135
Figure 94 : Photographies de coupes histologiques de pancréas de rats après coloration HE.....	136
Figure 95 : Mesure de la taille des îlots de Langerhans, après deux mois de régime ND ou HFD. ....	137
Figure 96 : Mesure de la surface des îlots de Langerhans, après sept mois de régime ND ou HFD. ....	137
Figure 97 : Photographies de coupes histologiques de pancréas de rats après coloration au trichrome de Masson. ....	138
Figure 98 : Photographies de coupes histologiques de foie de rats après coloration HE. ....	140
Figure 99 : Photographies de coupes histologiques de foie de rats après coloration au trichrome de Masson. ....	141
Figure 100 : Taux de lipides peroxydés plasmatique en $\mu\text{mol/L/mg}$ de protéines chez les rat ND et HFD après 2 mois de régime alimentaire, mesuré par la technique TBARS.....	142
Figure 101 : Taux de lipides peroxydés plasmatique en $\mu\text{mol/L/mg}$ de protéines chez les rat ND et HFD après 3 mois de régime alimentaire et 1 mois de traitement antioxydant ou d'exercice, mesuré par la technique TBARS. ....	143
Figure 102 : Taux de lipides peroxydés plasmatique en $\mu\text{mol/L/mg}$ de protéines chez les rat ND et HFD après 4 mois de régime alimentaire et 2 mois de traitement antioxydant ou d'exercice, mesuré par la technique TBARS. ....	144
Figure 103 : Taux de lipides peroxydés plasmatique en $\mu\text{mol/L/mg}$ de protéines chez les rat ND et HFD après 5 mois de régime alimentaire et 3 mois de traitement antioxydant ou d'exercice, mesuré par la technique TBARS. ....	144
Figure 104 : Taux de protéines carbonylées en nmol/mg de protéines totales, dans le plasma de rats soumis pendant 2 mois aux régimes ND ou HFD.....	145
Figure 105 : Taux de protéines carbonylées en nmol/mg de protéines totales, dans le plasma de rats soumis pendant 3 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 1 mois aux antioxydants ou à l'exercice. ....	145
Figure 106 : Taux de protéines carbonylées en nmol/mg de protéines totales, dans le plasma de rats soumis pendant 4 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 2 mois aux antioxydants ou à l'exercice. ....	146
Figure 107 : Taux de protéines carbonylées en nmol/mg de protéines totales, dans le plasma de rats soumis pendant 5 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 3 mois aux antioxydants ou à l'exercice. ....	147
Figure 108 : Graphique présentant la masse moyenne en grammes des rats nourris par l'alimentation ND ou HFD pendant deux mois.....	148
Figure 109 : Graphique présentant la masse moyenne en grammes des rats nourris par l'alimentation normocalorique (ND) entre deux et 5 mois de traitement antioxydant ou d'exercice physique. ....	149
Figure 110 : Tableau présentant les résultats du t-test pour chacun des groupes ND versus ND solvant, avec le nombre n d'animaux de chacun des groupes, entre 67 et 158 jours d'étude.....	149
Figure 111 : Graphique présentant la masse moyenne en grammes des rats nourris par l'alimentation hypercalorique (HFD) entre deux et 5 mois de traitement antioxydant ou d'exercice physique.....	150

Figure 112 : Tableau présentant les résultats du t-test pour chacun des groupes HFD versus HFD solvant, avec le nombre n d'animaux de chacun des groupes, entre 67 et 158 jours d'étude.....	150
Figure 113 : Résultats du t-test entre les groupes ND solvant versus HFD solvant, avec le nombre n d'animaux de chacun des groupes, entre 67 et 158 jours d'étude.....	151
Figure 114 : Glycémie des rats en g/L après 2 mois de régime ND ou HFD. ....	151
Figure 115 : Glycémie plasmatique en g/L de rats soumis à un régime ND ou HFD pendant 4 mois, et pendant 2 mois aux antioxydant et à l'exercice. ....	152
Figure 116 : Taux de C-peptide plasmatique en pmol/L chez les rats ND et HFD après 2 mois de régime alimentaire.....	153
Figure 117 : Taux de C-peptide plasmatique en pmol/L chez les rats soumis pendant 3 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 1 mois aux antioxydants ou à l'exercice. ....	153
Figure 118 : Taux de C-peptide plasmatique en pmol/L chez les rats soumis pendant 4 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 2 mois aux antioxydants ou à l'exercice. ....	154
Figure 119 : Taux de C-peptide plasmatique en pmol/L chez les rats soumis pendant 5 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 3 mois aux antioxydants ou à l'exercice. ....	155
Figure 120 : Taux de pro-insuline plasmatique en pmol/L chez les rats ND et HFD après 2 mois de régime alimentaire.....	155
Figure 121 : Taux de pro-insuline plasmatique en pmol/L chez les rats soumis pendant 3 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 1 mois aux antioxydants ou à l'exercice. ....	156
Figure 122 : Taux de pro-insuline plasmatique en pmol/L chez les rats soumis pendant 4 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 2 mois aux antioxydants ou à l'exercice. ....	156
Figure 123 : Taux de pro-insuline plasmatique en pmol/L chez les rats soumis pendant 5 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 3 mois aux antioxydants ou à l'exercice. ....	157
Figure 124 : Photographies d'îlots pancréatiques de rats avant l'administration des régimes. ....	157
Figure 125 : Photographies de coupes histologiques colorées à la HE de tissu pancréatique de rats soumis aux régimes pendant 2 mois. ....	158
Figure 126 : Photographies de coupes histologiques colorées à la HE de tissu pancréatique de rats soumis pendant 3 mois aux régimes et pendant 1 mois aux antioxydants ou à l'exercice. ....	158
Figure 127 : Photographies de coupes histologiques colorées à la HE de tissu pancréatique de rats soumis pendant 4 mois aux régimes et pendant 2 mois aux antioxydants ou à l'exercice ....	159
Figure 128 : Photographies de coupes histologiques colorées à la HE de tissu pancréatique de rats soumis pendant 5 mois aux régimes et pendant 3 mois aux antioxydants ou à l'exercice ....	159
Figure 129 : Pourcentage d'îlots en fonction de leur taille, avant l'administration des régimes (n=3) .....	160
Figure 130 : Pourcentage d'îlots en fonction de leur taille, après deux mois de régime ND ou HFD. ....	160
Figure 131 : Pourcentage d'îlots en fonction de leur taille, après trois mois de régime ND ou HFD et un mois de traitement antioxydant ou d'activité physique. ....	161
Figure 132 : Pourcentage d'îlots en fonction de leur taille, après quatre mois de régimes ND ou HFD et deux mois de suppléments en antioxydants ou en exercice physique.....	162
Figure 133 : Pourcentage d'îlots en fonction de leur taille, après cinq mois de régime ND ou HFD et trois mois de traitement antioxydant ou d'activité physique. ....	163
Figure 134 : Photographie d'immunohistologie d'une coupe de pancréas marquée à l'insuline, de rat avant l'administration des régimes. ....	163
Figure 135 : Photographies d'immunohistologie de coupes de pancréas marquées à l'insuline, de rats nourris par alimentation ND ou HFD pendant 2 mois. ....	164
Figure 136 : Photographies d'immunohistologie de coupes de pancréas marquées à l'insuline, de rats nourris par alimentation ND ou HFD pendant 3 mois et traités par des antioxydants ou l'exercice pendant un mois. ....	164
Figure 137 : Photographies d'immunohistologie de coupes de pancréas marquées à l'insuline, de rats nourris par alimentation ND ou HFD pendant 4 mois et traités par des antioxydants ou l'exercice pendant 2 mois. ....	165

Figure 138 : Photographies d'immunohistologie de coupes de pancréas marquées à l'insuline, de rats nourris par alimentation ND ou HFD pendant 5 mois et traités par des antioxydants ou l'exercice pendant 3 mois. ....	165
Figure 139 : Quantification de la sonde DHE en % sur des coupes de pancréas de rats ND (A) ou HFD (B), après 2 mois de régime alimentaire. ....	166
Figure 140 : Quantification de la sonde DHE en % sur des coupes de pancréas de rats nourris par alimentation ND ou HFD pendant 3 mois et traités par les antioxydants ou l'exercice, pendant 1 mois. ....	167
Figure 141 : Quantification de la sonde DHE en % sur des coupes de pancréas de rats nourris par alimentation ND ou HFD pendant 4 mois et traités par les antioxydants ou l'exercice, pendant 2 mois. ....	168
Figure 142 : Quantification de la sonde DHE en % sur des coupes de pancréas de rats nourris par alimentation ND ou HFD pendant 5 mois et traités par les antioxydants ou l'exercice, pendant 3 mois. ....	169
Figure 143 : Taux de triglycérides plasmatiques en mmol/L, chez des rats nourris par une alimentation ND et HFD pendant 2 mois. ....	170
Figure 144 : Taux de triglycérides plasmatiques en mmol/L, chez des rats soumis pendant 3 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 1 mois aux antioxydants ou à l'exercice. ....	170
Figure 145 : Taux de triglycérides plasmatique en mmol/L, chez des rats soumis pendant 4 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 2 mois aux antioxydants ou à l'exercice. ....	171
Figure 146 : Taux de triglycérides plasmatique en mmol/L, chez des rats soumis pendant 5 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 3 mois aux antioxydants ou à l'exercice. ....	171
Figure 147 : Taux de CRP plasmatique en µg/mL, de rats soumis à un régime ND ou HFD pendant 2 mois. ....	172
Figure 148 : Taux de CRP plasmatique en µg/mL, de rats soumis pendant 3 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 1 mois aux antioxydants ou à l'exercice. ....	173
Figure 149 : Taux de CRP plasmatique en µg/mL, de rats soumis pendant 4 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 2 mois aux antioxydants ou à l'exercice. ....	173
Figure 150 : Taux de CRP plasmatique en µg/mL, de rats soumis pendant 5 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 3 mois aux antioxydants ou à l'exercice. ....	174
Figure 151 : Photographies d'aortes colorées au rouge Sudan IV, de rats nourris pendant 2 mois par les régimes ND ou HFD. ....	175
Figure 152 : Photographies d'aortes colorées au rouge Sudan IV, de rats nourris pendant 5 mois par les régimes ND (gauche) ou HFD (droite). ....	175
Figure 153 : Masse du foie total rapportée à la masse des rats soumis à un régime ND ou HFD pendant 2 mois. ....	176
Figure 154 : Masse du foie total rapportée à la masse des rats soumis à un régime ND ou HFD pendant 3 mois et à un traitement par des antioxydants ou la pratique d'un exercice physique pendant un mois. ....	176
Figure 155 : Masse du foie total rapportée à la masse des rats soumis à un régime ND ou HFD pendant 4 mois et à un traitement par des antioxydants ou la pratique d'un exercice physique pendant 2 mois. ....	177
Figure 156 : Masse du foie total rapportée à la masse des rats soumis à un régime ND ou HFD pendant 5 mois et à un traitement par des antioxydants ou la pratique d'un exercice physique pendant 3 mois. ....	177
Figure 157 : Photographies de coupes histologiques du foie de rats avant l'administration des régimes. ....	178
Figure 158 : Photographies de coupes histologiques de foie de rats colorées à la HE soumis aux régimes ND ou HFD pendant 2 mois. ....	178
Figure 159 : Photographies de coupes de foie de rats colorées à la HE et nourris par alimentation ND ou HFD pendant 3 mois et ayant reçu des antioxydants ou pratiquant une activité physique pendant un mois. ....	179

Figure 160 : Photographies de coupes de foie de rats colorées à la HE et nourris par alimentation ND ou HFD pendant 4 mois et ayant reçu des antioxydants ou pratiquant une activité physique pendant 2 mois. ....	180
Figure 161 : Photographies de coupes de foie de rats colorées à la HE et nourris par alimentation ND ou HFD pendant 5 mois et ayant reçu des antioxydants ou pratiquant une activité physique pendant 3 mois. ....	180
Figure 162 : Scores de stéatose hépatique obtenus chez les rats au cours de l'étude.....	181
Figure 163 : Quantification de la sonde DHE en % sur des coupes de foie de rats nourris par alimentation ND (A) ou HFD (B) pendant 2 mois.....	182
Figure 164 : Quantification de la sonde DHE en % sur des coupes de foie de rats nourris par alimentation ND ou HFD pendant 3 mois et traités par les antioxydants ou l'exercice, pendant 1 mois.....	183
Figure 165 : Quantification de la sonde DHE en % sur des coupes de foie de rats nourris par alimentation ND ou HFD pendant 4 mois et traités par les antioxydants ou l'exercice, pendant 2 mois.....	184
Figure 166 : Quantification de la sonde DHE en % sur des coupes de foie de rats nourris par alimentation ND ou HFD pendant 5 mois et traités par les antioxydants ou l'exercice, pendant 3 mois.....	185
Figure 167 : Tableau récapitulatif de l'expression des enzymes CAT et SOD (Mn) dans les trois conditions et/ou en présence d'antioxydants. ....	191
Figure 168 : Récapitulatif des caractéristiques d'un modèle de rat diabétique de type 2, présentant un stress oxydant et une stéatose hépatique, développé au laboratoire. ....	194
Figure 169 : Récapitulatif de l'effet du régime sur l'apparition du stress oxydant chez le rat (A) et les effets des antioxydants et de l'exercice sur le modèle de rat HFD (B). ....	196
Figure 170 : Récapitulatif de l'effet du régime sur les complications métaboliques chez le rat (A) et les effets des antioxydants et de l'exercice sur le modèle de rat HFD (B). ....	200
Figure 171 : Récapitulatif de l'effet du régime sur les complications hépatiques chez le rat (A) et les effets des antioxydants et de l'exercice sur le modèle de rat HFD (B). ....	202

## SITUATION DU PROJET DE RECHERCHE

Le diabète est une maladie considérée par l'OMS comme une épidémie et dont la prévalence a augmenté de façon très importante au cours de ces dernières années. Actuellement, près de 285 millions de personnes dans le monde sont atteintes de diabète, dont plus de 3 millions pour la France. Selon la Fédération Internationale du Diabète (FID), si le taux de croissance actuel se poursuit, le nombre total de diabétiques dépassera les 435 millions d'ici 2030, soit une augmentation de 54%. En plus de ces chiffres alarmants, il faut tenir compte des personnes qui ignorent qu'elles sont diabétiques car le développement de la pathologie est silencieux et sournois. Le diabète est une maladie potentiellement mortelle responsable chaque année dans le monde de près de 4 millions de décès. De plus, un mauvais équilibre du diabète est responsable de l'apparition de complications cardiovasculaires par altération des vaisseaux sanguins, et représente :

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

De nombreuses études suggèrent que le diabète s'accompagne d'un stress oxydant qui favorise le développement de la maladie en perturbant l'insulino-sécrétion, en favorisant l'insulino-résistance et les complications cardiovasculaires qui y sont associées. Ce stress oxydant est dû à une rupture de l'équilibre physiologique qui existe dans l'organisme entre les molécules oxydantes et les systèmes de défenses antioxydants. En plus des défenses antioxydantes présentes dans l'organisme, l'alimentation apporte de nombreux antioxydants notamment par les vitamines et les oligo-éléments. Ainsi, une rupture de l'équilibre alimentaire (défaillance nutritionnelle, carence, alimentation trop riche) entraîne le développement du stress oxydant par diminution des systèmes de défense.

Le développement du diabète et du stress oxydant est étroitement lié à la qualité de vie et aux modes alimentaires. En effet, dans nos sociétés modernes, la qualité de vie et de travail est augmentée sans pour autant que l'hygiène de vie ne s'améliore. Notre mode de vie devient de plus en plus sédentaire et les gestes du quotidien sont assistés pour diminuer l'effort. Ainsi en un demi-siècle, les besoins énergétiques journaliers sont passés de 3000 kcal à 2200 kcal (d'après le Bulletin Académique National de Chirurgie Dentaire, 2007). De plus, l'alimentation classique est devenue plus riche en protéines, en graisses, en sucres (sodas) et pauvres en fruits et légumes. La consommation moyenne de nourriture, en termes de calories, augmente de plus en plus dans le monde, particulièrement dans les pays en voie de développement. Ainsi, une véritable épidémie

d'obésité apparaît chez les enfants et les adolescents. Cette situation inquiète de plus en plus les scientifiques et elle pourrait s'aggraver si les industriels et les pouvoirs publics ne s'engagent pas dès maintenant dans des programmes de prévention multifactorielle (Bulletin Académique National de Chirurgie Dentaire, 2007).

En réponse aux problèmes liés à l'alimentation, l'Etat français a instauré des programmes de nutrition, comme le Programme National Nutrition Santé (PNNS), dont l'un des objectifs prioritaires était d'augmenter la consommation de fruits et légumes à au moins cinq par jour. L'alimentation et notamment les fruits et légumes renferment des antioxydants et certains d'entre eux sont connus pour avoir un fort pouvoir antioxydant, comme par exemple, les baies rouges et noires, les pruneaux, le raisin, la tomate, les épinards et brocolis...etc. Ce pouvoir antioxydant des aliments est intéressant dans des études de prévention du stress oxydant associé aux maladies. Dans le cas du diabète, des études ont montré effectivement qu'une supplémentation en antioxydants naturels comme le cacao qui renferme des flavonoïdes améliorerait la sensibilité à l'insuline (Grassi *et al.*, 2005).

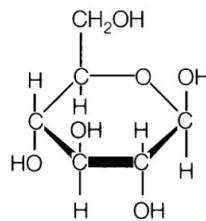
L'objectif de ce travail est de développer de nouveaux outils thérapeutiques et préventifs basés sur la supplémentation par des antioxydants d'origine alimentaire pour prévenir le stress oxydant dans la pathologie diabétique.

# INTRODUCTION

## I. Le diabète

### A. Métabolisme et contrôle de la glycémie

Tous les organes ont besoin de sucre pour fonctionner et le cerveau en est le plus gros consommateur (environ 100g par jour). Le glucose (cf. figure 1) est une des principales sources énergétiques métaboliques et est dégradé dans le cycle de la glycolyse pour générer une molécule de pyruvate et de l'énergie sous forme d'ATP. Les sources de glucose sont majoritairement exogène (origine alimentaire) mais aussi endogène.



**Figure 1** : Représentation d'Haworth du D-glucose.

#### 1. Maintien de la glycémie

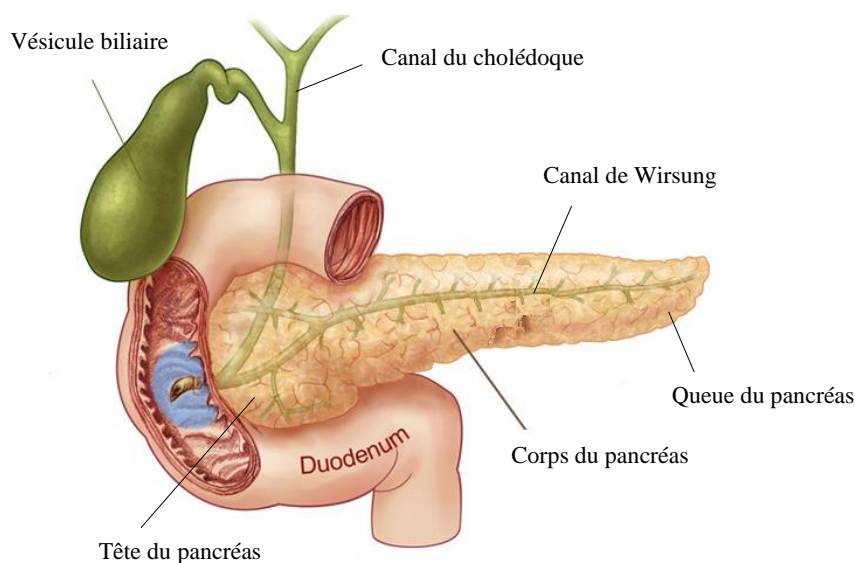
Une des fonctions importantes de l'organisme est de réguler la glycémie à environ 1g/L soit 5mmol/L. Lorsque la glycémie est supérieure à 1g/L, suite à un repas, une hormone hypoglycémisante, l'insuline, synthétisée par le pancréas est activée et permet au glucose de rentrer directement dans les cellules par des transporteurs spécifiques ou d'être stocké sous forme d'unités répétées de glucose, le glycogène, par glycogénogenèse.

En revanche, lorsque la glycémie est trop basse (inférieure à 1g/L), notamment après un effort, une hormone hyperglycémisante, le glucagon, synthétisée également par le pancréas, va permettre de déstocker les réserves de glycogène, situées dans le foie et le muscle, par glycogénolyse. Lors des hypoglycémies, ce sont notamment les réserves du foie qui sont sollicitées : le glycogène est dégradé en glucose-6-phosphate (G6P) puis en glucose et celui-ci est libéré dans la circulation sanguine.

#### 2. Le pancréas – les îlots de Langerhans

Les hormones antagonistes, insuline et glucagon, sont synthétisées par le pancréas. Cet organe participe à la régulation de nombreuses fonctions biologiques. Situé en avant de l'aorte, de la veine cave et des veines rénales mais en arrière de l'estomac et du côlon transverse, il s'étend transversalement du duodénum à la rate. Le pancréas est constitué de quatre parties : la tête, l'isthme, le corps et la queue. Il est vascularisé notamment par les veines splénique et mésentérique

inférieure. Le pancréas est un organe particulier. Il s'agit d'une glande mixte à la fois exocrine et endocrine (cf. figure 2). En effet, il participe à la digestion du bol alimentaire par déversement des sucs pancréatiques, mais il sécrète aussi des hormones, comme l'insuline et le glucagon.



**Figure 2 : Anatomie du pancréas.**

#### a) La fonction exocrine

La partie exocrine du pancréas représente 98% du pancréas total. Elle est constituée de canaux qui sécrètent un fluide riche en bicarbonates et d'amas de cellules glandulaires pyramidales, appelés acini. Ceux-ci contiennent des grains de zymogène (granules) renfermant des enzymes pancréatiques inactives (trypsinogène) qui seront sécrétées par exocytose dans le duodénum, par le canal de Wirsung. Le trypsinogène est l'enzyme qui va permettre d'activer des enzymes protéolytiques comme la trypsine, la chymotrypsine, la carboxypeptidase, des phospholipases (A2...), des saccharases ( $\alpha$ -amylase) mais aussi des nucléases (RNase et DNase). Les sécrétions pancréatiques sont alcalines (pH compris entre 7,5 et 8,2) et permettent de terminer la digestion.

#### b) La fonction endocrine

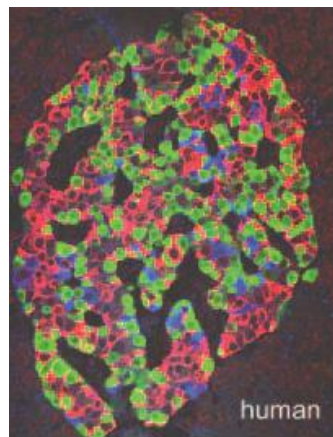
Comme toutes les glandes endocrines, le pancréas synthétise des hormones qui sont libérées dans la circulation sanguine où elles vont agir à distance vers des tissus ou des cellules cibles (action paracrine). La partie endocrine ne représente que 1 à 2% du tissu pancréatique et est constituée d'amas dispersés, les îlots de Langerhans. Dans un pancréas humain sain, il y a environ 1 million d'îlots dont la taille varie de 100 à 500 $\mu$ m contenant chacun entre 1000 et 3000 cellules (Quesada *et al.*, 2008). Les îlots contiennent quatre types de cellules sécrétant chacune une hormone polypeptidique caractéristique :

- l'insuline (hormone hypoglycémisante), synthétisée par les cellules  $\beta$  pancréatiques,



- le glucagon (hormone hyperglycémiant), sécrété par les cellules  $\alpha$ ,
- la somatostatine, produite dans les cellules  $\delta$ , qui exerce un effet inhibiteur sur la sécrétion de l'insuline et du glucagon,
- le polypeptide pancréatique synthétisé dans les cellules PP.

La proportion de ces types cellulaires est variable : les cellules  $\beta$  représentent environ 60% de la masse pancréatique totale, tandis que les cellules  $\alpha$  représentent 20%. Les cellules delta et PP, quant à elles, sont très minoritaires et correspondent chacune à 5% de la masse totale du pancréas. Leurs distributions au sein de l'îlot est aléatoire (cf. figure 3).



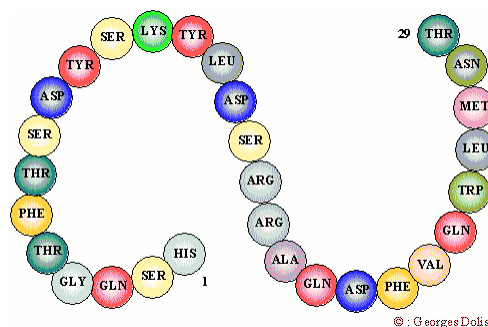
**Figure 3** : Distribution des différents types cellulaires dans un îlot de Langerhans (Cabrera *et al.*, 2006).

Des observations de sections de  $1\mu\text{m}$  de tissus pancréatiques immunomarqués sont réalisées au microscope confocal. En rouge, apparaissent les cellules marquées à l'insuline, en vert, celles marquées au glucagon et en bleu celles produisant la somatostatine.

### 3. [Glucagon et Insuline](#)

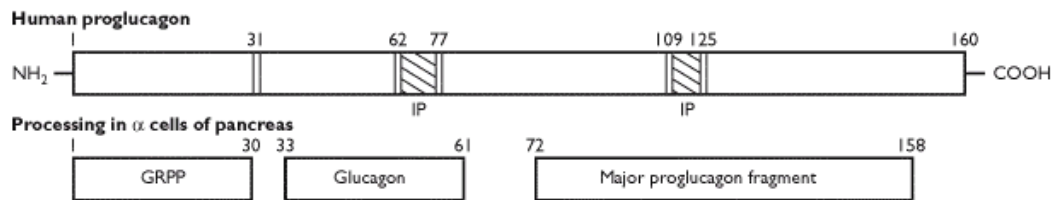
#### a) [Le glucagon : structure, biosynthèse, sécrétion et mécanisme d'action](#)

Découverte et décrite pour la première fois en 1923 (Kimball and Murlin), la séquence en acides aminés du glucagon n'est connue que depuis 1950. Le glucagon est un polypeptide de faible poids moléculaire de 3,5 kDa, composé de 29 acides aminés (cf. figure 4).



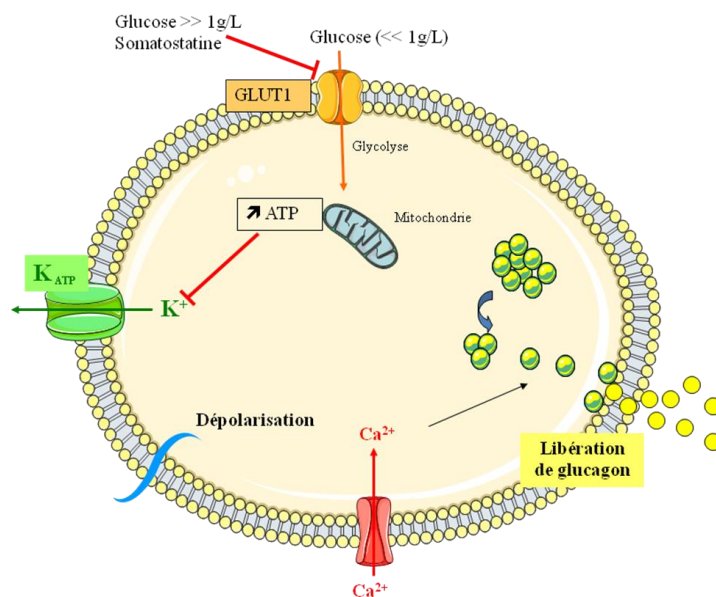
**Figure 4** : Structure primaire du glucagon (D'après G. Dolisi).

La biosynthèse du glucagon débute par la transcription de son gène situé sur le chromosome 2 humain, d'une séquence de 9,4kb (Lefebvre, 1995) en un ARNm codant pour le proglucagon, un peptide de 160 acides aminés. Dans les cellules  $\alpha$ , le proglucagon est clivé au niveau des 2 peptides intermédiaires (IP) par la prohormone proconvertase 2 (Rouillé *et al.*, 1995) pour donner trois peptides de plus petite taille (cf. figure 5) : le polypeptide lié à la glicentine (GRPP, résidus 1-30), le glucagon (résidus 33-61) et le fragment proglucagon majeur (MPFG, résidus 72-158).



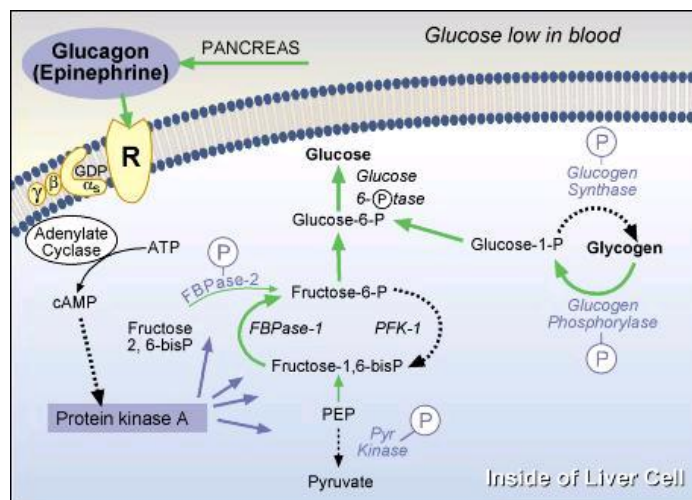
**Figure 5** : Structure du proglucagon et synthèse des différents peptides dans les cellules  $\alpha$  (D'après Taylor et Francis group, 2010).

Le glucagon est produit par les cellules  $\alpha$  du pancréas, uniquement lorsque la glycémie diminue de manière significative au-dessous de 0,65g/L. En effet, dans un état de normoglycémie ou d'hyperglycémie, le glucose empêche les cellules  $\alpha$  de sécréter du glucagon dans le sang. Mais lorsqu'il y a hypoglycémie, la sécrétion d'insuline est bloquée et l'inhibition des cellules  $\alpha$  est levée. La libération du glucagon par les cellules  $\alpha$  résulte d'une entrée massive de calcium dans la cellule suite à une dépolarisation membranaire (cf. figure 6). Le mécanisme n'est pas très connu chez l'homme, mais chez la souris, Göpel *et al.* ont montré que la libération du glucagon serait sous le contrôle des canaux potassiques de type A et des canaux sodiques de type TTX pour le maintien du potentiel de membrane.



**Figure 6** : Mécanisme de sécrétion du glucagon de la cellule  $\alpha$  (source personnelle).

L'hormone rejoint les cellules cibles du foie par les vaisseaux sanguins et se fixe sur les récepteurs spécifiques des hépatocytes. Il existe également des récepteurs au niveau rénal, cervical, adipeux et musculaire ainsi que sur les cellules  $\beta$ . Le glucagon se fixe sur son récepteur couplé aux protéines G. La sous-unité  $\alpha$  de la protéine G va stimuler l'adénylate cyclase et augmenter la production intracellulaire d'AMPc, induisant une activation des protéines kinase (PKA). Cela provoque une accélération de la glycogénolyse d'où une augmentation de la [G6P] intracellulaire. Le foie va hydrolyser le G6P en glucose grâce à Glucose-6-Phosphatase. Le mécanisme entraîne une libération du glucose stocké dans le foie qui en contient environ de 50g à 100g (cf. figure 7).



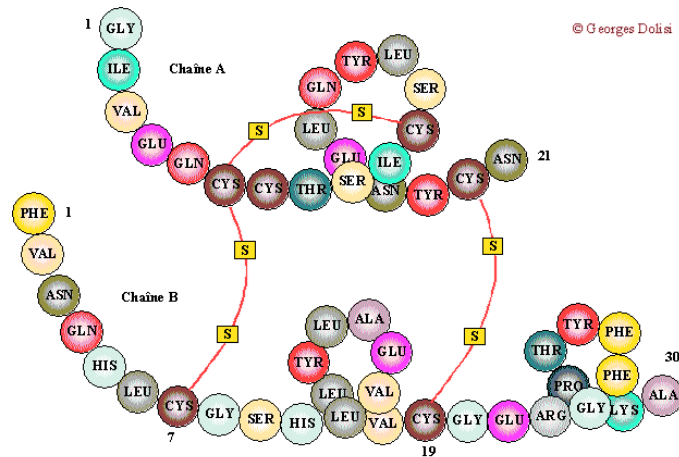
**Figure 7** : Voie de signalisation du glucagon dans la cellule hépatique (D'après Jaspard E, 2008).

Le glucagon accroît la capture des acides aminés par les hépatocytes et favorise ainsi la néoglucogénèse à partir des acides aminés. De plus, le tissu adipeux va fournir des acides gras libres nécessaires aux muscles par lipolyse et celui-ci va les utiliser pour fabriquer des corps cétoniques, autre substrat énergétique en l'absence de glucose. La glycémie est ainsi rétablie à un taux normal.

#### b) [L'insuline : structure, biosynthèse, sécrétion et mécanisme d'action](#)

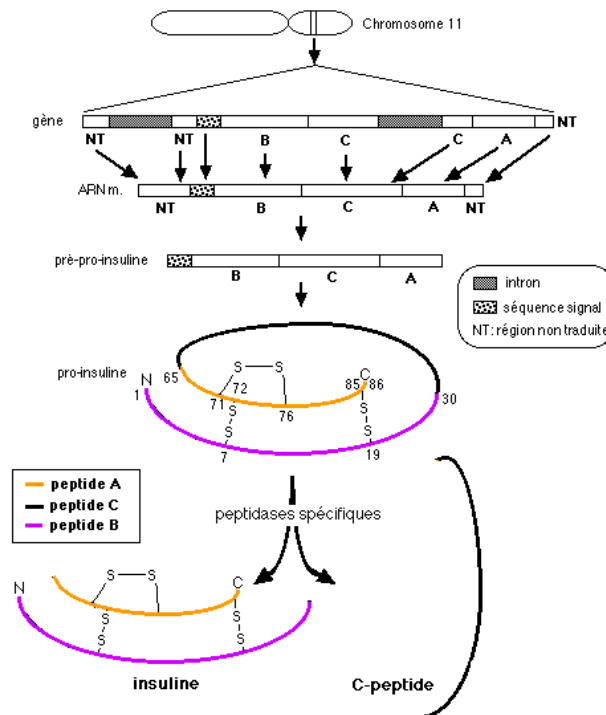
Cette substance a été découverte par Frederick Grant Banting et Charles Herbert Best dans le laboratoire de John James Richard MacLeod et suite aux travaux importants de Nicolas Paulescu (Rosenfeld, 2002). Banting et MacLeod ont été les lauréats du Prix Nobel de physiologie et de médecine en 1923 récompensant leurs travaux.

L'insuline est un peptide de 51 acides aminés et se compose de deux chaînes polypeptidiques : une chaîne A de 21 acides aminés et une chaîne B de 30 acides aminés, qui sont unies par deux ponts disulfures et un pont disulfure intra-chaîne dans la chaîne A (cf. figure 8).



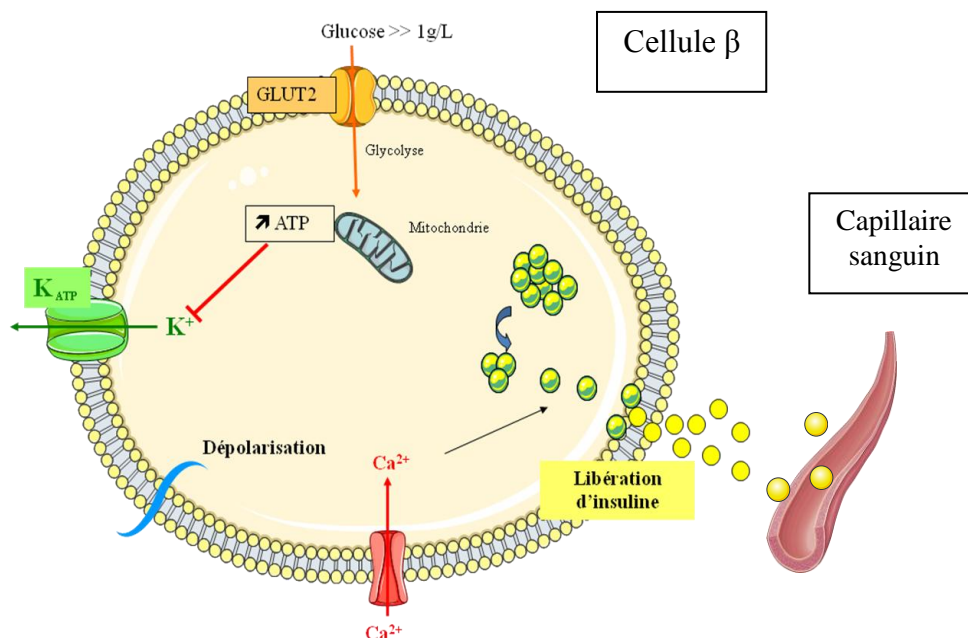
**Figure 8 :** Structure primaire de l'insuline (D'après G. Dolisi).

L'insuline est synthétisée dans les cellules  $\beta$  sous forme de pré-pro-insuline inactive. Chez l'homme, elle est codée par un gène se trouvant sur le chromosome 11. Après la transcription en ARNm du gène codant la pré-pro-insuline, l'ARNm est exporté du noyau vers le cytoplasme pour atteindre les ribosomes se trouvant à la surface du réticulum endoplasmique (RE). La traduction de la pré-pro-insuline se réalise à l'entrée du RE. La molécule subit alors un remodelage, acquiert sa structure quaternaire avec ses deux ponts disulfures et perd sa séquence signal. La pro-insuline ainsi obtenue est constituée de 86 acides aminés ayant un poids moléculaire de 9kDa. Dans l'appareil de Golgi, sous l'action d'une protéase spécifique, la pro-insuline est clivée pour donner le peptide-C (31 acides aminés ayant un poids moléculaire de 3kDa) et un peptide bicaténaire, l'insuline d'une taille finale de 51 acides aminés et de poids moléculaire de 6kDa (cf. figure 9). Ces deux peptides sont stockés dans des granules jusqu'à sécrétion.



**Figure 9 :** Transcription et traduction de l'insuline (Raynal et Cortie, ouvrage « Le diabète de type 2: aspect fondamentaux »).

Le glucose circulant est en contact des cellules  $\beta$  via les capillaires sanguins et la lymphe interstitielle. Lorsque la concentration en glucose sanguin augmente, la cellule  $\beta$  importe le glucose grâce à un transporteur membranaire insulino-indépendant GLUT2, prédominant également dans le foie. Le métabolisme du glucose dans la cellule  $\beta$  augmente le rapport ATP/ADP ce qui induit la fermeture du canal potassique ATP dépendant et bloque la fuite d'ions potassium  $K^+$  (cf. figure 10).



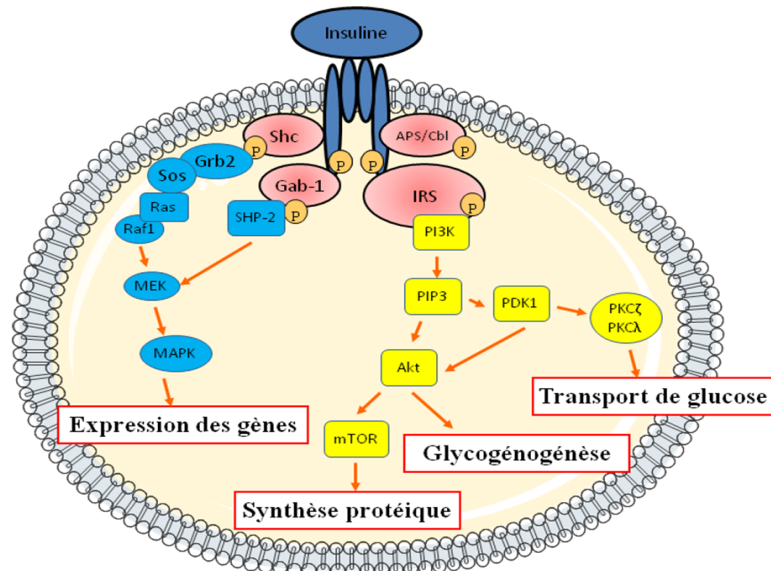
**Figure 10** : Mécanisme de libération de l'insuline de la cellule  $\beta$  (source personnelle).

Cela provoque une dépolarisation de la membrane de la cellule  $\beta$  induisant l'ouverture des canaux calciques voltage sensibles : le calcium entre dans la cellule et déclenche l'exocytose des vésicules contenant de l'insuline. Celle-ci passe dans le sang par transcytose (endocytose + exocytose) à travers l'endothélium du capillaire.

L'insuline libérée permet d'augmenter le captage du glucose par les adipocytes et les cellules musculaires. Ce phénomène est régulé par des mécanismes d'exocytose et d'endocytose des récepteurs GLUT4 insulino-dépendant en présence de l'hormone. Dans le foie et le muscle, le glucose est stocké sous forme de glycogène par le processus de glycogénogenèse et il est utilisé dans le cycle de la glycolyse dans les myocytes pour produire de l'énergie. De plus, au niveau du tissu adipeux, elle induit un stockage des acides gras en favorisant la lipogenèse.

La liaison de l'insuline à son récepteur IR induit son autophosphorylation sur plusieurs résidus Tyr de ses sous unité  $\beta$ . Plusieurs protéines dont Shc, Gab-1, le complexe APS/Cbl et les protéines IRS, se fixent sur ces résidus phosphorylés afin d'être eux-mêmes phosphorylés par le récepteur insulinique activé. Shc recrute Grb2 et sa protéine associée Sos, ce qui active la protéine Ras associée à Raf1 pour activer les cascades de phosphorylation par la MAP kinase (MAPK).

Cette cascade régule l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et la différenciation. La cascade PI3K conduit à des modifications de l'état de phosphorylation de plusieurs enzymes dont Akt et mTOR, permettant de stimuler la synthèse de glycogène et de protéines. La cascade PI3K, *via* PDK1, participe également au contrôle de la translocation du transporteur de glucose GLUT4 vers la surface de la cellule et donc à l'augmentation de la vitesse d'entrée du glucose dans la cellule (cf. figure11).



**Figure 11** : Transduction du signal par l'insuline (source personnelle, d'après Voet & Voet, Edition deBoeck, 2005).

## B. La pathologie diabétique

### 1. Le diabète

Le mot **diabète** vient du grec « dia-baïno » signifiant « passer au travers ». Le diabète est une maladie due à une concentration anormalement élevée de sucre dans le sang. L'OMS le définit par une glycémie supérieure à 1,26g/L (7mmol/L) caractéristique à jeun, confirmée par deux prises de sang consécutives. Il existe 4 types de diabètes, définis par l'OMS (1997) : le diabète de type 1 et 2 qui seront décrits ci-après, les diabètes dits « secondaires » qui sont la cause de pathologies pancréatiques, hépatiques, endocriniennes ou génétiques ; et enfin le diabète gestationnel.

La glycémie anormalement élevée résulte d'une carence totale ou partielle en insuline ou d'une résistance des tissus périphériques cibles à l'insuline, ayant pour conséquence, une non-absorption du glucose par les cellules et donc une hyperglycémie. La carence totale est la conséquence d'une destruction des cellules bêta des îlots de Langerhans par un mécanisme auto-immun, c'est le diabète de type 1. Au contraire, le diabète de type 2 correspond à un défaut de fabrication de l'insuline par le pancréas ou d'une inaptitude des cellules à utiliser celle-ci.



L'hyperglycémie provoquée par ces deux types de diabète est responsable de nombreuses complications chroniques micro et macrovasculaires.

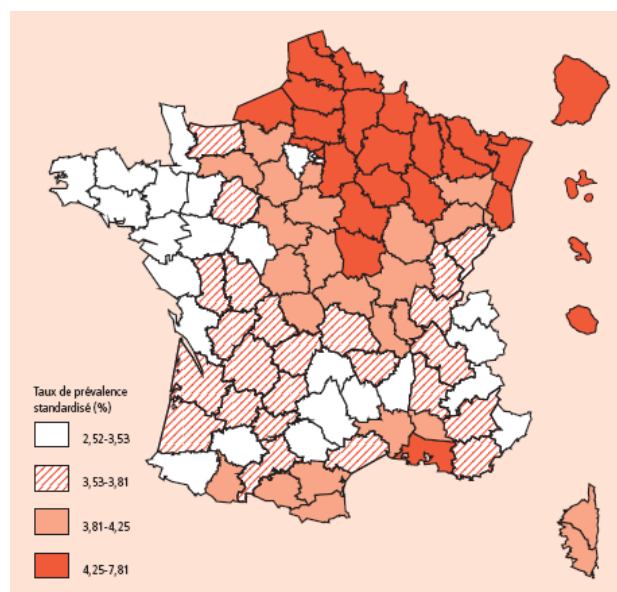
Le diabète est une maladie grave puisqu'il est placé au 5<sup>ème</sup> rang des causes de mortalité.

## 2. La prévalence

Maladie silencieuse et chronique, le diabète est une maladie métabolique très répandue et classée d'épidémie. Depuis quelques années, la prévalence (nombre de cas observés dans une population rapportés au nombre total d'individus de cette population) augmente fortement dans les pays riches, mais aussi dans les pays pauvres. En 2010, la prévalence globale du diabète dans la population mondiale est estimée entre 6,6% et 7,9%, en incluant les patients intolérants au glucose. En 2010, le nombre de diabétiques est estimé à 284,6 millions avec une prédiction, pour 2030, à 438,4 millions, soit une augmentation de 54%.

La prévalence reste la plus élevée au Etats-Unis (13,7% chez les hommes et 11,9% chez les femmes) avec un nombre de diabétiques de 26,8 millions, mais elle augmente beaucoup en Asie du sud-est et notamment en Inde, où le nombre de personnes atteintes est de 50,8 millions (données de l'International Diabetes Federation, Montréal 2009).

En France, en 2007, la prévalence était de 3,85% en moyenne avec cependant des disparités inter-régionales : la prévalence est plus grande pour le Nord-Pas-de-Calais (4,8%), la Picardie (4,7%), l'Alsace et la Champagne-Ardenne (4,5%). Cette disparité est encore plus accentuée dans les Départements d'Outre-mer, notamment à La Réunion et à la Guadeloupe avec des prévalences respectives de 7,8 et 7,3% (cf. figure 12).



**Figure 12** : Prévalence du diabète traité par département en 2007 (régime général de l'assurance maladie française ; Kusnik-Joinville *et al.*, données INVS 2008).

En 2008, la France comptait 3 millions de diabétiques (6% de la population), les personnes présentant un diabète de type 2 représentaient 90% des personnes atteintes, incluant 500 000 à 800 000 français qui ignorent être diabétiques.

### 3. [Le diabète de type 1](#)

#### a) [Physiopathologie du diabète de type 1](#)

Le diabète de type 1, autrefois appelé diabète insulino-dépendant (DID) ou diabète juvénile, apparaît le plus souvent de manière brutale chez l'enfant ou chez le jeune adulte. Il se caractérise par une polyurie, une polydipsie et une polyphagie ayant pour conséquence un amaigrissement malgré une prise de nourriture abondante. La glycémie est supérieure à 2g/L avec présence d'acétone et de glucose dans les urines.

Le diabète de type 1 représente 10% des cas de diabète (Daneman, 2006) et est une maladie auto-immune dans 90% des cas conduisant à une destruction progressive et chronique des cellules  $\beta$ . La maladie est présente depuis plusieurs années avant que les symptômes apparaissent. Cela a lieu lorsque plus de 70% des cellules  $\beta$  sont détruites (Pilot *et al.*, 2008).

#### b) [Facteurs génétiques et facteurs déclenchants](#)

Le diabète de type 1 fait intervenir des facteurs de risque génétique. En effet, il correspond à un désordre polygénique, qui ne peut pas être classé comme dominant ou récessif. Des études ont montré que chez le rat BB, la souris NOD et l'homme, le lien génétique le plus important concernait le complexe majeur d'histocompatibilité ou CMH (Pociot and McDermott, 2002). Il est connu que des variantes génétiques des allèles DR3, DR4, DQ2 et DQ8 codant des protéines du CMH de classe II sont retrouvés chez le patient atteint de diabète de type 1. Plus de 90% des patients diabétiques de type 1 expriment les allèles DR3DQ2 ou DR4DQ8 (Khardori and Pauza, 2003).

Des études suggèrent qu'il n'y a que 30 à 50% de concordance pour le diabète de type 1, chez des jumeaux monozygotes (Redondo *et al.*, 1999) et que l'augmentation de l'incidence du diabète de type 1, ces dernières années, ne peut pas s'expliquer que par la susceptibilité génique de la population (Jaïdane and Hober, 2008). Cela laisse suggérer l'existence de facteurs environnementaux contribuant à la pathogénicité du diabète de type 1.

Ces facteurs environnementaux peuvent être des toxines (dérivés de nitrate) et des pathogènes comme des entérovirus, parvovirus ou ceux responsables de la rubéole et des oreillons (Van der Werf *et al.*, 2007). Des études épidémiologiques ont montré l'implication d'une infection virale congénitale, la rubéole, dans le développement du diabète de type 1. En effet, 20% des enfants nés de mères atteintes par la rubéole ont développé un diabète de type 1 (Khardori and



Pauza, 2003). Le virus coxsackie B4 a également été mis en cause lors d'étude où celui-ci, isolé de patients diabétiques de type 1, infectait *in vitro* des îlots humains de patients non diabétiques, entraînant un défaut de la sécrétion d'insuline stimulée par glucose (Dotta *et al.*, 2007). Les facteurs déclenchant un diabète de type 1 peuvent également être des constituants alimentaires comme le lait de vache introduit de façon précoce dans l'alimentation du nourrisson ou des médicaments.

#### c) Production d'auto-anticorps

Dans 95% des cas de diabète de type 1, une étiologie auto-immune est retrouvée. Les antigènes cibles sont principalement l'acide glutamique décarboxylase (GAD65), un récepteur tyrosine phosphatase protéine like appelé IA-2 pour « Islet Antigen 2 » et l'insuline, IAA pour « Insulin Auto-Antibody ».

L'enzyme GAD65 qui permet la conversion de l'acide glutamique en acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) est impliquée dans la réaction immunitaire du diabète de type 1 (Baekkeskov *et al.*, 1990) car il a été mis en évidence une similarité entre la séquence de la protéine GAD65 et celle de la protéine P2-C du virus coxsackie B4 (Kaufman *et al.*, 1992). Ainsi le système immunitaire reconnaît à tort les protéines GAD65.

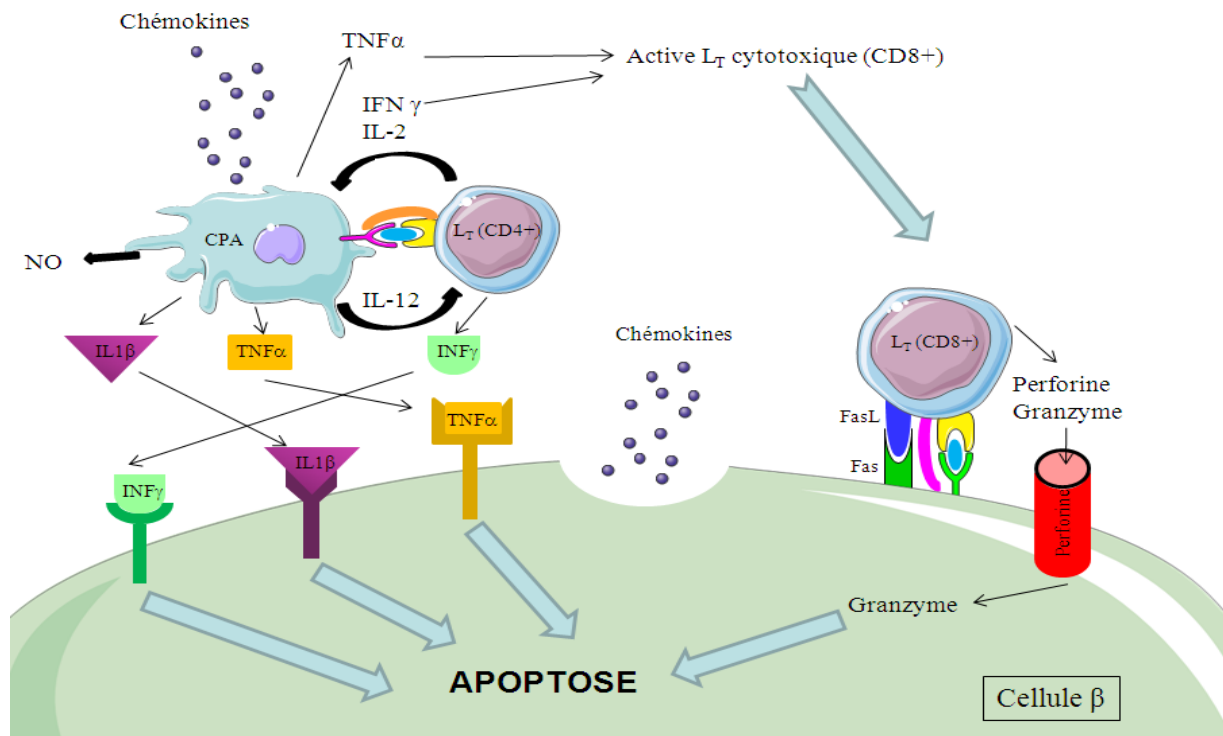
La protéine IA-2 ou encore appelée ICA512 pour « Islet Cell Autoantigen » est une protéine transmembranaire à activité tyrosine phosphatase intrinsèque, localisée dans la membrane des granules sécrétrices (Solimena *et al.*, 1996).

Enfin, l'insuline est également un antigène mis en cause dans la pathologie (Palmer *et al.*, 1983). Les auto-anticorps sont spécifiquement dirigés contre la chaîne B de l'insuline ou de la proinsuline (Khardori and Pauza, 2003).

Les anticorps spécifiques des antigènes de la cellule  $\beta$  sont présents avec une fréquence augmentée chez des patients diabétiques de type 1 récemment diagnostiqués (Santamaria *et al.*, 1992 ; Bottazzo *et al.*, 1974). La combinaison de ces anticorps peut être utilisée comme marqueur prédictif d'un diabète de type 1 car ils apparaissent des mois voire des années avant l'apparition de troubles métaboliques (Pihoker *et al.*, 2005). De plus, ils sont également dosés dans le cas d'un patient diabétique de type 2 devenu insulino-requérant.

#### d) Mécanisme de destruction de la cellule $\beta$

Le processus de recrutement des lymphocytes dans l'îlot pancréatique n'est pas clairement compris, mais il implique la production de cytokines à la fois par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA), les cellules de l'endothélium vasculaire et les cellules  $\beta$ . Le schéma figure 13 présente un mécanisme simplifié de la destruction des cellules  $\beta$  lors d'un diabète de type 1.



**Figure 13 : Mécanisme de destruction auto-immune de la cellule  $\beta$  dans le diabète de type 1 (modifié d'après Pirot *et al.*, 2008).**

Au niveau de la liaison des lymphocytes, les récepteurs jaunes correspondent aux TCR, l'ovale bleu à l'antigène, le récepteur rose (sur la CPA) à la molécule du CMH de classe II, et le vert (sur la cellule  $\beta$ ) à la molécule du CMH de classe I. Enfin, la reconnaissance spécifique entre CPA et  $L_T$  helper est assurée par le CMH de classe II et la molécule  $CD4+$  (orange) tandis que celle entre la cellule  $\beta$  et le  $L_T$  cytotoxique se fait par le CMH de classe I et le  $CD8+$  (rose).

Les CPA présentent l'antigène de la cellule  $\beta$  au lymphocyte T ( $L_T$ ) helper ( $CD4+$ ) naïf *via* la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et au récepteur TCR du lymphocyte T. Cela induit la production par la CPA d'interleukine 12 (IL-12) permettant la différenciation du  $L_T$  en un  $L_T$  mature. Celui-ci en retour sécrète de l'interleukine 2 (IL-2) et de l'interféron  $\gamma$  ( $IFN\gamma$ ), qui vont stimuler la production d'interleukine 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), de Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  ( $TNF\alpha$ ) et d'oxyde nitrique (NO), un radical libre.

La sécrétion de ces cytokines active les  $L_T$  cytotoxique ( $CD8+$ ) qui arrivent dans l'îlot et qui entraînent la sécrétion, par les cellules  $\beta$ , de chémokines. Le  $L_T$  cytotoxique se lie à la cellule  $\beta$  par son TCR et *via* la molécule du CMH de classe I à la surface de la cellule pancréatique. De plus, il exprime à sa surface la protéine FasL qui va se lier au récepteur Fas (de la famille des récepteurs au TNF) de la cellule  $\beta$ . L'activation de la voie Fas induit l'activation des caspases, notamment celle de la caspase 8, et la mort cellulaire par apoptose. En parallèle, ces  $L_T$  déversent le contenu de leurs granules, qui contiennent le système granzyme/perforine (Pearl-Yafe *et al.*, 2007). La perforine génère des pores sur la cellule  $\beta$ , permettant la pénétration d'une protéase à sérine, appelée granzyme qui va activer les caspases et induire la mort cellulaire par apoptose. Enfin, la fixation de

cytokines pro-inflammatoires comme le  $TNF\alpha$ , l' $INF\gamma$  et l' $IL-1\beta$ , sécrétées par les cellules immunitaires ( $CPA$  et  $L_T$ ) sur leurs récepteurs à la surface de la cellule  $\beta$ , induit l'apoptose par différentes voies de signalisation dont la voie  $NF\kappa B$  (cf. figure 13).

#### 4. [Diabète de type 2](#)

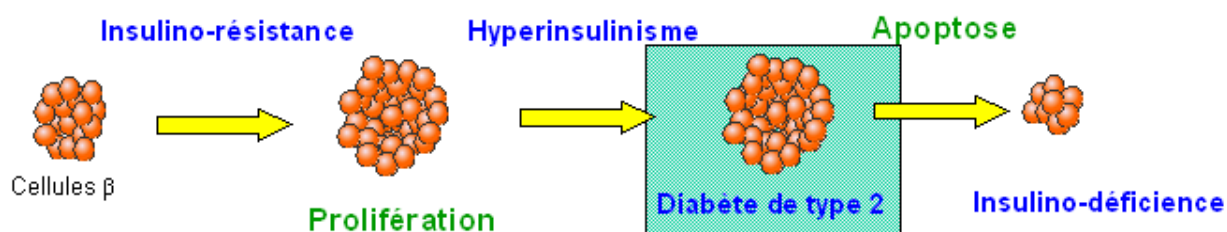
Le diabète de type 2, autrefois appelé diabète non insulino-dépendant (DNID) se manifeste chez l'adulte après 40 ans. Ce type de diabète touche essentiellement des adultes mais la maladie est en forte progression chez les enfants. Il est très répandu et représente plus de 90% des cas de diabète.

##### a) [Intolérance au glucose](#)

L'intolérance au glucose autrefois appelée syndrome métabolique ou syndrome X, correspond à une hyperglycémie modérée. Il s'agit d'un stade précurseur du diabète où les patients atteints ont un risque plus élevé de développer par la suite un diabète de type 2. En 2010, 138 millions de personnes étaient touchées par l'intolérance au glucose, majoritairement des personnes entre 40 et 59 ans. Un tiers de ces personnes, en revanche, sont âgées de 20 à 39 ans (IDF Diabetes Atlas).

##### b) [Cas particuliers de l'intolérance au glucose : l'hyperinsulinisme](#)

L'hyperinsulinisme est un état qui perdure depuis au moins 10 ans avant que le diagnostic d'un diabète de type 2 ne soit établi. Il est caractérisé par une insulino-résistance, c'est-à-dire une production d'insuline peu fonctionnelle ou une non-fixation de l'insuline sur ses récepteurs périphériques. Le glucose n'est ainsi pas capté par les cellules, aggravant l'hyperglycémie et nécessitant plus d'insuline. Le pancréas va alors s'adapter en augmentant la masse de cellules  $\beta$  fonctionnelles (hyperplasie des îlots), ce qui conduit à un hyperinsulinisme. Cet état pathologique existe bien avant l'apparition du diabète de type 2. A terme, la production d'insuline s'épuise de par une glycémie de plus en plus difficilement équilibrée et par l'entrée en apoptose des cellules  $\beta$ , c'est l'insulino-déficience (cf. figure 14). Le patient diabétique doit alors recourir à des injections d'insuline (insulino-requérance).



**Figure 14** : Hyperinsulinisme et diabète de type 2 (données personnelles).

### c) Facteurs de risque

- Obésité et lipotoxicité

Dans 80 % des cas, le diabète est lié à une surcharge pondérale voire une obésité. Celle-ci se traduit par un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 30. Les patients obèses ont 10 fois plus de risque de devenir diabétique (Grimaldi A, Livre « Diabète de type 2 », EMC Référence, 2004). L'obésité est notamment due au mode de vie actuel où les apports caloriques sont bien supérieurs aux dépenses énergétiques. En effet, le mode de vie de notre société contemporaine est caractérisé par une augmentation de l'ingestion de graisses alimentaires et de glucose (boissons sucrées).

Il est estimé à plus de 1,1 milliard, le nombre de personnes en surpoids dans le monde dont 320 millions d'obèses (Diabetes atlas résumé, seconde édition IDF 2003). En France, l'étude ObÉpi – Roche menée en 2009, indique que la prévalence du surpoids et de l'obésité chez les adultes de plus de 18 ans, est respectivement de 31,9% et 14,5% ; soit une augmentation de cette prévalence de +10,1% soit 5,9% par an depuis 12 ans. En 12 ans, 2 922 000 nouveaux obèses ont été diagnostiqués avec une prévalence plus élevée chez les femmes. Les régions les plus touchées sont le Nord et l'Est avec des prévalences en 2009 de 20,5% et 17%. D'après cette enquête, les français ont pris 900g par rapport à 2006 mais 3,1kg par rapport à l'étude de 1997. De plus, il est constaté une augmentation significative de l'IMC de 1kg/m<sup>2</sup> et du tour de taille de 4,7 cm depuis 1997.

L'étude montre également qu'il y a 3 fois plus de diabétiques de type 2 en cas de surpoids et 7 fois plus en cas d'obésité.

L'obésité est caractérisée par un état chronique où le tissu adipeux ne peut plus stocker de façon normale les triglycérides ce qui a pour conséquence le dépôt de ces lipides dans des compartiments autres que ceux dévolus à cette fonction, comme le tissu adipeux viscéral, les muscles, le foie, le cœur et le pancréas. Cette accumulation provoque une dérégulation et une dysfonction du tissu impliqué, appelée lipotoxicité (Kusminski *et al.*, 2009). Le tissu adipeux viscéral libère une grande quantité d'acides gras libres, ce qui favorise la synthèse hépatique des triglycérides et stimule la néoglucogénèse hépatique. Au niveau musculaire, les acides gras libres sont oxydés en priorité par rapport au glucose, entraînant une production accrue d'acétyl coenzyme A qui inhibe en retour les enzymes de la glycolyse ; le tout contribuant à l'aggravation de l'hyperglycémie.

- Les facteurs sociaux

La consommation de nourritures et de boissons riches en énergie, en graisses et en glucides est devenue une habitude dans nos sociétés modernes. De plus, la transition d'un milieu rural vers un milieu urbain est associée à des changements dans les habitudes alimentaires et les activités

physiques (Solomons and Gross, 1995). D'une part, les conditions de vie et de travail sont plus confortables, l'organisme est donc moins soumis à des contraintes physiques. De plus, la sédentarité multiplie le risque de diabète par deux. D'autre part, les tendances alimentaires vont vers des aliments ou boissons ayant un index glycémique élevé (haut pouvoir sucrant). Des études ont suggéré que la probabilité de devenir obèse est de 38% chez les sujets féminins qui boivent plus d'un soda par semaine contre 18% chez celles qui boivent moins d'un soda par semaine (Liebman *et al.*, 2003). Une autre étude a montré qu'une consommation en boissons sucrées (58% de soda, 20% de jus de fruits, 19% de thé et 3% de café) a été significativement associée à un surpoids (Nicklas *et al.*, 2003).

Ces préférences pour une alimentation hypercalorique et cette sédentarité associées sont la cause d'un environnement obésogène chez l'homme, qui peut engendrer des complications allant de l'insulino-résistance au diabète de type 2.

- L'hérédité

Le diabète de type 2 est une maladie également à prédisposition génétique, en plus de la présence de facteurs sociaux ou environnementaux. Le risque de développer un diabète chez un enfant ayant un des deux parents diabétiques est augmenté. De plus, chez des jumeaux monozygotes, la concordance de la maladie peut atteindre 90% (Grimaldi A, Livre « Diabète de type 2 », EMC Référence, 2004).

- L'âge

Le risque de développer un diabète de type 2 augmente avec l'âge. En effet, la tranche d'âge la plus touchée est celle des 40-59 ans (Diabetes atlas résumé, seconde édition IDF 2003). Chez le sujet âgé, il y a une baisse de l'insulino-sécrétion et une augmentation de l'insulino-résistance (Jackson, 1990).

- La grossesse

Un diabète gestationnel est considéré par l'OMS (1997) comme un diabète à part qui disparaît après la grossesse. Cependant, celui-ci est un facteur de risque ultérieur d'un diabète de type 2, de même que la naissance d'un enfant de plus de 4kg (ANAES, Principe du dépistage du diabète de type 2, Février 2003). De plus, un enfant né de mère atteinte par un diabète gestationnel, a plus de risque de développer un diabète de type 2 et de souffrir d'obésité (Grimaldi A, Livre « Diabète de type 2 », EMC Référence, 2004).

#### d) Mécanisme de l'insulino-résistance

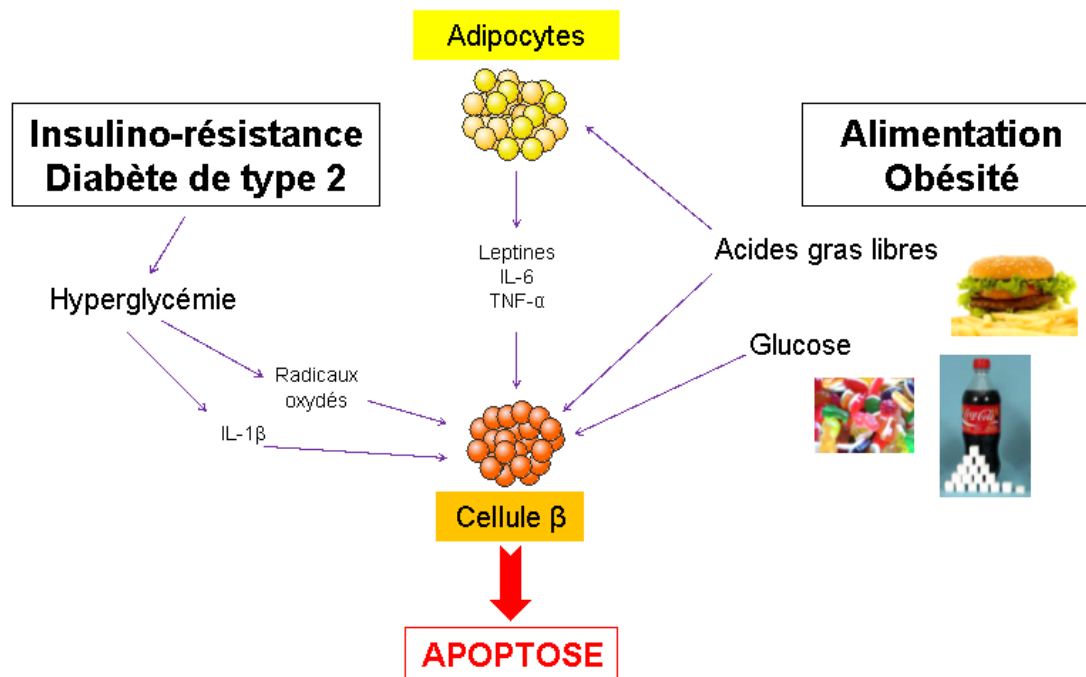
Une des premières phases du diabète de type 2 est l'insulino-résistance. Sa mise en place fait intervenir de hautes concentrations en acides gras qui sont libérés par le tissu adipeux dans la circulation. Ces acides gras sont ensuite oxydés dans les tissus périphériques en acétyl coenzyme A,

en diacylglycérol et en céramides, ce qui entraîne l'augmentation d'une isoforme d'une protéine kinase C. Cette kinase phosphoryle le récepteur IRS-1 sur les acides aminés sérine et thréonine ce qui a pour conséquence d'inhiber la phosphorylation de la tyrosine qui est requise pour libérer l'insuline. Ainsi, la translocation des vésicules renfermant le transporteur GLUT4 est inhibée, le glucose circulant ne peut donc pas entrer dans les cellules (Schulman, 2000). Cela favorise l'hyperglycémie ; le pancréas va donc s'adapter en produisant plus d'insuline.

#### e) Apoptose des cellules $\beta$

Dans les cellules  $\beta$ , l'accumulation des acides gras libres est toxique et cette toxicité passe par la formation de céramide, induisant l'augmentation d'oxyde nitrique NO et l'activation de l'apoptose (Shimabukuro *et al.*, 1998). De plus, une concentration élevée en glucose induit une apoptose médiée par l'IL-1 $\beta$  sur des cellules  $\beta$  dans un modèle de rat diabétique de type 2 (Donath *et al.*, 1999), mais aussi sur des îlots humains (Maedler *et al.*, 2002). L'hyperglycémie chronique est également responsable de la formation d'espèces réactives de l'oxygène, ROS pour « Reactive Oxygen Species » qui contribue avec l'IL-1 $\beta$  à la transcription du facteur NF $\kappa$ B.

De plus, le tissu adipeux sécrète des hormones et des cytokines ayant des actions auto et paracrine. Les adipocytes peuvent sécréter de la leptine, des antagonistes du récepteur à l'IL-1 $\beta$  (Meier *et al.*, 2002), du TNF $\alpha$  (Hotamisligil *et al.*, 1995) et de l'IL-6 (Fried *et al.*, 1998). Ces facteurs sont tous augmentés dans l'obésité et sont liés à l'insulino-résistance (Donath *et al.*, 2003) ; (cf. figure 15).



**Figure 15** : Facteurs contribuant à l'apoptose des cellules  $\beta$  (Source personnelle).

## C. Les complications liées au diabète

### 1. Les complications aiguës

#### a) L'hyperglycémie

Elle est caractérisée par une augmentation importante du glucose dans le sang et se traduit par un dessèchement de la bouche, une soif extrême, un besoin fréquent d'uriner, une somnolence accrue, des nausées et vomissements, associés à une perte de poids. Ces symptômes ont des origines métaboliques. En effet, la destruction des cellules  $\beta$  dans le diabète de type 1 et 2 diminue et inhibe la production d'insuline et il en résulte une non pénétration du glucose dans les cellules et par conséquent une hyperglycémie. De plus, celle-ci s'accompagne d'une production hépatique de glucose par processus de néoglucogénèse et de glycogénolyse. Malgré la présence de glucose, les cellules doivent trouver un autre substrat biologique pour produire de l'énergie. Elles vont alors utiliser les acides gras et les acides aminés. Ces derniers vont subir des réactions de désamination et de transamination pour pouvoir entrer dans le cycle de Krebs. En parallèle, les acides gras libres subissent le cycle de la  $\beta$ -oxydation pour aller dans le cycle de Krebs. Cependant, lors de la  $\beta$ -oxydation, il y a formation de corps cétoniques toxiques (acétone,  $\beta$ -hydroxypyruvate et acétoacétate) qui se comportent comme des acides dans le sang et diminue considérablement le pH sanguin ; c'est l'acidocétose. Si celle-ci n'est pas rapidement traitée, elle peut provoquer une hypotension, une altération de la fonction myocardique, une vasodilatation cérébrale et un coma, parfois mortel.

De plus, l'hyperglycémie a pour conséquence la non réabsorption du glucose par le tubule rénal, ce qui entraîne une glycosurie. Elle induit également une hyper-osmolarité extracellulaire, provoquant le passage de l'eau et du potassium de la cellule vers le compartiment extracellulaire. Les signes spécifiques de cette fuite hydrique sont la polyurie et la polydipsie. Si cette déshydratation n'est pas soignée, elle peut engendrer un coma hyperosmolaire.

#### b) L'hypoglycémie

Les symptômes qui caractérisent l'hypoglycémie sont une faim insatiable, des tremblements et étourdissements, des troubles visuels associés à des maux de tête et à des changements de caractères, ainsi qu'une transpiration importante et une fatigue extrême.

Elle peut survenir en cas d'inadéquation du traitement chez le patient diabétique de type 1 ou si le diabète est très fortement instable. En effet, si les doses d'insuline sont trop fortes par rapport aux besoins (efforts physiques ou alimentation), la glycémie passe sous le seuil de 0,8g/L. Lorsque les symptômes apparaissent, il faut rapidement ingérer des glucides ayant un index glycémique élevé (haut pouvoir sucrant) comme le sucre ou la confiture. Si l'hypoglycémie apparaît



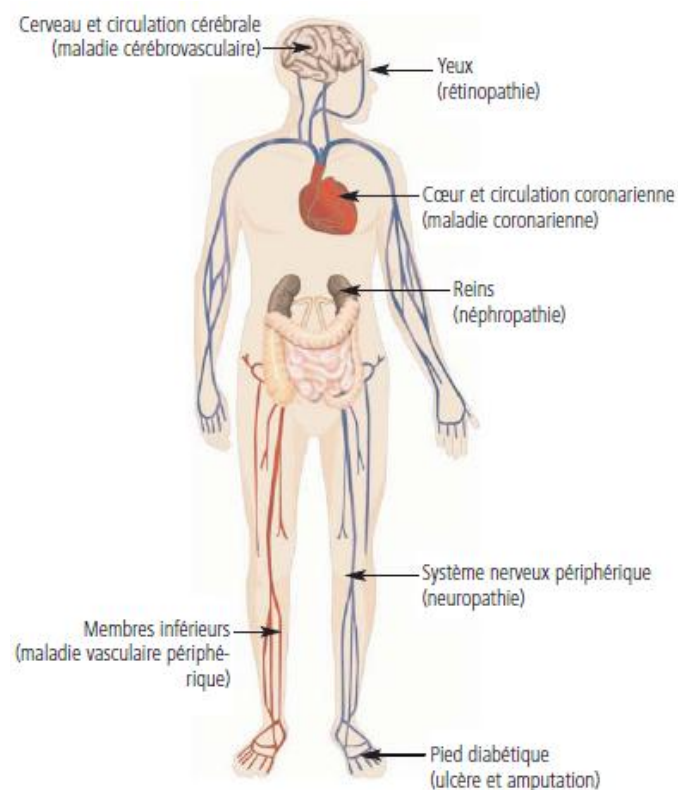
pendant la période d'action d'une insuline rapide, il est recommandé d'ingérer des glucides ayant au contraire un index glycémique plus faible comme les fruits ou le pain pour remonter la glycémie.

Parfois, il peut se produire des hypoglycémies sévères pouvant entraîner des pertes de connaissance. Le recours à des injections intraveineuses de glucose ou de glucagon est indispensable pour rétablir la glycémie.

## 2. Les complications chroniques

Les complications chroniques du diabète représentent aujourd'hui les causes essentielles de morbidité et de mortalité chez le patient diabétique. L'hyperglycémie à long terme aboutit à des lésions au niveau des vaisseaux à l'origine de graves complications cardiovasculaires. Le risque de maladies cardiovasculaires est de 2 à 3 fois plus élevé chez les diabétiques que dans l'ensemble de la population (Diabète Atlas résumé, seconde édition 2003, IDF).

Les lésions concernant les petits vaisseaux sont appelées microangiopathies. Elles touchent essentiellement le rein, l'œil, et certains nerfs périphériques. Au contraire, les atteintes des vaisseaux plus gros ou vaisseaux de conductance sont les macroangiopathies. Elles peuvent entraîner des accidents vasculaires cérébraux (AVC) et des infarctus du myocarde (cf. figure 16). Ces complications cardiovasculaires peuvent aller jusqu'à des comas.



**Figure 16 : Les complications cardiovasculaires liées au diabète (Dossier Santé Diabète de type 2, GSK, 2009).**



### a) Microangiopathies

Les lésions microangiopathiques sont caractérisées par l'épaississement de la membrane basale des capillaires sanguins, ce qui a pour conséquence :

- d'augmenter la perméabilité capillaire, ce qui provoque un exsudat (épanchement de liquide de nature séreuse),
- d'augmenter la fragilité du vaisseau et d'induire des hémorragies,
- d'obstruer les capillaires ce qui provoque des lésions ischémiques.

L'atteinte des petits vaisseaux est diffuse et elle aggrave les lésions causées par la macroangiopathies.

- La rétinopathie diabétique

La rétinopathie diabétique constitue la première cause de cécité dans les pays industrialisés avant l'âge de 65 ans (Fong *et al.*, 2004). 95% des diabétiques de type 1 présentent une rétinopathie au bout de 15 ans, contre 50% de patients diabétiques de type 2.

Le diabète provoque des occlusions des capillaires de la rétine, une ischémie de la rétine et des hémorragies par rupture de la barrière hémato-rétinienne. Les ions et protéines passent dans la rétine, entraînant l'eau par osmose, à l'origine de la formation d'un œdème. Les lipides et les protéines peuvent également passer et former un exsudat. Cela peut entraîner une cataracte, un glaucome, des œdèmes maculaires voire une cécité totale. Détectés précocement par un examen de fond d'œil, ces troubles peuvent être bien traités par laser. Une fois les complications survenues, il est souvent trop tard, d'où la nécessité d'un dépistage annuel.

- La néphropathie diabétique

La néphropathie diabétique peut évoluer jusqu'à l'insuffisance rénale. C'est la seule cause d'insuffisance rénale terminale conduisant à la dialyse. Celle-ci augmente actuellement dans tous les pays industrialisés. 30% des diabétiques de type 1 présentent une néphropathie diabétique au bout de 15 ans, contre seulement 15% des patients diabétiques de type 2. Le rein est un organe constitué d'un réseau important de micro-vaisseaux, qui forment un filtre pour éliminer les déchets et les toxines présents dans le sang. Dans la pathologie diabétique, la capacité de filtration du glomérule rénal est altérée, ce qui a pour conséquence une accumulation des déchets dans le sang. Cela peut conduire au stade d'insuffisance rénale chronique. Les deux seules solutions pour filtrer le rein et remédier à la néphropathie sont la dialyse et la transplantation rénale.

- La neuropathie périphérique

Elle constitue la première cause d'amputation non traumatique, car elle prédispose aux plaies des pieds en provoquant une perte de sensibilité (Singh *et al.*, 2005). Le risque augmente avec la durée du diabète.

L'atteinte est essentiellement due à une ischémie. La neuropathie périphérique touche surtout les membres inférieurs et entraîne des douleurs, des crampes et une diminution de la sensibilité ainsi que des plaies pouvant conduire à des amputations, car le patient ne se rend pas compte qu'il a une blessure par l'absence de stimuli douloureux et laisse évoluer la blessure.

La neuropathie peut aussi toucher le système nerveux autonome et provoquer des troubles de la digestion (diarrhée), du rythme cardiaque (hypotension) et des troubles d'ordre mictionnel et sexuel (impuissance). L'atteinte peut également être due à une dégénérescence axonale avec une démyélinisation.

- Sensibilité liée aux infections

Un diabète mal équilibré favorise les infections bactériennes et mycosiques qui elles-mêmes déséquilibrent le diabète en retour. La fréquence des septicémies d'origine bactérienne est plus importante chez les patients diabétiques que dans la population non diabétique (Gin, 1992). La prolifération des germes est d'une part favorisée par leur appétence pour le sucre et d'autre part, par l'affaiblissement des défenses de l'organisme (globules blancs) sous l'effet de l'hyperglycémie. Les infections rencontrées sont des infections des appareils respiratoire, urinaire et génital mais aussi des infections cutanées à staphylocoques, des mycoses et furonculoses.

b) Macroangiopathies

L'atteinte des artères coronaires est corrélée à l'ancienneté du diabète mais surtout à l'équilibre du diabète. En effet, un diabétique mal équilibré présente un risque beaucoup plus important de développer à terme une maladie coronaire qu'un diabétique parfaitement équilibré. Cette atteinte coronaire est due à une athérosclérose et peut s'exprimer sous la forme d'angine de poitrine encore appelée « angor » et parfois d'infarctus du myocarde. Cette athérosclérose est engendrée par l'hyperglycémie chronique, mais elle peut aussi être aggravée en présence de facteurs tels que le tabagisme, des troubles lipidiques ou une hypertension artérielle.

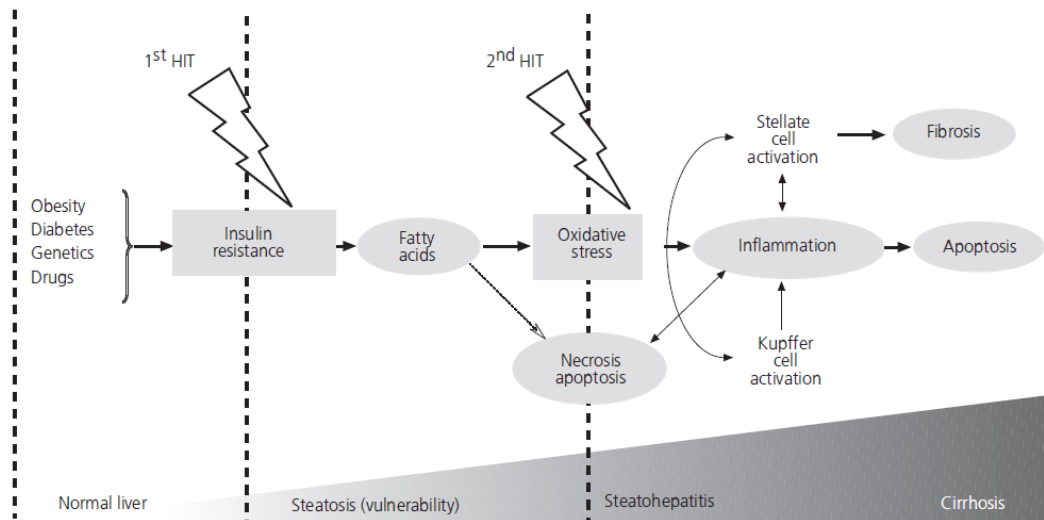
Les artères cérébrales peuvent également être touchées et donner lieu à des accidents vasculaires cérébraux. De même, on peut assister à l'apparition d'une inflammation des parois des artères (artérite) des membres inférieurs due à l'atteinte des artères situées au niveau des jambes.

### 3. Pathologie associées au diabète de type 2 : la stéatose hépatique

a) Généralités

Le diabète de type 2 s'accompagne dans 80% des cas d'une surcharge pondérale ou d'une obésité. L'insulino-résistance et l'obésité qui l'accompagnent sont des facteurs de risque pour le développement des maladies du foie, les NAFLD pour « non alcoholic fatty liver disease ». Elles se caractérisent par un dépôt de lipides dans le cytoplasme des hépatocytes. L'évolution des NAFLD

repose sur la théorie du double « hit ». La forme la moins avancée est la stéatose hépatique qui correspond à une accumulation bénigne et réversible de triglycérides dans le foie (premier hit) mais qui rend les hépatocytes plus susceptibles à un second hit (cf. figure 17). Celui-ci correspond à une réponse inflammatoire menant à la stéato-hépatite ou NASH (non alcoholic steatohepatitis). Celle-ci est caractérisée par une stéatose macrovésiculaire associée à une inflammation (Buqué *et al.*, 2008) et parfois à de la fibrose. La NASH peut elle-même progresser en cirrhose (Caldwell *et al.*, 1999) puis, dans les formes les plus sévères, en hépatocarcinôme (Ratziu *et al.*, 2002 ; Yang *et al.*, 2001).

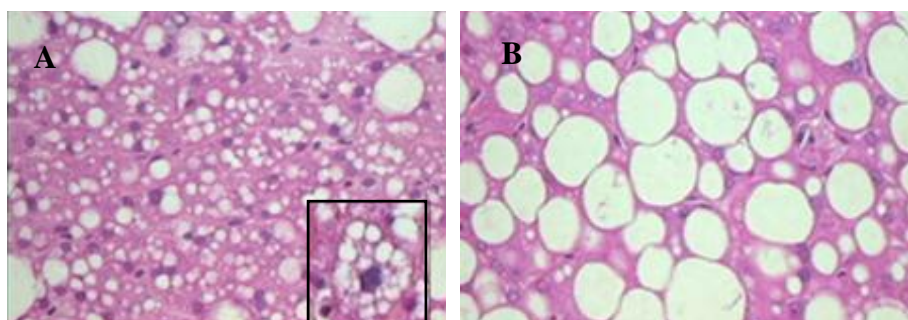


**Figure 17** : Théorie du double hit pour le développement des NAFLD (Buqué *et al.*, 2008).

La prévalence des NAFLD est en forte augmentation dans les pays industrialisés liée aux habitudes alimentaires. Parmi elles, la NASH a été identifiée chez environ 5% de la population générale et chez 20 à 25% des patients obèses (Brunt, *et al.*, 1999 ; James and Day, 1998).

#### a) Stéatose microvésiculaire et macrovésiculaire

Dans la stéatose, les dépôts de lipides à l'intérieur des hépatocytes peuvent constituer des petites gouttelettes que l'on appelle stéatose microvésiculaire. Dans ce cas, le noyau des hépatocytes est central et le cytoplasme est spumeux du fait de vésicules cliniquement vides mesurant moins de 1 mm (cf. figure 18A).

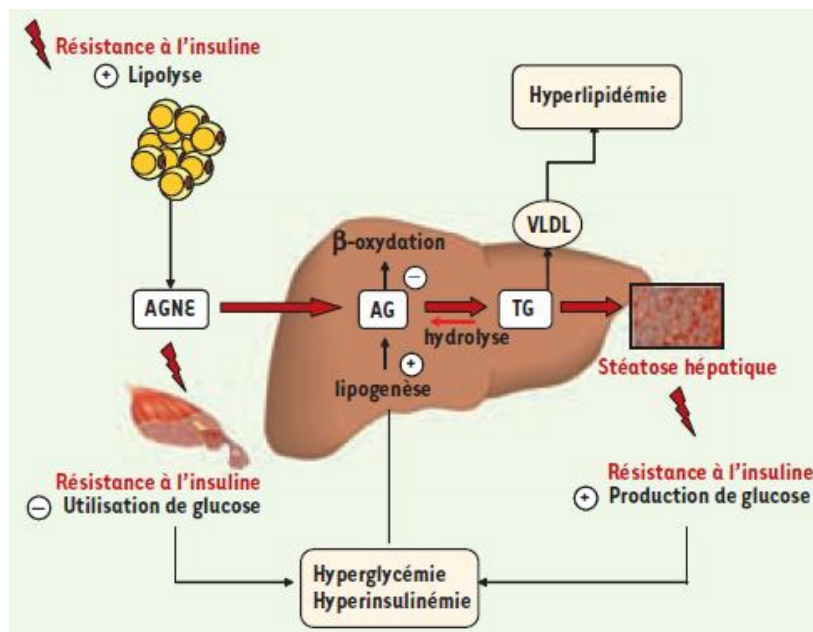


**Figure 18** : Exemple de stéatose micro et macrovésiculaire (D'après le Dr Antonini, CHB- Hôpital Paul Brousse).

En clinique, ce type de stéatose se traduit souvent par des nausées, des vomissements et un ictère dont l'évolution peut conduire à un coma, voire au décès. Si les hépatocytes sont au contraire gonflés et que le noyau est déplacé en périphérie, il s'agit de la stéatose macrovésiculaire (cf. figure 18B) qui sera identifiée chez le patient par une hépatomégalie sans douleur et qui est le plus souvent bénigne.

### b) Formation de la stéatose hépatique

L'insulino-résistance favorise la lipolyse adipocytaire, libérant ainsi une grande quantité d'acide gras non estérifiés (AGNE) qui sont captés par le foie. De plus, l'hyperinsulinisme, l'hyperglycémie mais aussi le stress oxydant favorisent la lipogénèse et la production d'acides gras (AG). Ces derniers et les triglycérides (TG) peuvent alors s'infiltrer de manière diffuse dans le foie en formant des gouttelettes lipidiques ou être excrétés dans le sang sous forme de lipoprotéines de très faible densité ou VLDL (cf. figure 19).



**Figure 19** : Etapes métabolique conduisant à la formation de la stéatose hépatique (Robichon *et al.*, 2008).

## D. Les traitements du diabète

### 1. L'insulinothérapie et ses analogues

L'insulinothérapie s'adresse aux patients diabétiques de type 1 mais aussi aux patients diabétiques de type 2 devenus insulino-requérants.

La production industrielle d'insuline a commencé dès 1923 au Etats-Unis par le groupe pharmaceutique Eli Lilly. Les premières insulines étaient purifiées à partir de pancréas de bœuf et de porc. Dans les années 1930, diverses préparations ont permis d'obtenir des formes d'action prolongée de l'insuline par cristallisation en présence de zinc ou par prolongation du temps de

résorption sous la peau par l'adjonction de protamine (insuline NPH). Les premières synthèses chimiques réussies de l'insuline sont réalisées en 1965. Ce n'est qu'entre 1978 et 1981 que la production industrielle d'insuline « humaine » est rendue possible, par :

- hémisynthèse (par des procédés chimiques, un acide aminé de l'insuline porcine a été remplacé pour obtenir la structure de l'insuline humaine).
- biosynthèse : le gène codant la fabrication de l'insuline est inséré dans un micro-organisme qui va se multiplier et produire l'insuline, qui sera ensuite purifiée.

Ces procédés ont permis de disposer de quantités suffisantes d'insuline en excluant le recours aux sources animales.

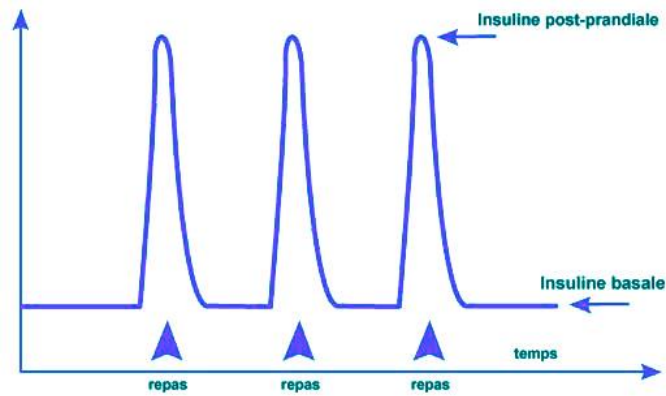
En 1990, les premières variantes d'insuline sont créées par modification de la composition de l'insuline (changement d'un acide aminé par un autre, ajout de radicaux), ce qui permet de modifier la vitesse et la durée d'action : ce sont les analogues de l'insuline produits par biosynthèse. Il existe aujourd'hui 5 classes d'insuline en fonction de leur durée d'action (cf. figure 20).

	Noms	Délai	Durée
<b>Ultrarapides</b>	Humalog® (Lilly)	Immédiat	3 heures
	Novorapid® (Novo Nordisk)		
<b>Rapides</b>	Actrapid® (Novo Nordisk)	20 minutes	5 heures
<b>Semi-lentes ou NPH</b>	Insuman® Basal (Sanofi Aventis)	2 heures	12 heures
	Umuline® NPH (Lilly)		
	Insulatard® NPH (Novo Nordisk)		
<b>Lentes</b>	Lantus® (Sanofi Aventis)	Immédiat	24 heures
	Levemir® (Novo Nordisk)		
<b>Mélanges</b>	Humalog <sup>MD</sup> Mix 2 (Lilly)	Rapide	18 à 24
	Novomix 30® (Novo Nordisk)		heures

**Figure 20** : Caractéristiques des différentes classes d'analogues de l'insuline (liste non exhaustive).

- Les injections

Les injections d'analogues de l'insuline suivent majoritairement un schéma dit "basal/bolus". Cette insulinothérapie associe l'utilisation d'insulines lentes ou semi-lentes à heures fixes pour maintenir le taux basal, à l'utilisation d'insulines rapides ou ultrarapides au moment des repas pour reproduire le pic d'insuline physiologique par un bolus (cf. figure 21). Ce schéma d'insulinothérapie laisse une certaine liberté au patient, mais il n'est pas applicable à tous. Chaque patient est traité au cas par cas ; le type d'insuline (analogues) et la dose choisis étant ceux qui permettent de normaliser la glycémie en évitant les hypoglycémies.

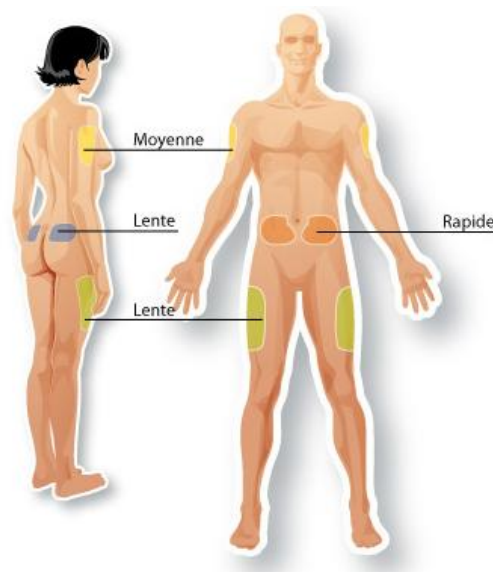


**Figure 21** : Schéma basal/bolus physiologique de l'insuline.

- Les stylos à insuline

De nos jours, l'insuline n'est plus administrée par une aiguille et une seringue mais par des stylos injecteurs. Ces stylos peuvent être pré remplis jetables ou rechargeables à cartouches. Ils contiennent tous de l'insuline à 100 UI/mL. Les stylos couvrent toute la gamme des insulines. Grâce à un cadran analogique ou numérique qui indique les doses à injecter (1 à 2 unités au minimum), les stylos permettent un dosage simple et précis de l'insuline. Ils sont légers, faciles à transporter et très discrets d'utilisation.

Il y a différents sites d'injections préférés en fonction du type d'insuline (cf. figure 22). Les lieux privilégiés sont le ventre, les bras et la cuisse. Les injections répétées peuvent être la cause de douleurs, de réactions allergiques locales et de phénomènes d'atrophie / hypertrophie du tissu adipeux, qui poussent les chercheurs à trouver une alternative aux injections cutanées répétées.



**Figure 22** : Sites d'injections préférés d'insuline ou analogues de l'insuline

(Source : "Mon guide de l'injection" BD, 2009).

- La pompe à insuline externe

La pompe à insuline externe est un petit appareil de la taille d'un téléphone portable, qui est relié à un cathéter sous-cutané. L'injection se fait de manière réglable (réglage du débit d'insuline heure par heure) et continue en suivant un traitement de type "basal/bolus". En effet, de l'insuline rapide ou ultrarapide est administrée en continu, correspondant à l'insuline lente du schéma classique. La pompe permet d'adapter la dose en fonction des besoins, ce qui permet de réduire le nombre d'hypoglycémies sévères, notamment pendant la nuit. Ce "débit de base" est complété par des suppléments d'insuline au moment des repas ou en cas d'hyperglycémie, qui sont également administrés par la pompe.

Les dispositifs comportent un réservoir-pompe externe et une interface de contrôle informatisée, connectée à un appareil de perfusion. Par l'intermédiaire d'un cathéter, le dispositif perfuse en continu une faible quantité d'insuline en sous cutané, selon un schéma programmé par l'utilisateur (cf. figure 23). Cependant le patient doit prendre sa glycémie et réguler le débit d'insuline ce qui reste contraignant.

Ce traitement est adapté à tout le monde. Il est spécialement conseillé aux femmes enceintes et aux enfants. Cependant, il a été rapporté des risques d'acidocétose en cas de panne de la pompe.



**Figure 23** : Photographie d'une pompe à insuline externe, reliée à un cathéter sous-cutané.

- La pompe à insuline implantable

Ce système associe une pompe en forme de disque située sous la peau et un cathéter interne situé dans l'abdomen ; l'ensemble est commandé par un boîtier externe (cf. figure 24).

Le traitement par pompe implantable apporte des avantages complémentaires par rapport au traitement par pompe externe. La voie d'administration de l'insuline est intra-péritonéale au contraire de la première qui est sous-cutanée. De ce fait, l'insuline a une action plus physiologique, elle est résorbée plus rapidement et de façon régulière avec un premier passage hépatique.

Malgré la réduction significative des fluctuations glycémiques et l'amélioration de la qualité de vie des patients diabétiques de type 1 (Renard and Schaepelynck-Belicar, 2007), ce système nécessite un acte chirurgical lourd. De plus, il existe des risques d'obstruction du cathéter car l'insuline peut se cristalliser induisant un défaut de perfusion.

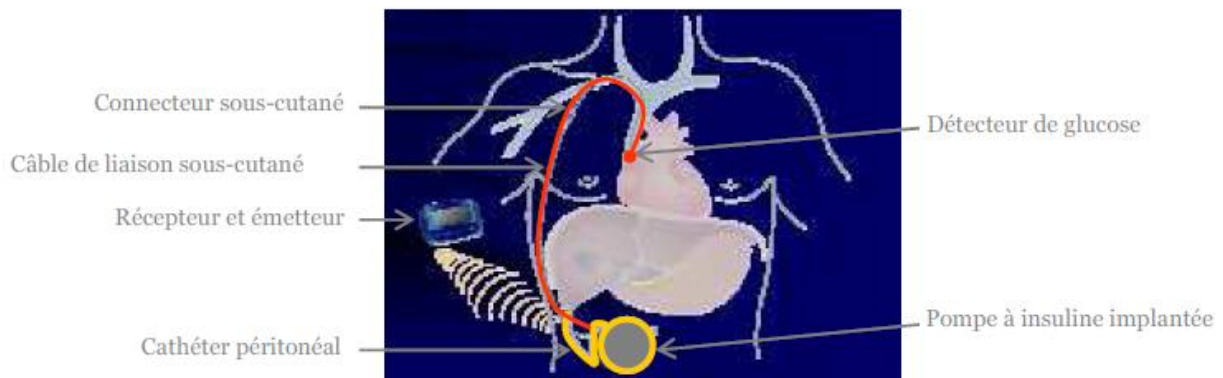




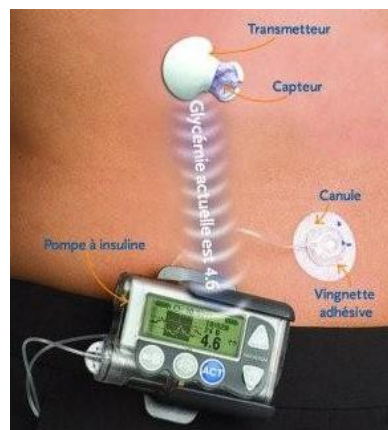
**Figure 24** : Photographie d'une pompe à insuline implantable.

- Le pancréas artificiel (dispositif interne et externe)

Le pancréas artificiel permet de mesurer la glycémie de façon autonome et de s'adapter à l'insulino-sécrétion. Son but est de fonctionner en circuit fermé et autorégulé. Il doit pouvoir réagir à toute modification de la glycémie en ajustant l'administration d'insuline. Le système repose sur la présence d'une pompe à insuline et d'un capteur de glucose. L'information glycémique perçue par le capteur est transmise par un câble sous-cutané à la pompe à insuline, qui va délivrer l'hormone. La pompe peut être implantée (cf. figure 25) ou externe (cf. figure 26). Les systèmes les plus avancés sont en cours d'essai clinique chez le patient diabétique. Ce système semble être bien accepté par les patients et fiable. Il permettrait de réduire ou de supprimer complètement l'intervention humaine dans la prise en charge du diabète.



**Figure 25** : Dispositif du pancréas artificiel implanté.



**Figure 26** : Dispositif du pancréas artificiel à pompe externe.



## 2. [La greffe de pancréas](#)

La greffe de pancréas chez les patients diabétiques de type 1 permet actuellement de normaliser durablement la glycémie en supprimant l'injection d'insuline, avec 82% des patients qui deviennent insulino-indépendants au bout de la première année post-greffe (Sutherland *et al.*, 2001 ; 1999). Toutefois, la greffe de pancréas est limitée à des patients devant subir une immunosuppression et une intervention chirurgicale pour la transplantation d'un autre organe comme le rein. Ce n'est que dans des cas exceptionnels, lorsque tous les autres traitements ont échoué et que les hypoglycémies deviennent invalidantes, que la greffe de pancréas seule est proposée. De plus, il existe d'autres facteurs limitant la greffe de pancréas, comme les problèmes liés au recueil d'organe, les complications chirurgicales liées à la transplantation d'organe et la mise en place d'un traitement immunosuppresseur chronique.

## 3. [La transplantation d'îlots de Langerhans](#)

Lors de la transplantation, les îlots de Langerhans sont injectés dans la veine porte pour qu'ils rejoignent le foie comme site d'implantation. Grâce aux améliorations des techniques d'isolement d'îlots depuis 1967, il est possible d'obtenir une quantité suffisante d'îlots de Langerhans fonctionnels pour envisager la transplantation chez l'homme. En effet, ce n'est qu'à partir de 1988, que la transplantation a connu un véritable essor avec l'équipe de Ricordi. Leur méthode semi-automatique d'isolement d'îlots a permis d'améliorer les préparations de ceux-ci (Ricordi *et al.*, 1988). De plus, en 2000, l'équipe canadienne d'Edmonton a développé un nouveau protocole immunosuppresseur permettant d'obtenir une insulino-indépendance avec normoglycémie chez 80% des patients diabétiques de type 1 ayant reçu une transplantation d'îlots après un an de suivi (Shapiro *et al.*, 2000).

Cependant cette technique se heurte à de nombreuses difficultés. En effet, comme il s'agit d'une greffe, il existe des risques de rejet qui sont accentués par la toxicité du traitement immunosuppresseur. De plus, pour une transplantation, il faut recourir à 2 voire 3 pancréas humains. Ainsi, les problèmes de disponibilité de pancréas limitent la transplantation à un faible nombre de patients.

## 4. [Les mesures hygiéno-diététiques](#)

### a) [L'alimentation](#)

Pour améliorer le contrôle glycémique des patients diabétiques (type 1 et 2), il est nécessaire de modifier et contrôler leur régime alimentaire. Une réduction du poids est souvent nécessaire. Cette modification du régime alimentaire se fait avec l'accompagnement de médecins nutritionnistes ou de diététiciens. L'alimentation du diabétique doit être équilibrée parmi les 3 repas

quotidiens et comporter des glucides (environ 50% de l'apport énergétique total), des lipides (35%), des protéines (15%). Les glucides doivent provenir d'aliments à faible index glycémique comme le riz, les pâtes, le pain et les légumes secs. Les graisses seront limitées de préférence aux graisses d'origine végétale avec au maximum 5 à 10% d'acides gras saturés et 20 à 25% d'acides gras insaturés. Les sucres rapides tels que les boissons sucrées, les confitures, les confiseries et les glaces sont à bannir, de même que le grignotage. Un régime hypocalorique permet de réduire plus facilement le surpoids. En effet, des études indiquent que la meilleure alimentation pour prévenir la prise de poids, l'obésité, le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires est une alimentation pauvre en graisse et en boissons sucrées associée à une grande quantité de glucides, de fibres, de céréales et de protéines (Astrup, 2005).

#### b) L'activité physique

Associée à des règles alimentaires spécifiques, la pratique d'une activité physique régulière est indispensable (marche, vélo, natation...). Idéalement, une activité de 45 minutes, 3 jours par semaine voire tous les jours est requise. Cela permet de diminuer les besoins en insuline et l'insulino-résistance, de diminuer le taux de triglycérides par augmentation des récepteurs aux LDL et d'augmenter la dépense énergétique. Cependant, pour un patient diabétique de type 1, l'exercice physique ne doit pas être intense car il augmente le risque d'hypoglycémie.

### 5. Les traitements médicamenteux

#### a) Les antidiabétiques oraux (ADO)

En général, les ADO sont prescrits après un échec des règles hygiéno-diététiques durant 3 à 6 mois. Il existe 5 classes d'ADO, le traitement étant adapté à chaque patient diabétique :

- Les biguanides (Metformine, Glucophage®500, 850, 1000) : ils réduisent l'insulino-résistance en favorisant l'action de l'insuline sur les tissus-cibles, en inhibant la néoglucogenèse hépatique et en diminuant l'absorption intestinale de glucose. Ils sont indiqués chez des patients en surcharge pondérale et sont préconisés chez des patients sans surcharge pondérale ou en association avec un autre ADO.
- Les sulfamides hypoglycémiantes : ils stimulent la sécrétion d'insuline (Diamicon®).
- Les glitazones (pioglitazone et rosiglitazone) : ce sont des molécules qui améliorent la sensibilité à l'insuline et la fonction  $\beta$  cellulaire, en diminuant l'insulino-résistance par action sur les récepteurs PPAR $\gamma$ .
- Les inhibiteurs des alpha-glucosidases (Glucor®) ralentissent l'absorption digestive des glucides complexes.
- Les glinides : ce sont des insulino-sécréteurs qui stimulent le pic précoce d'insulino-sécrétion.

Les ADO sont administrés majoritairement à des patients diabétiques de type 2, mais certains ADO sont administrés chez des patients diabétiques de type 1, comme les biguanides et les inhibiteurs des alpha-glucosidase, pour retarder l'absorption des glucides par l'intestin.

### b) Les incrétines et incrétino-mimétiques

Les incrétines sont des peptides produits par les cellules L de l'intestin, souvent associées à des hormones et jouent sur la satiété. La plus connue des incrétines est le GLP-1 (Glucagon-like peptide 1). Il est sécrété par les cellules du jéjunum et de l'iléon en présence de nutriments dans l'intestin, ce qui stimule la sécrétion d'insuline et diminue la néoglucogenèse hépatique. Cette hormone intéressante a malheureusement une demi-vie très courte car elle est rapidement dégradée par l'enzyme dipeptidylpeptidase-4 ou DPP-4.

L'intérêt des scientifiques s'est alors porté sur le maintien de cette enzyme en développant :

- des analogues du GLP-1 résistants à la dégradation par l'enzyme DPP-4, ce qui permet d'améliorer le contrôle de la glycémie et d'avoir un rôle positif sur la perte de poids,
- des inhibiteurs de la DPP-4, permettant ainsi de retarder la dégradation du GLP-1.

La régulation de la glycémie chez le patient diabétique doit être fine et permettre le retour à une homéostasie glycémique. Malgré tous les médicaments, traitements et mesures hygiéno-diététiques qui ont été présentés dans ce chapitre, il reste difficile de réguler le taux de glucose dans le sang chez ces patients.

Cette instabilité glycémique et l'hyperglycémie chronique qui y est associée, favorisent le développement du stress oxydant et des complications chez le patient diabétique. Le chapitre suivant présentera les liens étroits qui existent entre le diabète et ce stress oxydant.

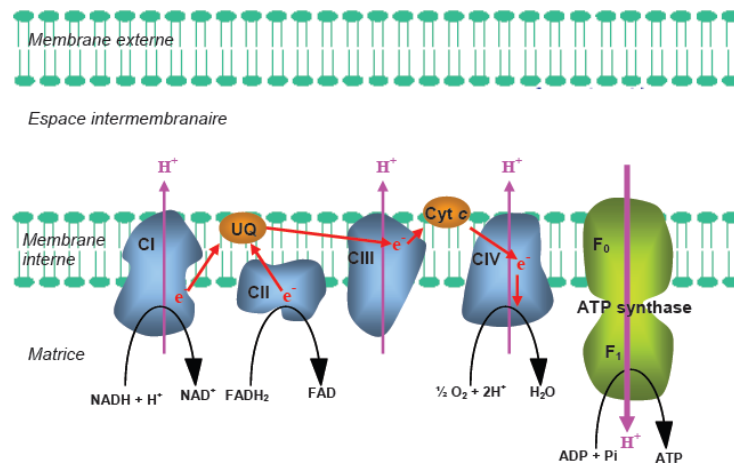
## II. Le stress oxydant et le diabète

### A. Le stress oxydant et les systèmes de défenses

#### 1. Définition du stress oxydant

Dans une cellule eucaryote normale, l'énergie nécessaire à son fonctionnement se fait de façon aérobie en utilisant des réactions d'oxydo-réduction. Ces réactions font intervenir des oxydants ou accepteurs d'électrons et des réducteurs ou donneurs d'électrons. Elles ont lieu dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie, qui fournit 90% de l'énergie nécessaire (Rolfe and Brown, 1997). Dans cet organite intracellulaire, l'oxygène est l'accepteur final d'électron après une cascade de réactions d'oxydo-réduction, faisant intervenir quatre complexes protéiques. Lorsque l'oxygène

est transformé en molécule d'eau, cela permet de générer de l'ATP (adénosine triphosphate), molécule à haut potentiel énergétique (cf. figure 27).



**Figure 27 : Chaîne respiratoire de la mitochondrie.**

Cependant 2 à 3% de l'oxygène n'est pas réduit en eau ; il est dévié pour former des radicaux libres ou des espèces dérivées de l'oxygène très réactives (Koppenol, 2001). Ces entités oxydantes sont physiologiquement maintenues en équilibre par de nombreux systèmes antioxydants. Quand un déséquilibre apparaît entre molécules pro-oxydantes et antioxydantes, en faveur des entités oxydantes, on parle alors de **stress oxydant** (Sies, 1991). Il peut être la cause de système antioxydant défectueux ou d'une quantité d'entités oxydantes produites trop importante.

## 2. Les entités oxydantes et leur production

Les entités oxydantes sont souvent des radicaux libres, c'est-à-dire des espèces chimiques qui possèdent un électron célibataire ou non apparié sur la dernière couche électronique. Cet électron célibataire n'est pas compensé ce qui provoque des dérèglements dans leur champs magnétique, rendant ainsi ces espèces très instables. Elles vont alors tenter de récupérer des électrons sur d'autres molécules comme les substrats biologiques, en les oxydant. Il existe majoritairement trois grandes familles d'espèces réactives :

- Les espèces réactives de l'oxygène ou ROS (Reactive Oxygen Species), issues de la réduction incomplète de l'oxygène, dont le précurseur est l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ . Il est à l'origine de la formation d'autres ROS tel que le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  et le radical hydroxyl  $OH^{\cdot}$ . L'oxygène singulet  $^1O_2$  est également une entité oxydante.
- Les espèces réactives de l'azote ou RNS (Reactive Nitrogen Species) qui donnent entre autres des peroxynitrites ( $ONOO^-$ ), du monoxyde d'azote  $NO^{\cdot}$  et le radical peroxy ( $ROO^{\cdot}$ ).
- Les espèces réactives du chlore ou RCS (Reactive Chlorine Species) comme l'acide hypochlorique,  $HOCl$ .

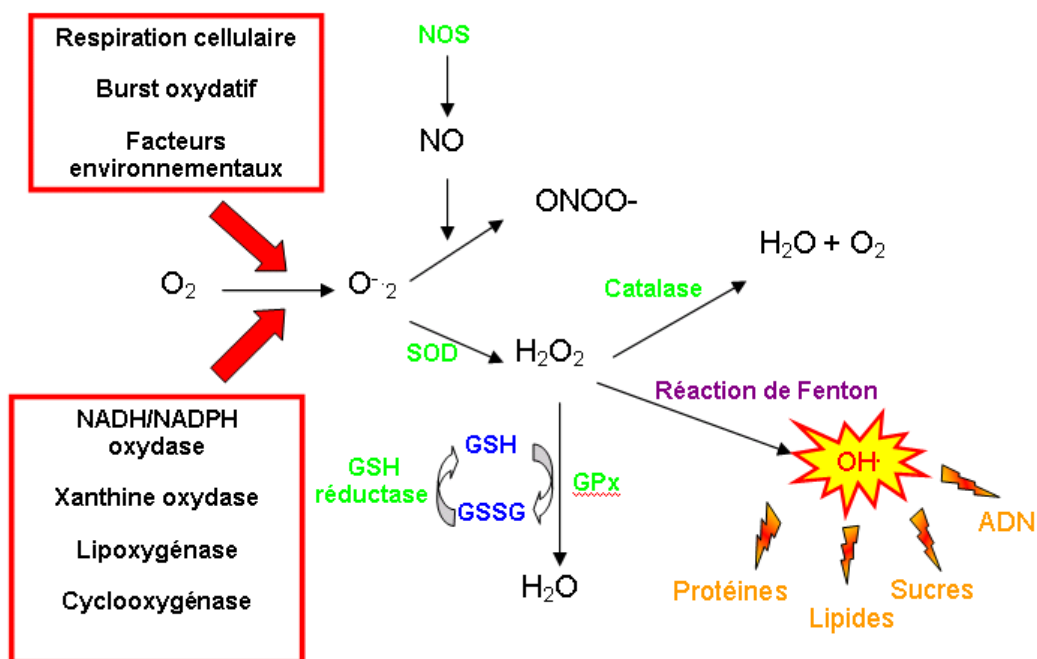
Enfin, il existe d'autres variétés d'entités oxydantes ou de radicaux, comme par exemple l'acide hypobromique, HOBr.

a) La production des entités oxydantes au niveau cellulaire

Le précurseur des ROS, l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  peut provenir de plusieurs sources cellulaires. Il est formé après réduction de l'oxygène  $O_2$  par un électron et en présence d'un cofacteur NADPH. Cet anion est très instable et peut traverser la membrane plasmique (Mao and Poznansky, 1992). Les différentes enzymes permettant cette réaction sont : la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, les cyclo-oxygénases ou COX, les lipo-oxygénases, les Nitric Oxyde Synthases (NOS), les enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochrome P450) et celles de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie (Cai and Harrison, 2000) (cf. figure 29).

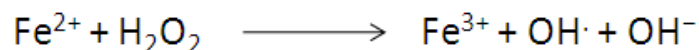
Les NOS génèrent normalement du monoxyde d'azote NO, mais lorsque la concentration de son cofacteur, la tétrahydrobioptéridine (BH4) diminue, elle produit  $O_2^{\cdot-}$ . De plus, le NO formé par les NOS peut réagir avec l'anion superoxyde pour former des peroxynitrites, un composé oxydant secondaire.

Les superoxydes dismutase (SOD) vont ensuite dismuter l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  qui est relativement stable et peut diffuser au travers des membranes. Cette molécule donne ensuite *via* la réaction de Fenton (non enzymatique) une entité très réactive, le radical hydroxyle,  $OH^{\cdot}$ . Le peroxyde d'hydrogène peut également entrer dans une voie alternative et être converti en eau par les enzymes catalase et glutathion peroxydase (cf. figure 28).



**Figure 28** : Schéma récapitulatif des sources des ROS, des enzymes impliquées dans la défense antioxydante et des cibles biologiques (source personnelle).

La réaction de Fenton implique des métaux de transition. L'oxydation de l'ion ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en ion ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en présence de peroxyde d'oxygène  $\text{H}_2\text{O}_2$  génère le radical hydroxyle, le plus puissant oxydant de la famille des ROS, car il ne peut être détruit enzymatiquement. A noter que la réaction de Fenton peut se faire directement à partir de l'anion superoxyde pour générer le même radical (cf. figure 29).



**Figure 29** : Réaction de Fenton.

#### b) [Les facteurs environnementaux comme source de ROS](#)

Les facteurs environnementaux contribuent également à la formation d'entités radicalaires ou de ROS. Une production beaucoup trop importante d'entités réactives est observée dans le cas d'intoxication aux métaux lourds ou dans les phénomènes d'irradiation. En effet, des études menées sur des plasmas d'enfants vivant dans des zones pétrochimiques polluées en Serbie ont montré une augmentation de 26% d'un marqueur de peroxydation lipidique (malondialdéhyde) et une diminution de 11% de l'activité de l'enzyme SOD (Hatch, 2010). De plus, des métaux lourds comme le cadmium, le mercure ou l'arsenic sont souvent trouvés dans l'environnement. L'Homme y est de plus en plus exposé que ce soit par le sol, l'air ou l'eau. Des études ont montré que ces métaux lourds ont la capacité de générer des espèces radicalaires actives, provoquant des dommages cellulaires importants en diminuant les activités enzymatiques et en lésant la bicouche lipidique et les molécules d'ADN (Flora *et al.*, 2008).

Les radiations UV, notamment les UV B, provoquent des dommages au niveau de l'ADN (Sutherland, 1980). Les champs électriques, l'apport de xénobiotiques pro-oxydants et la présence de cytokines pro-inflammatoires sont également des sources de stress oxydant. En outre, des résidus de la fumée de cigarette, l'alcool ou même certains médicaments sont une source importante de radicaux libres par oxydation des composés au niveau du cytochrome P450 (Favier, 2003).

### 3. [Rôle physiologique des entités oxydantes](#)

De façon physiologique, les espèces réactives radicalaires ( $\text{OH}\cdot$ ) ou non ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), existent dans les cellules et dans les tissus à des concentrations faibles mais mesurables (Halliwell and Gutteridge, 1989 ; Sies, 1993). Elles protègent, régulent la cellule et permettent de maintenir une certaine homéostasie de l'état redox de l'organisme. Lorsqu'elles sont produites dans un compartiment cellulaire spécifique, elles peuvent participer au fonctionnement de certaines enzymes, intervenir dans la défense immunitaire, agir en tant que second messenger cellulaire,

intervenir dans les voies de transduction du signal et ainsi réguler les fonctions cellulaires (Dikalov *et al.*, 2007).

#### a) Messageurs intra et extracellulaire

Les radicaux libres ou les espèces réactives constituent par eux-mêmes un système de transmission de signaux, qui serait apparu très tôt dans la vie (Favier, 2003). Ils peuvent être considérés comme des messageurs intra et extracellulaire car ils permettent d'induire des réponses cellulaires face à de nombreux stress. Ces stress peuvent être d'origine thermique ou induits par des radiations comme les ultraviolets ou par des xénobiotiques (pesticides, médicaments), ce qui conduit à l'expression de gènes de défenses (SOD à manganèse, catalase...).

Ils participent aux cascades de signalisation intracellulaire dans de nombreuses cellules comme les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et le tissu thyroïdien (Dröge, 2002).

#### b) Régulation du tonus vasculaire et autre fonction du NO

Le monoxyde d'azote (NO) extracellulaire ou produit par les NOS, a la capacité de se fixer et d'activer la guanylate cyclase, produisant un second messageur important à l'origine de nombreuses réponses physiologiques, le GMPc (Gerzer *et al.*, 1981). Dans les cellules musculaires lisses, l'activation de la protéine kinase GMPc dépendante permet la phosphorylation et l'activation de canaux potassiques calcium dépendants responsables de la relaxation des vaisseaux (Archer *et al.*, 1994). Le NO joue également un rôle dans l'inhibition de l'adhésion plaquettaire (Radomski *et al.*, 1987).

#### c) Défense immunitaire et « Burst Oxydatif »

Dans les leucocytes et notamment les polynucléaires neutrophiles (PN), les entités oxydantes participent très activement à la défense de l'organisme par leur action toxique notamment sur les bactéries par le phénomène de « burst oxydatif ». Dans un environnement inflammatoire, les PN sont attirés par des facteurs chimiotactiques et atteignent le lieu de l'infection par diapédèse. Ils phagocytent les microorganismes dans le phagosome qui fusionne avec les granules lysosomiales pour former le phagolysosome à l'intérieur duquel les particules infectieuses sont digérées. Cette activation des neutrophiles permet la libération de protéines cationiques, la lactoferrine et des enzymes hydrolytiques et protéolytiques, et implique l'isoforme phagocytaire de la NADPH oxydase, la myéloperoxydase ou MPO (Serteyn, 2003) et la NOS. La NADPH oxydase relargue une grande quantité d'anions superoxydes qui sont ensuite dismutés en peroxyde d'hydrogène dans la fente du phagosome qui contient du chlorure à forte concentration. Ainsi, le peroxyde d'hydrogène et le chlorure vont être utilisés par la MPO pour former de l'acide hypochlorique (HOCl), qui peut

réagir avec l'anion superoxyde pour former le radical hydroxyle, qui va exercer son attaque oxydante (Serteyn, 2003).

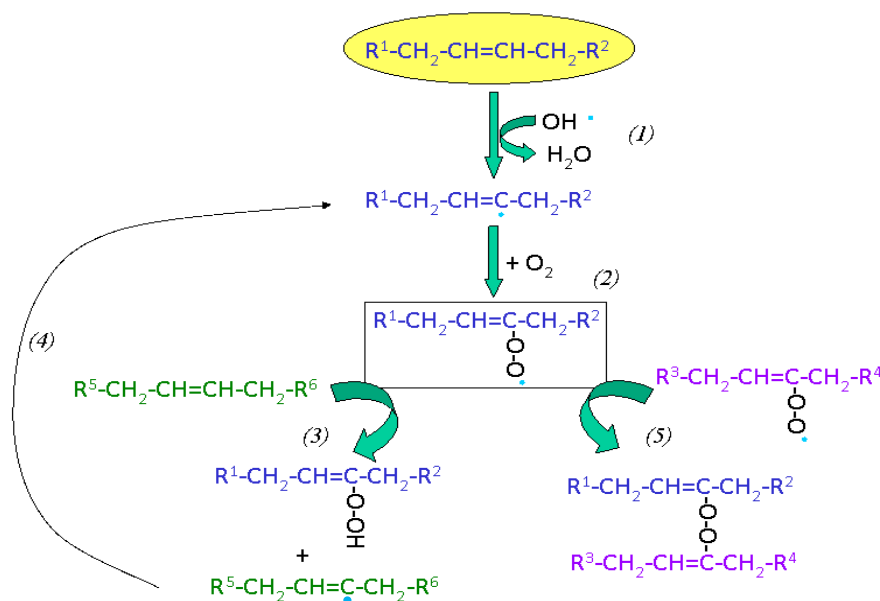
Le but est d'éliminer les micro-organismes en produisant des espèces oxydantes capables de détruire les capsules polysaccharidiques bactériennes résistantes aux enzymes protéolytiques (Babor, 1999 ; Babor, 2000). Le burst oxydatif est la première ligne de défense dans un environnement pathogène (Dröge, 2002).

#### 4. Les cibles biologiques du stress oxydant

Les entités oxydantes étant très réactives, elles réagissent avec les premières molécules qu'elles rencontrent. Elles ont comme cibles les lipides, les acides nucléiques, les protéines et les sucres (Beckman and Ames, 1998).

##### a) Les lipides

Les cibles des ROS sont principalement les acides gras polyinsaturés, en raison de la présence de nombreuses doubles liaisons, comme l'acide linoléique ou l'acide eicosapenténoïque. Les réactions radicalaires sont à l'origine de la peroxydation lipidique qui se traduit *in vitro* par le rancissement. Le mécanisme radicalaire comporte trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison (Halliwell and Gutteridge, 1989).



**Figure 30** : Schéma de peroxydation lipidique (D'après Douste-Blazy and Mendy, 1988).

L'initiation débute avec un radical hydroxyle (1) qui attaque l'acide gras pour former un site radicalaire sur le carbone. L'oxygène, par sa nature biradicalaire réagit sur ce site (2) et assure la propagation. Ensuite le radical peut être transféré sur un autre acide gras, formé un hydroperoxyde (3) et l'acide gras radicalaire repart dans le circuit de peroxydation (4). Le radical formé à l'étape 2 peut se combiner avec une autre espèce radicalaire et assurer la terminaison par formation d'une liaison covalente.



La phase d'initiation débute par une cassure homolytique d'une liaison sous l'arrachement d'un hydrogène (cf. figure 30). Pour réaliser cette cassure, il faut un initiateur qui peut être une molécule oxydée sous forme radicalaire. Les atomes impliqués partent chacun avec un électron célibataire (atome de carbone d'une molécule d'acide gras, par exemple) ; il y a alors libération d'une molécule d'eau et création d'un site radicalaire au sein de la molécule. L'électron célibataire va se déplacer dans la molécule et provoquer des réarrangements. La propagation est réalisée par la fixation d'une molécule d'oxygène, qui réagit rapidement sur le site radicalaire. Le radical formé peut soit réagir avec un autre acide gras formant ainsi un hydroperoxyde et un nouveau site radicalaire qui assure la propagation, soit réagir avec une autre entité radicalaire pour reformer une liaison covalente.

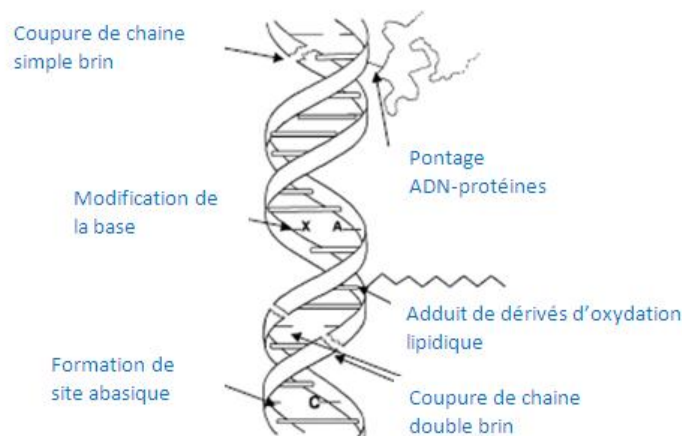
L'hydroperoxyde formé au cours de la réaction peut également être oxydé en présence de fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ou d'ion cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) pour former des alcanes volatiles rapidement éliminés lors de la respiration (Favier, 2003) ou des aldéhydes comme le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE). Ces agents alkylants très puissants peuvent former des adduits avec les protéines aux niveaux des résidus lysine, histidine ou cystéine, formant ainsi des bases de Schiff et des pontages intra et intermoléculaires (Requena *et al.*, 1996).

L'attaque des lipides concerne les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires. Dans le premier cas, l'oxydation des lipides ou des lipoprotéines circulants aboutit à la formation de LDL (lipoprotéines de densité légère) oxydés qui peuvent être captés par les macrophages et former des dépôts lipidiques de la plaque d'athérome. Dans le second cas, l'attaque des phospholipides membranaires modifie la fluidité de la membrane et perturbe le fonctionnement des récepteurs et transporteurs se trouvant à leur surface (Favier, 2003).

L'accumulation du MDA, associé aux lipides, va former des dépôts d'un pigment fluorescent de lipofuschines caractéristiques des tissus des sujets âgés (Chowdhury *et al.*, 2004). Le MDA, le 4-HNE ou les LDL-oxydés sont retrouvés en grandes quantités lors des différents stades de l'athérosclérose, lors d'atteinte chronique rénale et rétinienne chez les patients diabétiques, obèses et insulino-résistants (Palinski *et al.*, 1989 ; Torzewski *et al.*, 1998 ; Makita *et al.*, 1996 ; Fraley and Tsimikas, 2006 ; Grimsrud *et al.*, 2007).

#### b) Les acides nucléiques

Les dommages médiés par le stress oxydant au niveau de l'ADN sont de cinq types (cf. figure 31) : l'oxydation des bases, la formation de sites abasiques, d'adduits intra-caténaires, des cassures des brins et des pontages ADN-protéines (Cadet *et al.*, 2002).



**Figure 31** : Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires (d'après Favier, 2003).

Au niveau de l'ADN, la guanine est très sensible à l'oxydation. Des bases modifiées telles que la 8-oxoguanine, 8-nitroguanine et 8-oxoadénine peuvent entraîner des coupures d'ADN ou des mésappariements ayant pour conséquence des mutations de l'ADN. Les attaques radicalaires peuvent avoir lieu au niveau de la liaison entre des désoxyriboses et des bases puriques et pyrimidiques, formant un site abasique ou attaquer directement le désoxyribose générant des coupures de chaîne simple brin (Favier, 2003).

Des adduits peuvent également se former avec des aldéhydes mutagènes générés au cours de la peroxydation lipidique. Par exemple, le malondialdéhyde peut se combiner avec des bases comme la guanine et former un adduit MDA-guanine. Les protéines présentes au niveau de l'ADN comme les histones ou les enzymes de réplication, sont la cible également des entités radicalaires entraînant la formation d'adduits ou de pontage (Favier, 2003).

Les coupures simples ou doubles brins de l'ADN responsables de mutations peuvent aboutir à la mort cellulaire (Imlay and Linn, 1988 ; Zastawny *et al.*, 1998) si les systèmes de réparation par excision de bases (BER) ou de nucléotides (NER), par exemple, sont dépassés et ne permettent plus la réparation de la cellule.

### c) Les protéines

Les protéines subissent des modifications au cours du stress oxydant, soit sous l'action des radicaux libres oxygénés, soit en présence de métaux de transition (Stadtman, 1990 ; 1993). Il s'ensuit plusieurs types de modifications : fragmentation de la protéine, oxydation des chaînes latérales des acides aminés et formation de liaisons croisées entre deux protéines (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2001).

Tous les acides aminés peuvent être oxydés ; ainsi la méthionine peut se transformer en méthionine sulfoxyde et la tyrosine en nitrotyrosine. Les protéines constituées de ces acides aminés

oxydés peuvent l'être de façon irréversible ou non. En effet, dans le cas de l'oxydation des méthionines, celles-ci peuvent être régénérées par des enzymes méthionine sulfoxyde réductase. L'attaque des radicaux sur les fonctions thiols (SH) des cystéines conduit à la formation de ponts disulfures (S-S) modifiant la structure de la protéine. Ces modifications peuvent conduire à la perte de la fonction ou de l'activité de la protéine (Dean *et al.*, 1997) et il en résulte que les protéines modifiées deviennent plus sensibles à l'action des protéases et sont donc éliminées par le protéasome.

#### d) [Les sucres](#)

En présence de métaux, l'oxydation du glucose peut libérer des céto-aldéhydes, du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et des anions superoxydes (OH<sup>-</sup>), et entraîner la coupure de protéines et leur glycation par attachement du céto-aldéhyde (Wolff *et al.*, 1989) formant un dérivé de produit de glycation avancé (AGE, Advanced Glycation End product).

### 5. [Le stress oxydant et les pathologies](#)

Une production importante de ROS joue un rôle dans la pathogénèse de nombreuses maladies. Ils sont impliqués dans l'ischémie/re-perfusion, les maladies neurodégénératives, les cancers, l'infarctus, le diabète, l'hypertension mais aussi dans la formation des lésions vasculaires de l'athérosclérose (Madamanchi *et al.*, 2005 ; Mueller *et al.*, 2005).

#### a) [L'ischémie re-perfusion](#)

Ce phénomène a beaucoup été décrit au niveau du cœur (Ceconi *et al.*, 2003). Lors de l'ischémie, le glucose sanguin chute comme la glycolyse, la phosphorylation oxydative et la production d'ATP. La déplétion en ATP provoque d'une part, une accumulation de l'AMP responsable d'une accumulation d'hypoxanthine, et d'autre part, une diminution de l'activité de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase nécessaire au maintien du gradient d'ions sodium et potassium entre la cellule et le compartiment extracellulaire. Ce maintien n'étant plus assuré, une dépolarisation membranaire a lieu provoquant un entrée massive de Ca<sup>2+</sup> dans la cellule (Katsura *et al.*, 1993) à l'origine de la formation de ROS au niveau mitochondrial et de l'activation d'une protéase calcium dépendante comme la calpaïne (Budd, 1998). Les ROS associées à la calpaïne, vont convertir la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase dont l'accepteur final d'électron est l'oxygène générant ainsi des anions superoxydes et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sorg, 2004).

#### b) [L'athérosclérose](#)

L'athérosclérose est une atteinte des grosses et moyennes artères par une accumulation de graisses dans la paroi artérielle. Cette accumulation de graisses forme les plaques d'athérome, qui sont composées de LDL oxydées. Suite à une réponse inflammatoire, les monocytes et les LDL

pénètrent dans le sous-endothélium vasculaire et les radicaux libres attaquent les LDL. Les LDL oxydées sont captées par les macrophages (monocytes activés), qui se transforment en cellules spumeuses. Celles-ci vont alors dégénérer et former une plaque. Les ROS participent également à la formation de la plaque fibreuse. Ils sont produits par des enzymes activées lors de ce processus (NADPH oxydase, NOS, xanthine oxydase). Ensuite, des éléments thrombogènes de la plaque sont libérés et activent les plaquettes circulantes. Il en résulte la formation d'un thrombus par cascade de coagulation (Sorg, 2004).

#### c) [Le cancer](#)

Les espèces réactives semblent également jouer un rôle non négligeable dans la cancérogenèse, puisqu'elles peuvent être responsables de mutations dans l'ADN, ce qui constitue un facteur de risque dans l'initiation et le développement du cancer (Migliore and Coppedè, 2002). Les radicaux libres interviennent dans l'activation des pro-carcinogènes en carcinogènes, créant des lésions de l'ADN, amplifiant les signaux de prolifération et inhibant des gènes suppresseurs de tumeurs, comme p53 (Favier, 2003).

#### d) [Les maladies neurodégénératives](#)

Des études ont montré que dans des cerveaux de patients souffrant de la maladie d'Alzheimer, beaucoup de marqueurs du stress oxydant étaient retrouvés et il a été montré qu'ils aggravent les symptômes associés à la maladie (Rao and Balachandran, 2002 ; Hardy and Selkoe, 2002 ; Mattson, 2002). Dans la maladie de Parkinson, c'est la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire qui est responsable de la pathologie. L'auto-oxydation de la dopamine produit des anions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène dans cette même zone cérébrale. Les neurones dopaminergiques soumis à de fortes concentrations en ROS peuvent dégénérer si les défenses antioxydantes ne sont pas suffisantes (Sorg, 2004).

#### e) [L'âge](#)

Deux théories expliquent le vieillissement, l'une génétique et l'autre métabolique. La première rend compte de la diminution des télomères aux cours de la réplication cellulaire et la seconde de l'accumulation des déchets métaboliques produits par l'organisme. Les marqueurs du stress oxydant sont élevés chez les personnes âgées (Finkel and Holbrook, 2000). Le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production par les mitochondries de radicaux (Sohal *et al.*, 2002).

#### f) [Le diabète](#)

Lors de la pathologie diabétique, l'hyperglycémie constitue un stress oxydant (Leverve, 2003). Elle est responsable de l'augmentation de la glycolyse qui par accroissement du potentiel de

membrane mitochondriale augmente la formation de radicaux. De plus, elle inhibe la glyceraldéhyde-3 phosphate déshydrogénase ce qui diminue la formation du cofacteur réduit NADPH, H<sup>+</sup> essentiel à la régulation de l'homéostasie redox (Berger, 2006). Le rôle du stress oxydant dans cette maladie sera détaillé dans le chapitre suivant.

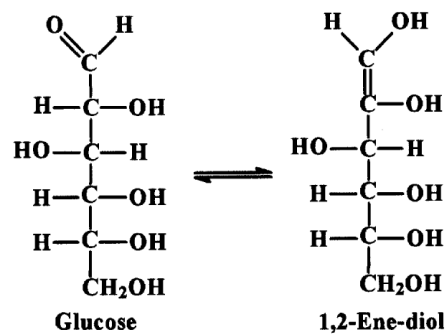
## B. Implications du stress oxydant dans le diabète et pathologie associée

### 1. Glutotoxicité liée à l'hyperglycémie

Les mécanismes de la toxicité du glucose au niveau des tissus cibles des complications du diabète sont multiples (Benhamou, 1991). Le glucose exerce son effet toxique et forme des ROS par différents mécanismes. Il a été montré chez des rats Goto-Kakizaki (GK), diabétiques de type 2, non obèses, une augmentation des marqueurs du stress oxydant suite à une hyperglycémie (Ihara, *et al.*, 1999). Les mécanismes conduisant à la formation de ROS sont notamment, le phénomène d'auto-oxydation du glucose, la voie des polyols, la voie de la PKC et la glycation des protéines avec formation des produits avancés de fin de glycation (AGEs).

#### a) L'auto-oxydation du glucose

L'auto-oxydation du glucose a été décrite par Wolff et Dean (1987). Le glucose dans sa forme linéaire (projection de Fischer) possède une fonction aldéhyde et une fonction hydroxyle adjacente en équilibre avec la forme ène-diol (cf. figure 32).



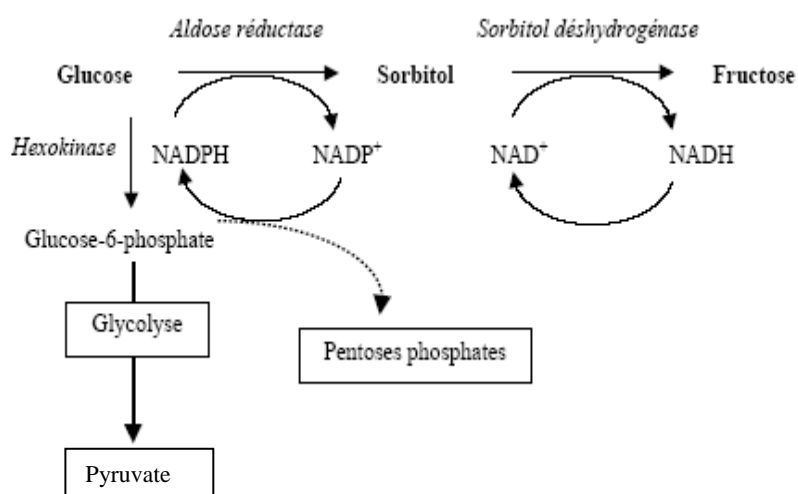
**Figure 32** : Représentation selon la projection de Fischer du glucose et de sa forme ène-diol (Thornalley *et al.*, 1999).

C'est sous cette dernière forme que le glucose est capable de façon isolée de s'oxyder en présence de métaux de transition, aboutissant à la formation d'un radical anionique ène-diol. Ce radical peut ensuite réagir avec l'oxygène pour libérer des anions superoxydes. Au cours de cette réaction, il y a formation d' $\alpha$ -cétoaldéhyde, qui peut réagir avec des métaux de transition *via* la réaction Fenton pour former des radicaux hydroxyles très réactifs (Hunt *et al.*, 1988 ; Wolff *et al.*, 1991 ; Hunt and Wolff, 1991).

## b) La voie des polyols

A l'état de normoglycémie, le glucose est transformé par l'hexokinase en glucose-6-phosphate pour rejoindre la glycolyse et la voie des pentoses phosphates. Cependant, dans le cas d'une hyperglycémie, l'hexokinase est saturée (Gonzalez *et al.*, 1984). Le glucose, de ce fait, s'accumule dans les tissus périphériques et active une voie accessoire, la voie des polyols.

Dans cette voie, le glucose est transformé en sorbitol par l'aldose réductase, qui n'est activée qu'en présence d'une hyperglycémie, car elle possède une faible affinité pour le glucose (King and Brownlee, 1996). La réaction a lieu en présence du cofacteur NADPH, H<sup>+</sup> issu de la voie des pentoses phosphates. Le sorbitol est ensuite transformé en fructose par la sorbitol déshydrogénase, dont le cofacteur est le NAD<sup>+</sup> (cf. figure 33). Le sorbitol, qui ne peut pas franchir la membrane plasmique, s'accumule dans la cellule, et augmente la pression osmotique, entraînant une hyperosmolarité intracellulaire (Burg, 1995). La production accrue de fructose par cette voie peut également stimuler la formation des AGEs grâce au plus grand pouvoir réducteur du fructose par rapport au glucose (Suarez *et al.*, 1988).

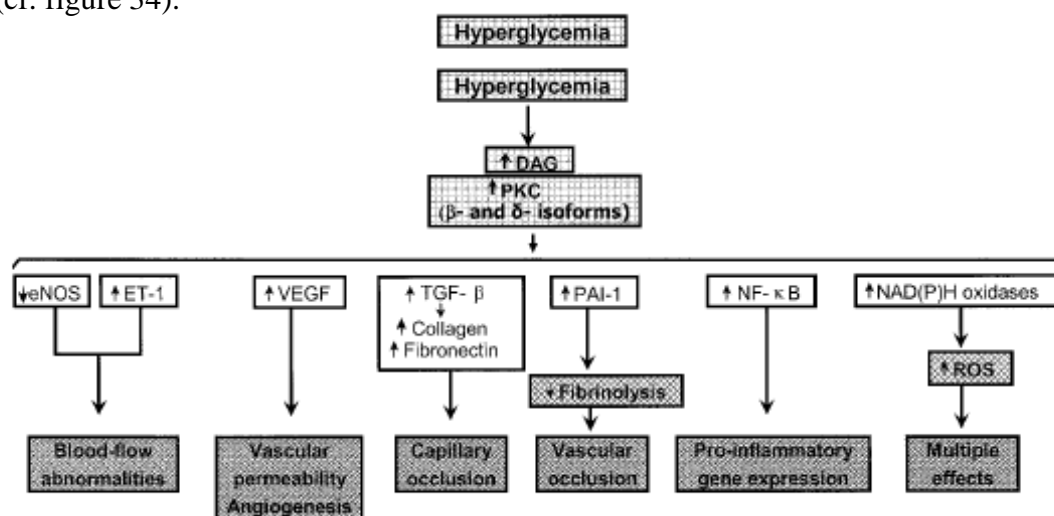


**Figure 33** : Voie des polyols et autres voies du catabolisme du glucose (Thèse de C. Januel, 2003).

L'activation de cette voie peut avoir des effets délétères (Brownlee, 2001). La principale conséquence est la modification du statut redox intracellulaire résultant de la baisse en NADPH, H<sup>+</sup>, au détriment du fonctionnement de nombreuses enzymes antioxydantes comme la glutathion-réductase, l'ascorbate-réductase et la NOS qui utilisent ce cofacteur (Bravi *et al.*, 1997). Cette baisse de cofacteur et de GSH réduit augmente la sensibilité de la cellule au stress oxydant (Brownlee, 2005).

### c) La voie de la PKC

Une hyperactivité de la protéine kinase C au cours du diabète dans de nombreux tissus est une des hypothèses avancées (King and Brownlee, 1996). L'hyperglycémie induit une synthèse accrue de diacylglycérol (DAG) à partir des intermédiaires de la glycolyse, qui est un cofacteur activateur des différentes isoformes de la PKC (Xia *et al.*, 1994). L'augmentation de l'activité de l'enzyme induit une augmentation de l'expression des gènes néfastes pour la cellule et au contraire, diminue celle des gènes bénéfiques. En effet, elle augmente l'expression de facteurs vasoconstricteurs (endothéline-1) en diminuant ceux vasodilatateurs (NO). Elle induit également l'expression de gènes pro-inflammatoires et augmente la production de ROS par la NADPH oxydase (Brownlee, 2005) (cf. figure 34).



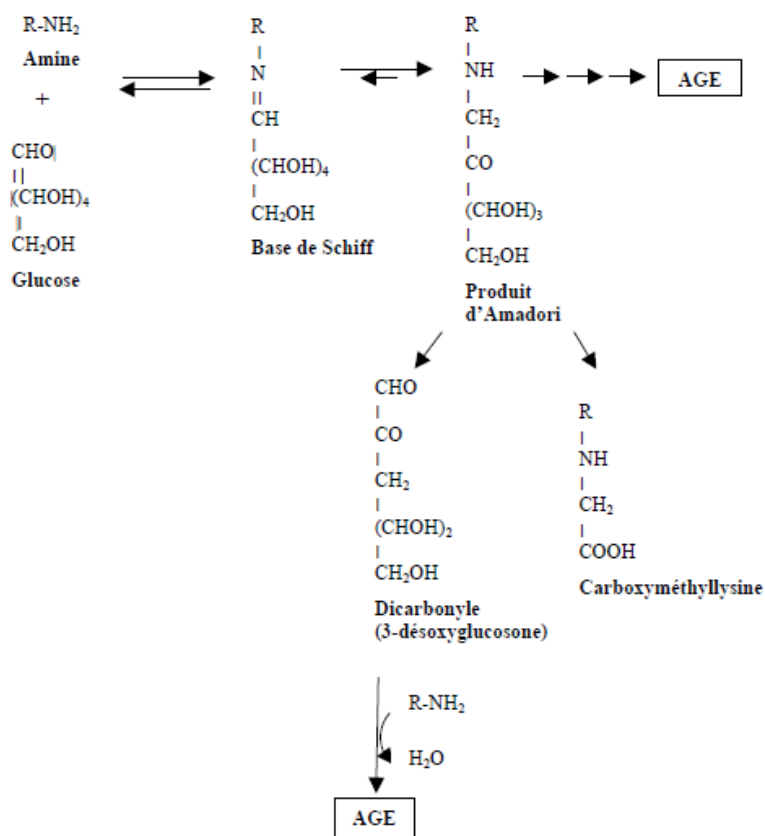
**Figure 34** : Conséquences de l'activation de la PKC induite par l'hyperglycémie (Brownlee, 2005).

### d) Glycation des protéines et formation des AGEs

- Formation des AGEs

Un autre rôle cytotoxique du glucose concerne la glycation lente non enzymatique des protéines (Brownlee and Cerami, 1981). Le glucose (ou autre sucre réducteur) réagit avec la fonction amine N-terminal des protéines ou d'un acide aminé, le plus souvent une lysine, ce qui permet la formation d'une base de Schiff qui se réarrange en produit d'Amadori. Cette réaction est très dépendante du temps d'exposition au sucre et de la concentration de celui-ci. La formation de ces composés est réversible (Brownlee *et al.*, 1984). Par la suite, les produits d'Amadori se dégradent irréversiblement en  $\alpha$ -céto-aldéhyde comme le 1 et 3-désoxyglucosone, qui peut encore réagir avec des protéines pour former des adduits fluorescents appelés produits de Maillard (McLaughlin *et al.*, 1980 ; Nojorge *et al.*, 1987 ; Monnier, 1989) ; (cf. figure 35).





**Figure 35 : Formation des AGEs par la voie de Maillard (Thèse de C. Januel, 2003).**

Les produits de Maillard sont aussi appelés produits de glycation avancées (AGEs) et sont fortement mutagènes. De plus, ils ne peuvent pas être détruits car le protéasome ne peut détruire les protéines glyquées. Ces produits s'accumulent alors dans la cellule et peuvent entraîner un dysfonctionnement de son métabolisme, finissant par engendrer sa mort.

La formation d'AGEs est dépendante des ROS ; elle est augmentée par la production de MDA et par la diminution de GSH réduit (Jain and Palmer, 1997). Une fois formées, les protéines glyquées produisent également des anions superoxydes (Gillery *et al.*, 1988).

La glycation touche des protéines comme l'albumine, les immunoglobulines, le fibrinogène, le collagène et les LDL. La protéine glyquée la plus connue est l'hémoglobine glyquée, HbA1c dont le taux est utilisé en clinique comme indice du contrôle métabolique de la glycémie (Koenig *et al.*, 1976).

- Conséquences de la glycation

La glycation peut provoquer une altération des activités enzymatiques (présence d'un résidu lysine glyquée au voisinage du site actif de l'enzyme ou modification de la conformation de l'enzyme), la formation d'agrégats entre les protéines (Brownlee *et al.*, 1988) et la perte d'une partie des propriétés mécaniques de la paroi vasculaire par épaissement de celle-ci et par diminution de la fluidité membranaire. La glycation au niveau des acides nucléiques entraîne des



cassures des chromosomes, une atteinte des processus de réparation, de réplication et de transcription.

- Entretien de l'état oxydant

La formation AGEs est source de ROS (Kennedy and Lyons, 1997). Au niveau du macrophage, des cellules endothéliales, des fibres musculaires lisses et des fibroblastes, les AGEs peuvent se fixer sur des récepteurs spécifiques appelés RAGE (Receptor of Advanced Glycation End products). La liaison des AGEs au récepteur RAGE des cellules provoque la formation de radicaux libres, notamment *in vitro* par activation de la NADPH oxydase, dans les cellules endothéliales (Wautier *et al.*, 2001). Cela a été démontré *in vivo* par Thallas-Bonke *et al.* en 2008. La production de ROS intracellulaires est également stimulée par la liaison AGE/RAGE dans le cortex rénal (Coughlan *et al.*, 2009).

## 2. Stress oxydant et hyperinsulinisme (cas du diabète de type 2)

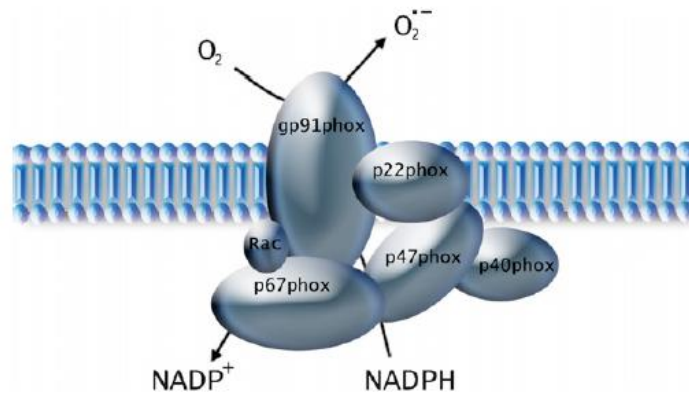
L'hyperinsulinisme, comme l'augmentation des acides gras et des glucides, génère un stress oxydant. L'insuline inhibe la dégradation des protéines oxydées par inhibition du protéasome, ayant pour conséquence une accumulation de protéines oxydées dans la cellule (Facchini *et al.*, 2000). Xu et Badr (1999) ont par ailleurs montré, chez des rats Sprague Dawley ayant une insulinémie 6 fois plus élevée que la normale maintenue sur une semaine, une inhibition de l'oxydation des acides gras et de l'activité de la catalase. L'insuline stimule également la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les cellules adipeuses en culture (Krieger-Brauer and Kather, 1992). Une autre étude a montré qu'une exposition accrue à l'insuline provoque une augmentation importante d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> dans les cellules endothéliales (Kashiwagi *et al.*, 1999).

L'inhibition de la catalase et la stimulation de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, permettent de dire que l'insuline et *a fortiori* l'hyperinsulinisme entraînent une production de ROS dans les tissus.

## 3. Molécules pro-oxydantes et antioxydantes de la cellule β

### a) Enzyme pro-oxydante : la NADPH oxydase

L'enzyme pro-oxydante NADPH oxydase permet la génération d'anions superoxyde par oxydation du NADPH, H<sup>+</sup> en NADP<sup>+</sup>. Elle est exprimée dans les cellules β d'îlots de rat et *in vitro* sur des cellules β de hamster syrien HIT-T15 (Oliveira *et al.*, 2003) et de souris MIN-6 (Tsubouchi *et al.*, 2005). Uchinozo *et al.* (2006) ont montré que les cellules β de rat exprimaient une NADPH oxydase de type phagocytaire (cf. figure 36). Elles expriment les ARNm de différentes sous-unités associées à la membrane plasmique de la NADPH oxydase, Nox1, Nox2 (gp91<sup>phox</sup>), Nox4 et p22<sup>phox</sup>, et les sous unités cytosoliques Noxo1 (homologue de p47<sup>phox</sup>) et Noxa1 (homologue de p67<sup>phox</sup>).



**Figure 36 :** Représentation schématique de la NADPH de type phagocytaire sous forme active (Ray and Shah, 2005).

Des études ont montré une augmentation de Nox2 et Nox4 dans un modèle de rats rendus diabétiques par injection de streptozotocine STZ (Etoh *et al.*, 2003) et chez des rats et souris diabétiques de type 2 (Nakayama *et al.*, 2005). L'activation de la NADPH oxydase résulte en une augmentation du stress oxydant.

#### b) [Défenses antioxydantes des cellules \$\beta\$](#)

Les cellules  $\beta$  pancréatiques sont très vulnérables au stress oxydant de par leur déficience en enzymes antioxydantes telles que la catalase, la superoxyde dismutase à cuivre/zinc (Cu/Zn SOD) et la glutathion peroxydase (Grankvist *et al.*, 1981 ; Lenzen *et al.*, 1996) qui représentent la première ligne de défense contre le stress. De plus, elles présentent une faible concentration en glutathion réduit GSH (Ammon *et al.*, 1983).

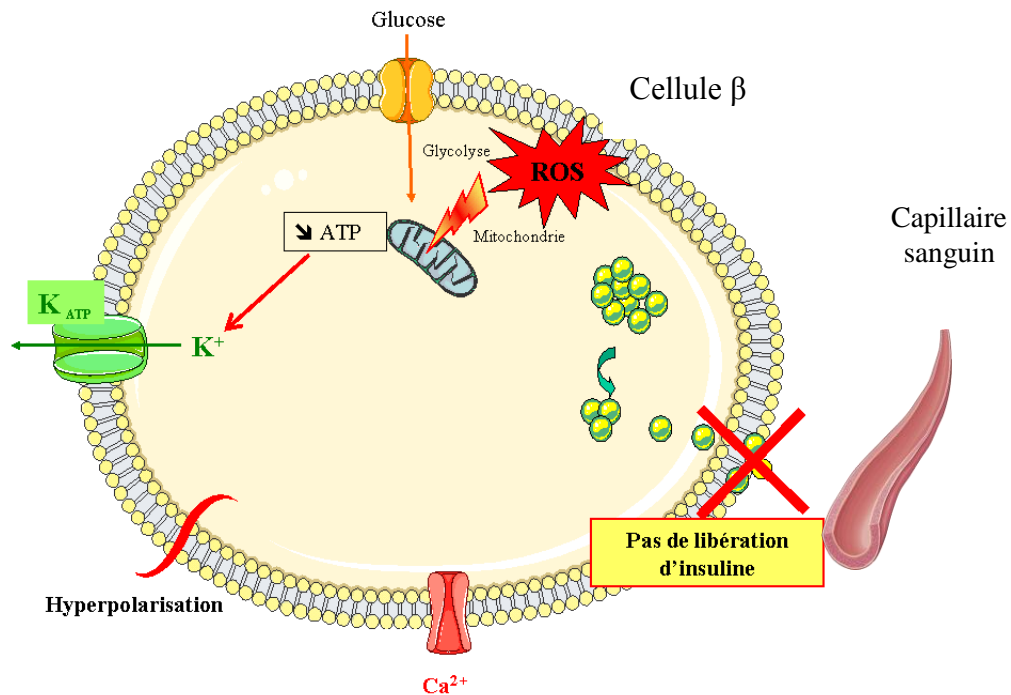
Des études ont montré qu'une surexpression de la Gpx, de la CAT et de la SOD à cuivre/zinc dans des cellules insulino-sécrétrices les protégeaient du stress oxydant (Tiedge *et al.*, 1999 ; Kralik *et al.*, 1998). *In vivo*, d'autres études ont mis en évidence l'effet protecteur d'une surexpression de la SOD à cuivre/Zinc chez une souris transgénique en augmentant la tolérance des cellules  $\beta$  au stress oxydant induit par l'alloxane (Kubisch *et al.*, 1994 ; Kubisch, 1997). De plus, l'effet diabétogène de la streptozotocine est diminué chez des souris transgéniques surexprimant dans les cellules  $\beta$ , la thiorédoxine, une enzyme antioxydante (Hotta *et al.*, 1998).

Dans les cellules RINm5F, la surexpression de la catalase, de la Gpx et de la Cu/Zn SOD protège les cellules  $\beta$  contre la fragmentation de l'ADN induit par des cytokines (Lortz *et al.*, 2000).

#### 4. [Effet du stress oxydant sur l'insulino-sécrétion et l'insulino-résistance](#)

Les ROS perturbent et inhibent l'insulino-sécrétion (Krippeit-Drews *et al.*, 1994) en inhibant la transduction du signal du glucose dans les cellules  $\beta$ . En effet, le peroxyde d'hydrogène à une dose de 1mmol/L sur des îlots de souris, inhibe la sécrétion d'insuline en diminuant le ratio

ATP/ADP intracellulaire. Par conséquent, une activation des canaux potassiques ATP-dépendant entraîne une hyperpolarisation membranaire (Krippeit-Drews *et al.*, 1999) qui empêche la libération de l'insuline par la cellule  $\beta$  (cf. figure 37). Ces études ont été confirmées sur des îlots de rat (Kim *et al.*, 1994) et humain (Jahr *et al.*, 1995) avec des doses en peroxyde d'hydrogène comprises entre 0,1 et 0,5mmol/L.



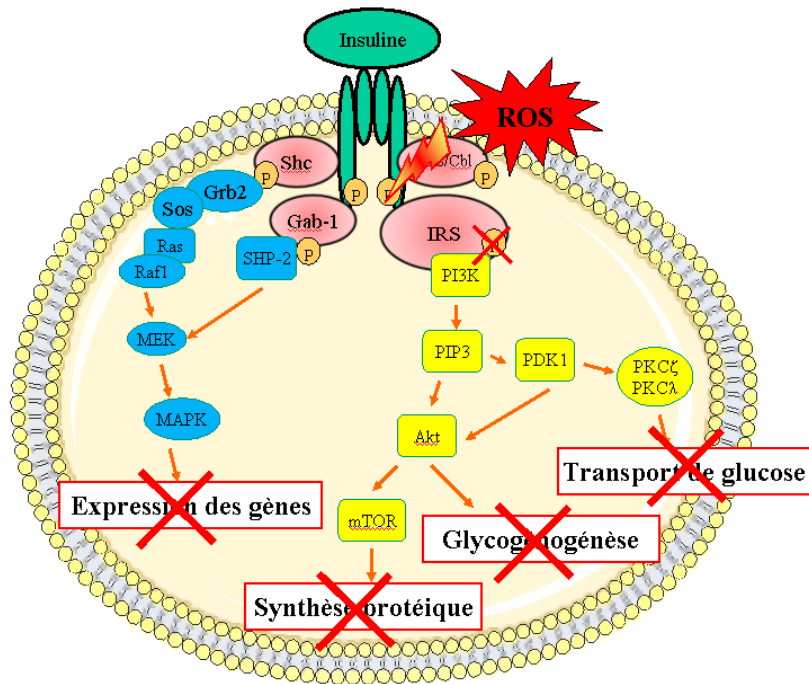
**Figure 37 : Effet du stress oxydant sur l'insulino-sécrétion.**

La baisse de la concentration en ATP est due à une attaque des ROS sur les mitochondries. La mitochondrie est une des premières sources de ROS mais elle est également sa principale cible. Elles peuvent inhiber la chaîne respiratoire (Shiva, 2004) et endommager des composés mitochondriaux comme l'ADN mitochondrial. Ce dernier est dépourvu d'histones et de systèmes de réparation efficaces comparé à l'ADN nucléaire (Bohr, 2002 ; Stevnsner *et al.*, 2002). Il est donc plus sensible à l'attaque des espèces réactives. L'ADN mitochondrial, une fois altéré, perturbe également le fonctionnement de la chaîne respiratoire, générant des ROS.

De plus, d'autres études ont montré que des produits de peroxydation lipidique comme le 4-HNE diminue la sécrétion d'insuline (Miwa *et al.*, 2000).

Les ROS sont également impliquées dans l'insulino-résistance. Des études sur des cellules en culture démontrent que les ROS inhibent la transduction du signal de l'insuline. Elles empêchent l'autophosphorylation du récepteur à l'insuline et par conséquent celle de la protéine IRS-1, conduisant à un blocage des voies en amont de la PI3K. La translocation du récepteur GLUT4 est

alors inhibée (Rudich *et al.*, 1998) ne permettant pas l'entrée du glucose dans la cellule (cf. figure 38).



**Figure 38** : Mécanisme de résistance à l'insuline induite par les ROS (source personnelle, d'après Voet & Voet, Edition deBoeck, 2005).

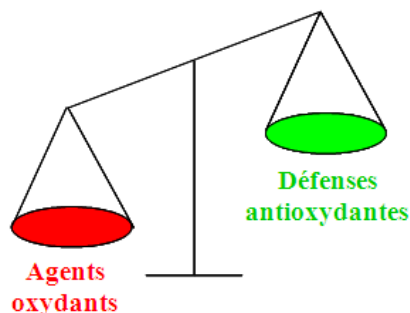
En effet, des concentrations de l'ordre du micromolaire en peroxyde d'hydrogène suffisent à inhiber l'autophosphorylation du récepteur à l'insuline sur des cellules en culture (Hansen *et al.*, 1999) entraînant ou favorisant l'insulino-résistance.

### III. Préventions par les antioxydants

#### A. Généralités

##### 1. Définition

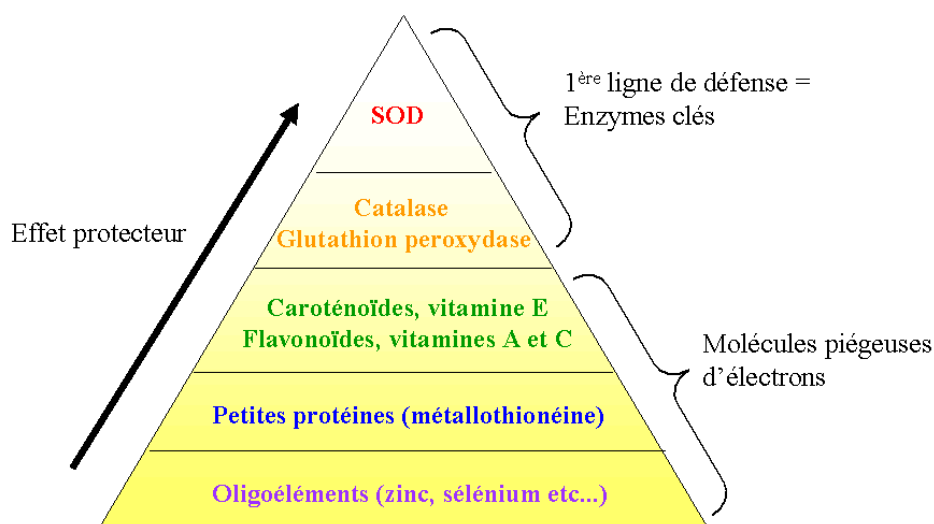
Le terme *antioxydant* était à l'origine utilisé pour désigner les substances chimiques qui empêchent les réactions avec l'oxygène. À la fin du XIX<sup>e</sup> siècle et au début du XX<sup>e</sup> siècle les propriétés des antioxydants ont été largement étudiées pour leur utilisation dans les procédés industriels afin de réduire, par exemple, la corrosion des métaux. Les antioxydants, dans le cas présent, sont des molécules naturellement produites par le corps ou bien apportées par l'alimentation pour combattre les effets toxiques des radicaux lors du stress oxydant. La production des entités oxydantes est constamment en équilibre avec les systèmes de défenses antioxydantes (cf. figure 39).



**Figure 39** : Déséquilibre entre les molécules pro-oxydantes et les systèmes de défenses antioxydantes lors du stress oxydant (source personnelle).

## 2. [Les systèmes de défenses antioxydantes](#)

L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses antioxydantes très efficaces afin de diminuer la concentration des entités oxydantes dans l'organisme. Le terme d'antioxydant désigne toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxygène, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat (Halliwell and Gutteridge, 1990). La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003). Il existe différents types de molécules qu'elles soient naturelles ou synthétiques et dont le mode d'action repose sur un système enzymatique (premières lignes de défense) ou non (molécules piègeuses d'électrons) ; (cf. figure 40).



**Figure 40** : Pyramide des systèmes de défenses antioxydantes (source personnelle).

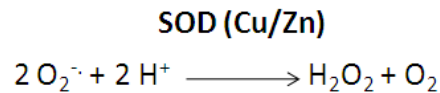
### a) [Les enzymes antioxydantes](#)

Les enzymes antioxydantes sont les premières lignes de défenses contre les entités oxydantes. Leur rôle est de diminuer la quantité de ROS présentes dans la cellule. Parfois ces enzymes

nécessitent des oligo-éléments (Cu, Zn, Mn, Se, Fe) comme cofacteurs pour pouvoir exercer leur activité enzymatique.

- Les superoxydes dismutases (SOD)

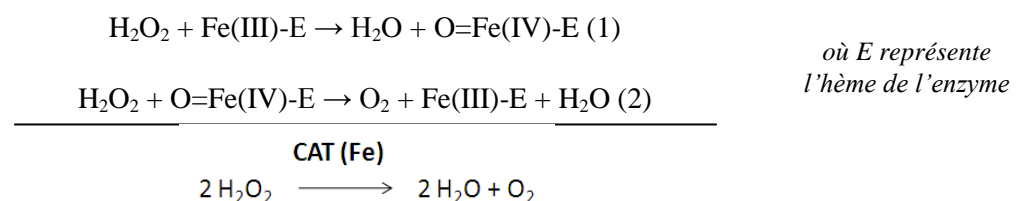
Les SOD sont les premières enzymes à intervenir dans la cascade des ROS. Ce sont des métalloprotéines qui catalysent la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et oxygène, selon la réaction suivante :



Il en existe trois isoformes décrites chez les mammifères (Fridovich, 1995) : la SOD à Manganèse (Mn) dans les mitochondries, à cuivre (Cu) ou à zinc (Zn) dans le cytoplasme et les mitochondries, et des formes Cu/Zn SOD extracellulaires. Les deux dernières sont retrouvées dans les vaisseaux sanguins. Il existe des molécules chimiques de synthèse qui possèdent cette activité enzymatique et sont perméables aux membranes cellulaires. Elles sont appelées SOD mimétiques.

- La catalase (CAT)

Le peroxyde d'hydrogène généré notamment lors de la dismutation de l'anion superoxyde est dégradé par la catalase. Cette enzyme est formée de quatre chaînes polypeptidiques, comportant chacune un groupe hème, qui constituent les sites actifs de la CAT. Pour catalyser la réaction, l'atome de fer du groupement hème réalise une coupure hétérolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène, ce qui crée une molécule d'eau et un groupement intermédiaire Fe(IV)=O très oxydant ; ce dernier peut ensuite oxyder une autre molécule de peroxyde d'hydrogène pour donner du dioxygène. Cette réaction est illustrée par les deux demi-équations suivantes :

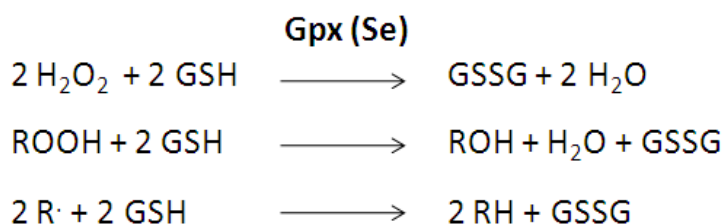


L'enzyme est essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes.

- Les glutathions peroxydases (GPx) et glutathions réductases (GR)

La glutathion peroxydase est une enzyme formée de quatre sous-unités contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélélocystéine. La Gpx est présente dans les liquides extracellulaires (sang) et dans les cellules au niveau du cytoplasme et des membranes. Elle assure la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau, des hydroperoxydes organiques (ROOH) en

alcools (ROH) et des espèces radicalaires en espèces non radicalaires, grâce à la présence de glutathion réduit (GSH), selon le mécanisme suivant :



Les molécules toxiques sont ainsi transformées en molécules assimilables comme l'eau et l'alcool. Dans chacune de ces réactions, une molécule de glutathion oxydée GSSG est obtenue. Pour que cette réaction perdure, il doit y avoir un taux constant de GSH, ce qui est rendu possible par la glutathion réductase (GR). Elle catalyse la réduction du GSSG en GSH (ci-dessous), à l'aide du cofacteur NADPH sous forme réduite (NADPH, H<sup>+</sup>). Le NADPH, H<sup>+</sup> provient de l'oxydation du glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconate par la glucose-6-phosphate déshydrogénase, de la voie des pentoses phosphates.



#### b) [Les systèmes antioxydants non enzymatiques et leurs effets](#)

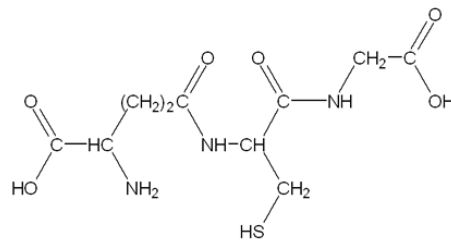
Les systèmes antioxydants non enzymatiques sont des nutriments naturellement apportés par l'alimentation ou par des composés endogènes. Ils peuvent avoir un rôle de « scavenger », c'est à dire qu'ils ont la capacité de piéger les entités oxydantes en captant leur électron libre et en formant ainsi des entités plus stables qui pourront être éliminées par d'autres systèmes antioxydants. Les principales molécules sont le glutathion (GSH), la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol), la vitamine C (acide L-ascorbique) et la vitamine A (caroténoïde). Les propriétés antioxydantes des acides gras polyinsaturés et des flavonoïdes seront également étudiées.

- Le glutathion (GSH)

Le glutathion est un tripeptide, formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine :  $\gamma$ -L-Glutamyl cystéinyl glycine (cf. figure 41). C'est le thiol intracellulaire le plus abondant. Il permet la conversion des ponts disulfures (R-S-S-R) des protéines oxydées en deux fonctions thiols (R-SH). De plus, il piège le peroxyde d'hydrogène et réagit avec l'oxygène singulet et le radical hydroxyle (Larson, 1988). Les formes GSH (réduite) et GSSG (oxydée) forment un couple d'oxydoréduction très important dans la cellule car il permet les échanges d'électrons à l'intérieur de celle-ci. Des études ont montré son importance dans de nombreuses pathologies comme le cancer où une protéine exercerait son effet anti-carcinogène en augmentant les



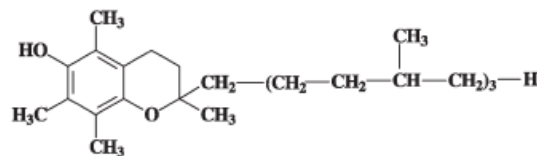
concentrations de GSH (Bounous, 2000). De plus, il protégerait des complications afférentes au diabète (Thornalley *et al.*, 1996).



**Figure 41** : Formule semi-développée du glutathion réduit (GSH).

- La vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol)

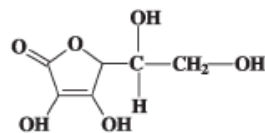
La vitamine E, liposoluble, est un antioxydant membranaire. La forme la plus active est l' $\alpha$ -tocophérol (Kamal-Eldin and Appelqvist, 1996) (cf. figure 42). Elle piège les radicaux libres organiques provenant de l'oxydation des lipides et contribue à diminuer la peroxydation lipidique. La vitamine E peut mettre fin à une réaction radicalaire en se chargeant du radical. Devenue radicalaire, la vitamine E est relativement stable.



**Figure 42** : Structure chimique de l'alpha-tocophérol ou vitamine E (d'après Flora *et al.*, 2008).

- La vitamine C (acide L-ascorbique)

La vitamine C piège l'anion superoxyde, le radical hydroxyle, l'oxygène singulet et réduit le peroxyde d'hydrogène en eau *via* l'ascorbate peroxydase (Noctor and Foyer, 1998). Elle permet de régénérer la forme non radicalaire de la vitamine E. Lorsqu'elle est à son tour oxydée, elle est réduite par l'acide alpha lipoïque ou par les ascorbate réductases ou excrétée dans les urines. Sa structure est présentée ci-dessous (cf. figure 43).



**Figure 43** : Structure l'acide L-ascorbique (d'après Flora *et al.*, 2008).

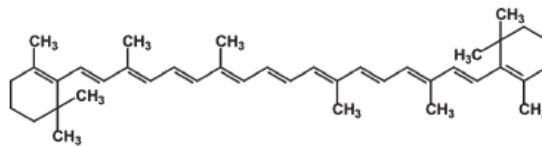
De plus, cette molécule est connue pour avoir une incidence sur les facteurs de risques cardiovasculaires. De hautes concentrations plasmatiques sont associées à une réduction du risque de maladies coronaires et de sténose carotidienne (Gale *et al.*, 2001). Trout (1991) a reporté qu'une supplémentation faible en vitamine C diminue le taux de cholestérol total et augmente les HDL.



La préservation du pouvoir antioxydant des molécules est fondamentale. Par exemple, le fait d'éplucher une pomme réduit sensiblement sa capacité antioxydante car la peau est riche en vitamine C et en quercétine. La répartition des antioxydants dans l'aliment est différente d'un produit à un autre. D'autre part, la cuisson, qui est un phénomène d'oxydation, diminue le potentiel antioxydant de certains aliments. La vitamine C est notamment très sensible à la chaleur.

- La vitamine A (famille des caroténoïdes)

Le précurseur de la vitamine A est le  $\beta$ -carotène (cf. figure 44). Les caroténoïdes piègent les molécules d'oxygène singulet (Stahl and Sies, 2002) formées par les radiations solaires. Grâce à leur longue chaîne carbonée, riche en doubles liaisons, ils sont également de bons piègeurs de radicaux peroxy. Une molécule de caroténoïde peut piéger plusieurs espèces radicalaires avant d'être détruite (Stahl and Sies, 1997).



**Figure 44** : Structure du  $\beta$ -carotène (d'après Flora *et al.*, 2008).

Les  $\beta$ -carotènes ont des effets sur les cancers de la peau induits par des UV, sur les cancers oraux induits par le diméthylbenzanthracène (DMBA) et les tumeurs du colon induites par le diméthylhydrazine, chez des animaux (Krinsky, 1989). De plus, ils présentent des effets dans les pathologies ophtalmiques. Des études ont montré que la consommation d'aliments riches en zéaxanthine (caroténoïde contenu dans le maïs et le chou fleur), réduirait de 93% les risques de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et de 47% la survenue d'une cataracte (selon l'étude SU.VI.MAX). La lutéine (caroténoïde présent dans le jaune d'œuf, les carottes, les oranges et les épinards) abaisserait quant à elle de 69% les risques de DMLA.

D'autre part, même si certains aliments sont riches en  $\beta$ -carotène antioxydant, l'organisme ne va pas en bénéficier dans sa totalité. Ainsi, Van het Hof *et al.* (2000) ont montré que les feuilles d'épinard coupées contiennent dix fois plus de  $\beta$ -carotène que le brocoli et les pois. Cependant, la réponse plasmatique en  $\beta$ -carotène est plus importante après avoir consommé le brocoli et les petits pois que les feuilles d'épinard.

- Cas des acides gras polyinsaturés

Les acides gras polyinsaturés sont des acides gras essentiels présentant une ou plusieurs doubles liaisons à partir du groupement méthyle terminal. Il existe trois grandes familles d'acides gras insaturés : n-3, n-6 et n-9 (position de la double liaison respectivement au 3<sup>ème</sup>, 6<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup>

carbone en partant de la fin de la chaîne). Les acides gras de ces trois séries sont des constituants fondamentaux de toutes les membranes cellulaires. Ils ont des rôles majeurs dans tous les métabolismes cellulaires et des effets bénéfiques dans de nombreuses pathologies. En effet, l'étude italienne GISSI IV (1999) a montré qu'une supplémentation artificielle en oméga-3 (sous forme de gélules) chez des patients ayant fait récemment un infarctus du myocarde diminue de façon significative leur mortalité globale de près de 20% et celle liée aux maladies cardiovasculaires de près de 30%. D'autre part, une étude d'observation menée aux États-Unis et intitulée DAISY (Diabetes Autoimmunity Study in the Young) a montré qu'une alimentation riche en acides gras oméga-3 chez des enfants prédisposés à un diabète de type 1, permettait de réduire le risque de déclencher l'autoimmunité des îlots (Norris *et al.*, 2007). Les effets bénéfiques des acides gras polyinsaturés suggèrent une activité antioxydante de ces molécules. En effet, Mas *et al.* (2010) ont montré qu'une supplémentation en oméga-3 et plus particulièrement en acide éicosapentaénoïque ou en acide docosahexaénoïque diminuaient le taux plasmatique d'isoprostanes F2, un marqueur du stress oxydant. D'autres études suggèrent que l'huile de poisson, riche en oméga-3, module les effets aversifs de particules aériennes inférieures à 2,5µm sur la régulation de la fonction cardiaque. Ce mécanisme impliquerait une diminution des ROS, l'utilisation du GSH et une augmentation des enzymes antioxydantes (Cu/Zn SOD) plasmatiques (Romieu *et al.*, 2008).

- Cas des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont une grande classe de molécules antioxydantes appartenant à la famille des polyphénols. Il existe différentes sous-classes : les flavanols, les flavanones, les flavones, les isoflavones et les anthocyanes (cf. figure 45).

Flavonoid subclass	Food flavonoid	Food source
Flavanols	Catechin, galocatechin, epicatechin	Teas, red grapes and red wines
Flavanones	Naringenin, hesperetin, eriodictyol	Citrus foods
Flavones	Apigenin, luteolin	Green leafy spices
Isoflavones	Daidzein, genistein, glycitein, biochanin A	Soybeans, soy foods, and legumes
Flavonols	Kaempferol, myricetin, quercetin, isorhamnetin	Nearly ubiquitous in foods
Anthocyanidins	Cyanidin, delphinidin, pelargonidin	Red, purple and blue berries

**Figure 45 : Tableau des principaux flavonoïdes (Garcia-Lafuente *et al.*, 2009).**

Le curcuma ou curcumin (épice), qui contient de la curcumine (flavonoïde), diminue le stress oxydant par inhibition de la peroxydation lipidique et neutralisation des radicaux superoxydes et hydroxyles. De plus, un contact prolongé des cellules endothéliales d'aorte de bovin avec de la curcumine renforcerait la résistance cellulaire aux lésions oxydantes (Motterlini *et al.*, 2000). A faibles doses, elle a également un effet hypocholestérolémiant sur des souris (Srinivasan and

Sambaiyah, 1991). Chez l'homme, des études ont montré qu'elle permettait d'augmenter le taux de HDL bénéfique en réduisant le cholestérol total et la peroxydation lipidique (Soni and Kuttan, 1992). Elle présente également des propriétés anticancéreuses : une supplémentation en curcumine chez des patients à haut risque de cancer a montré un effet chimioprotecteur pour le développement des cancers dont ils souffraient (Cheng *et al.*, 2001). Enfin, dans une pathologie comme l'uvéite antérieure chronique (inflammation de la paroi vasculaire de l'œil), la curcumine après 12 semaines de traitement, améliorerait les symptômes (Lal *et al.*, 1999). A faible dose, elle inhibe également la formation de la cataracte chimiquement induite sur des rats et des lapins (Awasthi *et al.*, 1996).

Le curcuma présente de nombreuses propriétés mais malgré le fait qu'il soit un antioxydant puissant, il présente une faible biodisponibilité et est rapidement éliminé après ingestion. En effet, des études réalisées chez des volontaires sains, à des doses comprises entre 50 et 200mg ont montré que le taux de curcumin plasmatique retrouvé n'est que de 0,63ng/mL. Ainsi, pour augmenter sa biodisponibilité, il est possible de lui associer un autre constituant (liposomes, nanoparticules). Shoba *et al.* (1998) ont associé le curcumin (20mg) à de la pipérine (un alcaloïde du poivre noir), qui a permis d'augmenter la biodisponibilité de 2000%, tandis que des liposomes de curcumin/cholestérol/phosphatidylcholine, permettent d'augmenter la survie des souris ayant un lymphome par augmentation de sa biodisponibilité (Kuttan *et al.*, 1985).

Les polyphénols dont font partie l'épigallocatechine gallate du thé vert et la procyanidine B2, ont également des effets antioxydants majeurs qui seront détaillés dans les chapitres III. C et III. D de l'introduction.

### [3. Pourquoi avons-nous besoin des antioxydants de l'alimentation ?](#)

Lors d'un stress oxydant, les défenses sont saturées et insuffisantes. Les apports exogènes d'antioxydants peuvent suppléer cette insuffisance. En effet, la vitamine E, C, les caroténoïdes et les polyphénols apportés par l'alimentation ont des effets directs sur les constituants cellulaires et circulants (Evans and Halliwell, 2001). De plus, les oligo-éléments comme le zinc, le sélénium, le manganèse ou le cuivre, apportés par le bol alimentaire, permettent de faire fonctionner des enzymes antioxydantes comme les superoxydes dismutases (Evans and Halliwell, 2001).

La plupart des antioxydants de l'alimentation proviennent des végétaux c'est-à-dire des fruits, des légumes, des plantes ou des racines. Les antioxydants vont réduire les radicaux libres ; chaque molécule antioxydante ne peut réagir qu'avec un seul radical libre (Pelli and Lyly, 2003).

De nombreux végétaux contiennent des antioxydants. Souvent, la mesure de la capacité antioxydante totale (CAT) est réalisée par la procédure ORAC « *Oxygen Radical Absorbance Capacity* ». L'unité ORAC est exprimée en micromoles d'équivalents de Trolox ou TE (dérivé

soluble de la vitamine E, perméable aux cellules). Cette valeur mesure la capacité de l'aliment à neutraliser le radical peroxy. Il a été démontré que, pour avoir un impact significatif sur la capacité antioxydante du plasma et des tissus, la consommation de molécules antioxydantes doit être comprise entre 3 000 et 5 000 unités ORAC (Prior and Cao, 1999).

Wu *et al.*, (2004) ont comparé les capacités antioxydantes des aliments les plus consommés aux États-Unis au travers des fruits, des légumes, des fruits à coques, des fruits secs, des épices et des céréales. Ils ont établi une liste des principaux éléments riches en antioxydants (cf. figure 46).

A ces aliments s'ajoutent d'autres végétaux, fruits ou épices comme le raisin sec, le raisin noir, les framboises, le kiwi, le pamplemousse rose, le chou frisé, le chou de Bruxelles, les épinards, les brocolis, la betterave, les poivrons rouges et les oignons. Les épices telles que le gingembre, le curcuma, le poivre noir, la muscade et la vanille contiennent également des antioxydants.

<b>Aliments</b>	<b>CAT (<math>\mu\text{mol ET}</math>)</b>
<b>Petits haricots rouges (secs)</b>	13727
<b>Myrtilles sauvages</b>	13427
<b>Haricot rouge (sec)</b>	13259
<b>Haricot Pinto</b>	11864
<b>Myrtilles cultivées</b>	9019
<b>Cranberry</b>	8983
<b>Artichaut (cuit)</b>	7904
<b>Mûre</b>	7701
<b>Pruneau</b>	7291
<b>Framboise</b>	6058
<b>Fraise</b>	5938
<b>Pomme « Red Delicious »</b>	5900
<b>Pomme "Granny Smith"</b>	5381
<b>Noix de pécan</b>	5095
<b>Cerise</b>	4873
<b>Prune noire</b>	4844
<b>Pomme de terre « Russet » (cuite)</b>	4649
<b>Haricot noir (sec)</b>	4181
<b>Prune</b>	4118
<b>Pomme « Gala »</b>	3903

**Figure 46** : Tableau récapitulatif mais non exhaustif des aliments les plus riches en antioxydants (Wu *et al.*, 2004).

La capacité antioxydante totale (CAT) a été mesurée en micromolaire d'équivalent Trolox (ET).

#### 4. Risques des antioxydants

Un antioxydant peut devenir pro-oxydant et avoir l'effet contraire de celui escompté à partir du moment où la dose ingérée est trop importante. Ainsi, lors des suppléments, il ne faut pas dépasser les doses indiquées. De plus, les antioxydants ingérés dans le bol alimentaire n'ont pas la même biodisponibilité que s'ils sont ingérés sous forme purifiée. Par exemple, une ingestion de 100mg de quercétine par l'alimentation augmente son taux sanguin, mais la prise de 100mg de quercétine purifiée augmente 10 fois son taux sanguin, dose qui devient alors toxique. Ainsi, le catabolisme oxydant de la quercétine conduit à la formation de produits secondaires, qui facilitent la formation des anions superoxydes et diminuent le GSH (Metodiewa *et al.*, 1999). Des études ont également montré que l'oxydation des polyphénols antioxydants génère des anions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène et des complexes qui sont potentiellement toxiques (Sang *et al.*, 2005).

#### 5. Etudes épidémiologiques

##### a) Etudes ATBC et CARET

L'étude ATBC est une étude de prévention des cancers du poumon par des alpha-tocophérol (AT) et du bêta-carotène (BC), à des doses de 50mg/jour et 20mg/jour respectivement, soit des doses 5 fois supérieures à la dose recommandée par le concile national de recherche américain. Cette étude menée entre 1985 et 1993, en Finlande, a été menée sur plus de 29 000 hommes, dont des fumeurs. Les résultats de l'étude ont été plutôt décevants : aucun effet bénéfique de la supplémentation en AT et BC pour la prévention des cancers du poumon n'a été observé. Au contraire, la supplémentation en BC chez les fumeurs s'est avérée être nocive par augmentation du risque de développer un cancer du poumon (ATBC Prevention Study Group, 1994).

Une autre étude sur les facteurs de risque pour les cancers du poumon a démarré fin 1994. L'étude américaine CARET pour « Beta Carotene and Retinol Efficacy Trial » a testé la combinaison de 30mg/jour de  $\beta$ -carotène associée ou non à 25000 UI/jour de rétinol ou vitamine A, sur un échantillon composé d'hommes et de femmes, présentant des risques accrus de développer un cancer du poumon. L'étude a été stoppée plus rapidement car les molécules ne présentaient aucun bénéfice pour la santé. Au contraire, une augmentation de 28% des cancers et de 17% de décès chez les personnes recevant les deux molécules a été observée (Omenn *et al.*, 1996).

##### b) Etude SU.VI.MAX

Une autre étude française a démarré en 1994, l'étude SU.VI.MAX pour « SUPplémentation en VItamines et Minéraux Anti-oXydants » et s'est poursuivie pendant 10 ans. Au contraire des deux précédentes études, celle-ci a utilisé des doses nutritionnelles en vitamine C (120mg) et E

(30mg) mais aussi en sélénium (100µg), zinc (20mg) et β-carotène (6mg) sur 13000 sujets hommes et femmes. Le but était de voir l'incidence de ces molécules sur les cardiopathies ischémiques, les cancers et la mortalité. Les résultats de cette étude montrent qu'il n'y a pas de différences entre les groupes témoins sans antioxydants et ceux recevant les molécules antioxydantes sur les cardiopathies ischémiques. De plus, les résultats obtenus indiquent que le risque de cancers et de maladies cardiovasculaires était davantage augmenté chez les hommes que chez les femmes, car leur niveau initial en bêta-carotène était plus bas au contraire des femmes qui ont une alimentation plus riche en fruits et légumes. Chez les hommes recevant les antioxydants, le risque de cancer est diminué de 31%, de même qu'une diminution de 37% du risque de décès. Aucun effet chez la femme n'a été obtenu. La conclusion de cette étude de santé publique est qu'une alimentation riche en fruits et légumes épargnerait au minimum 12 000 cancers chaque année.

## B. Les antioxydants dans le diabète

### 1. Les vitamines, coenzyme et oligo-éléments

De nombreux antioxydants sont utilisés dans la pathologie diabétique, notamment à l'aide d'une supplémentation en vitamines, coenzyme et oligo-éléments. En effet, une étude a montré qu'une supplémentation en vitamine E permet de protéger contre la glycation des protéines et des radicaux libres (Davie *et al.*, 1992 ; Sinclair *et al.*, 1992). De plus, elle a des effets positifs sur l'action de l'insuline chez des patients diabétiques de type 2 (Caballero, 1993 ; Paolisso *et al.*, 1993). Elle permet de réduire la glycémie, l'hémoglobine glyquée (HbA1c), les triglycérides, les acides gras libres et le cholestérol total.

La vitamine C est d'un grand intérêt également car cet antioxydant hydrosoluble permet de régénérer la vitamine E et le GSH. Une supplémentation en cette molécule permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline (Paolisso *et al.*, 1994). Cependant, des études ont montré qu'il n'y avait pas d'effet de la vitamine C chez des sujets témoins (Hirai *et al.*, 2000) et chez des patients diabétiques de type 2 insulino-résistants, à forte dose (Chen *et al.*, 2006).

De plus, des études ont rapporté qu'une supplémentation en vitamine D pendant les premières années de la vie diminue significativement le risque de développer un diabète de type 1 (Hyponen *et al.*, 2001 ; Stene and Joner, 2003). L'étude DAISY (« Diabetes Autoimmunity Study in the Young ») a montré qu'une alimentation comprenant des acides gras riches en oméga 3 (acides gras polyinsaturés) était associée à une réduction du risque de développer une auto-immunité au niveau de l'îlot chez des enfants prédisposés génétiquement au diabète de type 1 (Norris *et al.*, 2007).

L'acide lipoïque est un cofacteur notamment des enzymes du cycle de Krebs. Son rôle antioxydant est moins connu que celui des vitamines E ou C. Sur des modèles animaux de diabète de type 1 et 2, l'acide lipoïque améliore la sensibilité à l'insuline dans les cellules musculaires

(Peth, 2000). Il améliore également cette sensibilité chez le patient diabétique de type 2 après administration intra veineuse (iv) ou *per os* (Evans and Goldfine, 2000). Son mécanisme d'action est inconnu, mais des données *in vivo* suggèrent qu'il permet le maintien du GSH réduit en présence du stress oxydant et qu'il empêche l'activation des inhibiteurs des kinases (IKK $\beta$ ) permettant la restauration de la sensibilité à l'insuline (Evans *et al.*, 2005). Ruderman et Prentki (2004) ont également montré que l'acide lipoïque améliore l'insulino-sensibilité en ayant un effet sur l'AMP kinase. Enfin, Bouloumie *et al.* (1994) ont montré qu'une administration de GSH en infusion chez des patients diabétiques de type 2 a également un effet bénéfique sur la sensibilité de l'insuline.

## 2. [Les composés d'origine naturelle non vitaminique](#)

Outre la supplémentation en vitamines et oligo-éléments, les cultures anciennes utilisaient les plantes ou la nourriture pour se prémunir des maladies. Ainsi, dans la médecine traditionnelle indienne, l'utilisation de l'écorce d'un arbre de la famille des fabacées, *Pterocarpus marsupium roxb*, était utilisée pour soigner le diabète. Mais d'autres végétaux ou fruits ont des propriétés hypoglycémiantes comme le melon amer, le ginko, les ails et les oignons. En 1988, des études cliniques menées à Mexico ont montré l'effet hypoglycémiant du nopal, un cactus plus connu sous le nom de figuier de Barbarie (Frati-Munari, 1988). Le fenugrec a également des propriétés hypoglycémiantes dans le diabète de type 1 (Sharma, 1990) et les feuilles de bleuets dans le diabète de type 2 (Abidov *et al.*, 2006) conduisent à une diminution du LDL. Enfin la cannelle à des doses de 1 à 6g, permet de diminuer les risques de complications cardiovasculaires en améliorant la sensibilité à l'insuline chez des patients diabétiques (Khan *et al.*, 2003). Les cosse de haricot permettent également de diminuer la glycémie car elles sont riches en flavonoïdes.

### a) [Les flavonoïdes en général](#)

Leur propriété est de piéger les radicaux libres (effet scavenger) et d'inhiber les enzymes pro-oxydantes iNOS induites par du LPS dans des macrophages en culture (Sarkar and Bhaduri, 2001). Ils permettent de réduire ou retarder l'apparition de nombreuses maladies chroniques (Hung *et al.*, 2004). Chez des patients diabétiques, ils réduisent les effets néfastes dus au stress oxydant et aux radicaux libres (Lean *et al.*, 1999 ; Asgary *et al.*, 2002).

Le chocolat est un composé qui est riche en flavonoïdes antioxydants comme l'épicatéchine, les catéchines et la procyanidine (Fraga, 2005). Grassi *et al.* (2005) ont étudié pendant 15 jours l'effet de 100g de barres de chocolat noir, contenant 500mg de polyphénols et de 90g de chocolat blanc en barre, qui ne contiennent pas de polyphénols, sur quinze sujets sains. Le modèle d'homéostasie permettant d'apprécier au mieux la résistance à l'insuline (HOMA-IR) était plus faible chez les sujets recevant le chocolat noir. De plus, l'index de sensibilité à l'insuline (QUICKY) était amélioré.

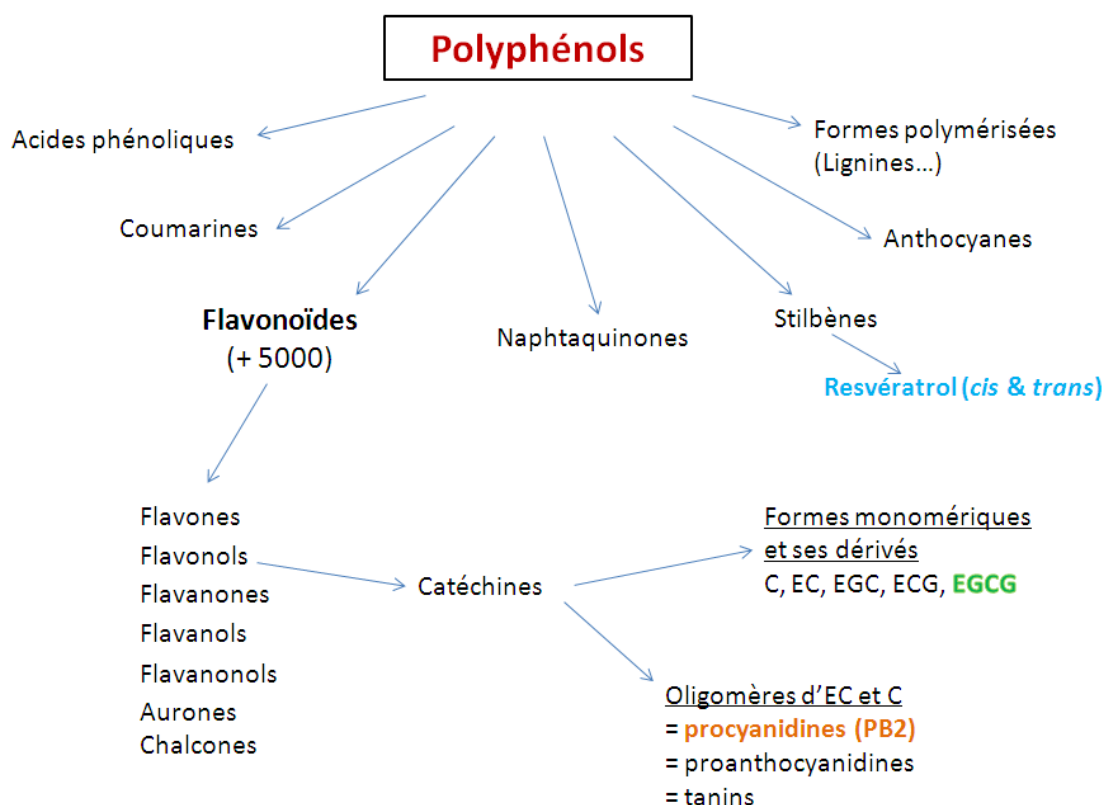
## b) Le curcumin

Le curcumin est connu pour avoir de nombreux effets antioxydants. Sur le diabète, Weisberg *et al.* (2008), ont montré qu'une administration de curcumin chez des souris mâles C57BL/6J obèses (ob/ob) ayant reçu une alimentation hypercalorique, améliore le contrôle glycémique, la sensibilité à l'insuline et les taux plasmatiques de leptine et d'adiponectine, dans ce modèle de souris obèse diabétique. Une autre étude a montré que les souris diabétiques (db/db) dont l'alimentation est supplémentée avec du curcumin (0,02%) ont une glycémie plus basse que les témoins et perdent du poids (Seo *et al.*, 2008).

## C. Les polyphénols

### 1. Généralités sur les polyphénols

Les polyphénols représentent un groupe important de composés issus des plantes ayant des effets protecteurs envers de nombreuses pathologies, comme les maladies cardiovasculaires et les cancers. Il existe des composés non azotés qui sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzène avec plusieurs groupements hydroxyle qui peuvent être libres ou liés à d'autres fonctions chimiques (Escarpa and Gonzalez, 2001).



**Figure 47 : Les différentes de polyphénols.**

(C=catéchine ; EC = épicatechine ; ECG= épicatechine gallate ; EGCG= épigallocatechine gallate).



Ils peuvent être classés en plusieurs groupes (Zern *et al.*, 2005) selon la complexité de leur squelette (cf. figure 47) : les acides phénoliques (acides benzoïques), les stilbènes dont le représentant le plus connu est le resvératrol, les xanthonés, les coumarines, les isoflavonoïdes, les anthocyanes, les flavonoïdes et ses dérivés (flavones...) et les lignines.

L'activité antioxydante des polyphénols est due au caractère acide de la fonction phénol (donneur d'hydrogène) et à sa possibilité d'établir des liaisons hydrogènes. Cela lui confère la capacité de complexer les métaux, de se combiner à des molécules nucléophiles et de faire des réactions d'oxydoréduction (Rice-Evans, 1995). Leur possibilité de piéger les radicaux libres est due à leur fonction hydrogène.

## 2. [Le french paradox](#)

Le french paradox ou paradoxe français est un terme utilisé pour désigner une apparente contradiction entre l'habitude alimentaire des français et leur santé. Cette contradiction a été constatée par l'épidémiologiste St Léger en 1979, qui a fait le constat suivant : les français, qui ont une alimentation plus riche en matières grasses et en vins (régime méditerranéen), étaient en meilleure santé avec une réduction des maladies cardiovasculaires, que les personnes n'ayant pas ce régime alimentaire dont notamment les américains (cf. figure 48). En effet, il a été constaté que le taux d'infarctus du myocarde était de 80 pour 100 000, en France, tandis qu'il était quatre fois plus élevé aux États-Unis (Legoy, 2002).

Ce constat de paradoxe français peut s'expliquer par la présence d'une quantité importante de polyphénols dans le vin et notamment de resvératrol, qui ont un effet positif, confirmé par Renaud *et al.* (1998) et Chalopin *et al.* (2010).



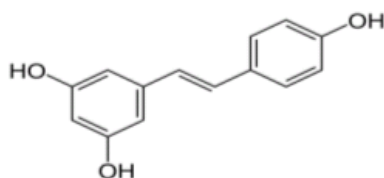
**Figure 48** : Illustration du French Paradox (Olivier Danchin, 2000).

### 3. Quelques polyphénols du raisin

#### a) Le resvératrol (*trans*)

Le resvératrol est un stilbène appartenant à la famille des phytoalexines. Les phytoalexines sont des composés que certaines plantes produisent en réponse à des agressions pathogènes, comme l'exposition aux rayons UV ou à l'ozone.

Essentiellement présent dans la vigne, il est également retrouvé dans le *Polygonum cuspidatum* (liseron asiatique)..., mais aussi dans les fruits comme les raisins, les arachides, les mûres. Le resvératrol se retrouve en quantité significative dans les vins rouges (environ de 5,4 mg/L de vin) car il est extrait au cours de la macération lors de la fermentation alcoolique. Il n'est pas présent dans les vins blancs. La forme chimique majoritairement retrouvée et la plus stable est le resvératrol *trans* ou Rt (cf. figure 49).

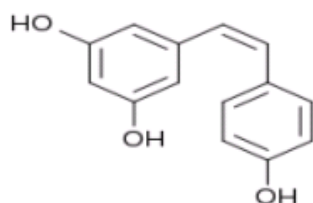


**Figure 49** : Formule du resvératrol *trans* ou *trans*-3, 4', 5' trihydroxystilbène (Orallo *et al.*, 2002).

Le Rt possède des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et chimiopréventives en modulant les voies de signalisation cellulaire (Kundu and Surh, 2004). Son caractère antioxydant est très puissant ; il peut inhiber l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL). Selon des études réalisées à partir de cellules endothéliales de rat (Orallo *et al.*, 2001), le Rt aurait un effet inhibiteur de la NADH/NADPH oxydase et de ce fait diminuerait la production d'anions superoxydes.

#### b) Le resvératrol *cis*

Le resvératrol existe également sous forme *cis* (stéréoisomère). Il est obtenu à partir de la forme *trans* par irradiation UV (cf. figure 50).



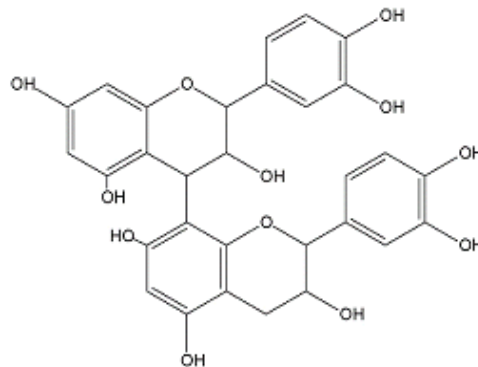
**Figure 50** : Formule du resvératrol *cis*.

De nombreuses études montrent qu'il existe des différences quantitatives de l'activité des deux formes. Par exemple, l'isomère *cis* entraîne une diminution plus grande dans l'accumulation plaquettaire induite par le collagène que l'isomère *trans*. Schneider *et al.* (2003) ont montré que le

resvératrol *cis* (Rc) triméthylé (afin de garder sa configuration *cis*) présente un effet antiprolifératif sur des cellules de cancer du colon Caco-2, 100 fois supérieur à celui du Rt. Il semblerait, d'une manière générale, que le Rt soit plus actif que le Rc (Leiro *et al.*, 2004).

#### c) [La procyanidine B2](#)

Elle présente des effets intéressants au niveau cardiovasculaire. Contenue dans les fruits (la pomme, le cacao, le raisin...) et les végétaux, la procyanidine B2 (PB2) est cependant, la plus abondante dans les pépins de raisins (cf. figure 51).



**Figure 51** : Formule de la procyanidine B2 ou épicatechine-(4 $\beta$ -8)-épicatechine (Li and Jiang, 2007).

Des études ont montré que la PB2 inhibait la formation de bases oxydées 8-oxodG sur une lignée de cellules leucémiques (HL-60) traitées avec un système générant du peroxyde d'hydrogène (Sakano *et al.*, 2005). De plus, lorsqu'elle est additionnée aux vitamines C, E et aux caroténoïdes, la PB2 augmente les capacités antioxydantes du plasma. (Holt *et al.*, 2002).

#### 4. [L'effet antioxydant des polyphénols](#)

Les composés polyphénoliques sont des molécules apportées par l'alimentation. Il s'agit d'une grande famille de molécules organiques dont les plus connus sont les tanins et les flavonoïdes. Ils ont une structure particulière qui leur confère une activité de scavenger (Bors *et al.*, 1990) et donc antioxydante. Des études ont montré que ces composés avaient des propriétés antioxydantes plus importantes que la vitamine E et C (Rice-Evans *et al.*, 1995 ; McKay and Blumberg, 2002). Les polyphénols ont montré leurs effets bénéfiques sur la santé. Ils suscitent un grand intérêt pour la prévention et le traitement du cancer (Chen *et al.*, 2004), des maladies inflammatoires (Laughton *et al.*, 2004), cardiovasculaires (Frankel *et al.*, 1993) et neurodégénératives (Orgogozo *et al.*, 1997).

Leur biodisponibilité ainsi que leur absorption est augmentée en présence d'alcool ou de solvant alcoolique. Le resvératrol empêche la dégradation des lipides et bloque de façon dose dépendante l'entrée des LDL oxydés dans la paroi vasculaire. De plus, il a des propriétés

anticancéreuses. Pozo-Guisado *et al.* (2002) ont montré qu'il provoque l'apoptose dans des cellules cancéreuses ayant ou non le gène suppresseur de tumeur p53. De plus, le *trans* resvératrol est dégradé par le cytochrome P450 en un phyto-œstrogène (le piceatannol) qui a une activité anticancéreuse (Potter *et al.*, 2002). Il présente également une activité anti-inflammatoire. Après une lésion de la moelle épinière, une injection de resvératrol a permis de renverser la réponse inflammatoire aussi bien qu'un médicament anti-inflammatoire comme la prednisone et d'apporter une protection antiradicalaire (Yang and Piao, 2003).

## 5. [Effet des polyphénols de vin rouge dans la pathologie diabétique](#)

Al-Awwadi *et al* (2004) ont montré que des extraits de polyphénols de vin rouge français Corbières (AOC) à une dose de 200mg/kg pendant 6 semaines diminuaient la prise de poids et de nourriture ainsi que la glycémie dans les groupes témoins et rendus diabétiques par une injection de streptozotocine intra veineuse à 60mg/kg. De plus, il a été montré que le Rt possède un effet hypoglycémiant et hypolipémiant. Il permet de diminuer la prise de poids, la polyphagie et la polydipsie des animaux. De plus, il diminue la sécrétion d'insuline et retarde l'apparition de l'insulino-résistance chez des rats rendus diabétiques par injection de streptozotocine (Su *et al.*, 2006). Enfin, chez des rats rendus diabétiques par injection de streptozotocine, des extraits de pépins de raisins contenant de la procyanidine B2 ont un effet hypoglycémiant (Pinent *et al.*, 2004).

## D. [Le thé](#)

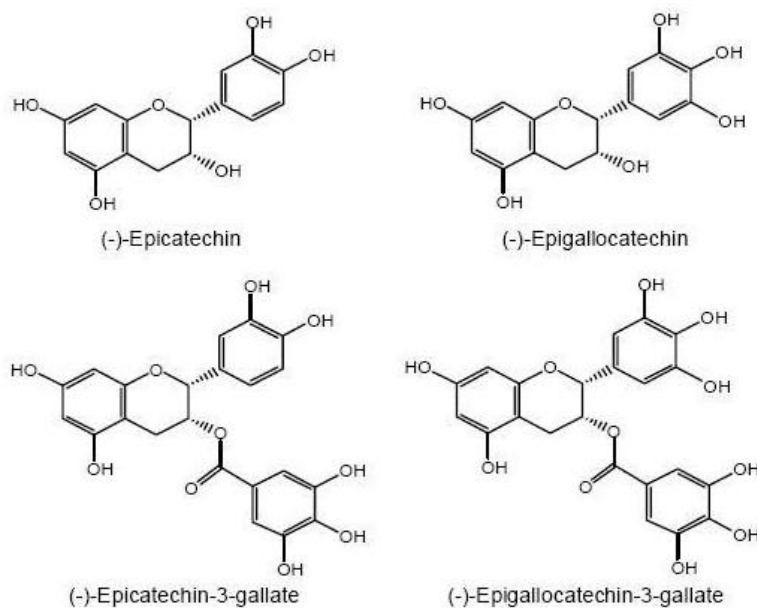
### 1. [Généralités sur le thé](#)

Le thé (*Camelia sinsensis L*) est la boisson la plus consommée dans le monde après l'eau. Cette plante est connue depuis plusieurs millénaires, en particulier dans les populations asiatiques, qui lui attribuent des propriétés médicinales. Il existe plusieurs types de thé. Leur composition qualitative et quantitative est dépendante du mode de fabrication, du type de culture et du type de cueillette. Le thé est particulièrement riche en composés phénoliques, puisque ceux-ci représentent le tiers de la matière sèche de la feuille (Balentine *et al.*, 1997).

#### a) [Les principes actifs](#)

Les feuilles de thé contiennent surtout des flavonoïdes et des méthylxantines (caféine et théobromine). Les principales classes des flavonoïdes du thé sont des flavanols et des flavonols, qui représentent 30 à 42 % de la masse sèche des feuilles (Brown, 1999). Les flavonols du thé sont la quercétine, le kaempférol, la myricétine et leurs glycosides (Cabrera *et al.*, 2006). Parmi les flavanols, les catéchines sont prédominantes. Les quatre principales catéchines retrouvées dans les feuilles de thé fraîches sont : l'épigallocatechine-3-gallate ou EGCG (59 % des catéchines),

l'épigallocatechine EGC (19 %), l'épicatéchine-3- gallate ECG (13,6 %) et l'épicatéchine EC (6,4 %) d'après McKay et Blumberg (2002) (cf. figure 52).



**Figure 52** : Les catéchines du thé (Higdon and Frei, 2003).

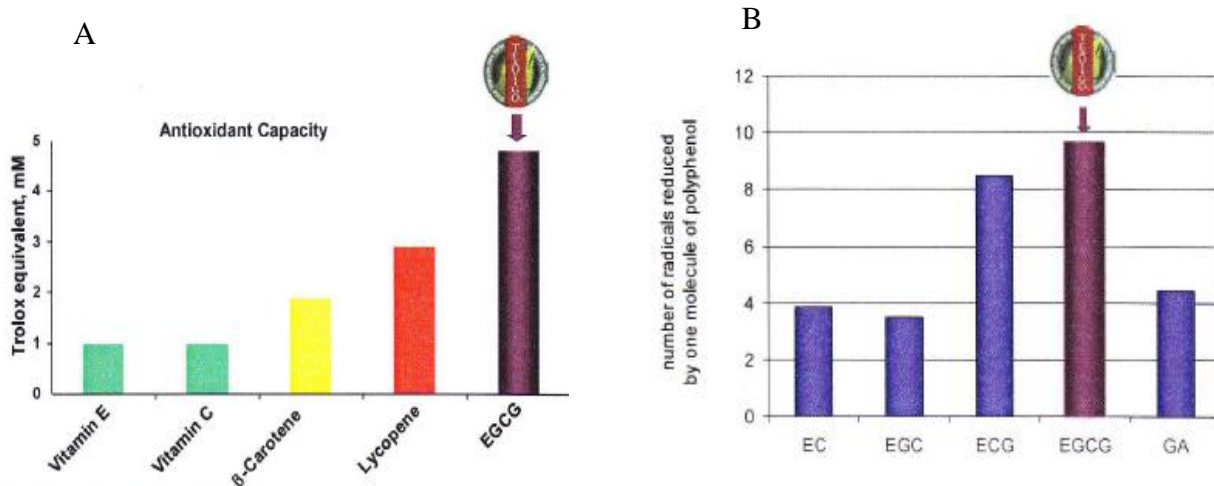
On trouve également la vitamine C et les vitamines B1, B2, B3, B5, et B11. La vitamine E, étant liposoluble, n'est pas retrouvée dans l'infusion de thé, contrairement aux vitamines B et C qui sont hydrosolubles. Quant à la vitamine C, elle n'est présente que dans le thé vert, car elle est détruite par le processus de fermentation. Cependant, comme elle est sensible à la chaleur, elle est aussi détruite lors de l'infusion.

La transformation du thé vert entraîne une perte de principes actifs. Les catéchines incolores du thé vert sont transformées en différents produits de couleur orange-jaune à rouge brun, par une série de réactions de condensation oxydative conduisant à la formation d'un grand nombre de composés polyphénoliques organoleptiques volatils. L'oxydation des catéchines en quinones actives est la première modification observée au cours de la fermentation, catalysée par la polyphénol oxydase. Des biopolymères de flavonoïdes, les théaflavines, apparaissent ensuite. On les différencie en fonction du nombre de molécules d'acide gallique estérifiées. Les théaflavines sont représentées à hauteur de 0,3 à 2 % dans le thé noir. Elles sont colorées en rouge et sont astringentes. L'acide gallique peut être oxydé en quinone d'acide gallique par la même enzyme.

L'activité antioxydante du thé pourrait être due à la présence de flavonoïdes en particulier les catéchines qui neutralisent les espèces réactives de l'oxygène (Middleton *et al.*, 2000). Les flavonoïdes peuvent également chélater les ions métalliques libres en particulier le fer et le cuivre, ce qui réduit la production d'espèces réactives de l'oxygène catalysée par les métaux (Miller *et al.*, 1996) (Morel *et al.*, 1993). L'EGCG et l'ECG, principales catéchines du thé vert sont des bons

piégeurs du radical peroxyde généré par le système hypoxanthine / xanthine oxydase. Les catéchines ont été classées en fonction de leur activité chélatante des métaux : épigallocatechine (EGC) > épicatechine gallate (ECG) ≈ épigallocatechine gallate (EGCG) > épicatechine (EC) (Guo *et al.*, 1996).

Il semblerait que l'EGCG ait la capacité antioxydante la plus élevée par rapport aux autres classes d'antioxydant et aux autres catéchines (cf. figure 53 A et B).



**Figure 53 : Capacité antioxydante de l'EGCG Teavigo® (DSM Nutritional Product).**

A : la capacité antioxydante a été déterminée par mesure d'équivalent Trolox (mmol/L).

Les molécules sont testées à 1mmol/L (adapté de van het Hof *et al.*, 1997)

B : la capacité antioxydante des catéchines a été mesurée par résonance de spin électronique (GA=acide gallique), adapté de Burns *et al.*, (2000).

## 2. Effets généraux de l'EGCG

De nombreuses études épidémiologiques ont associé la consommation de thé à des bénéfices pour la santé et à la prévention de pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers, les maladies neurodégénératives ou l'ostéoporose (McKay and Blumberg, 2002), (Rietveld and Wiseman, 2003), (Coimbra *et al.*, 2006).

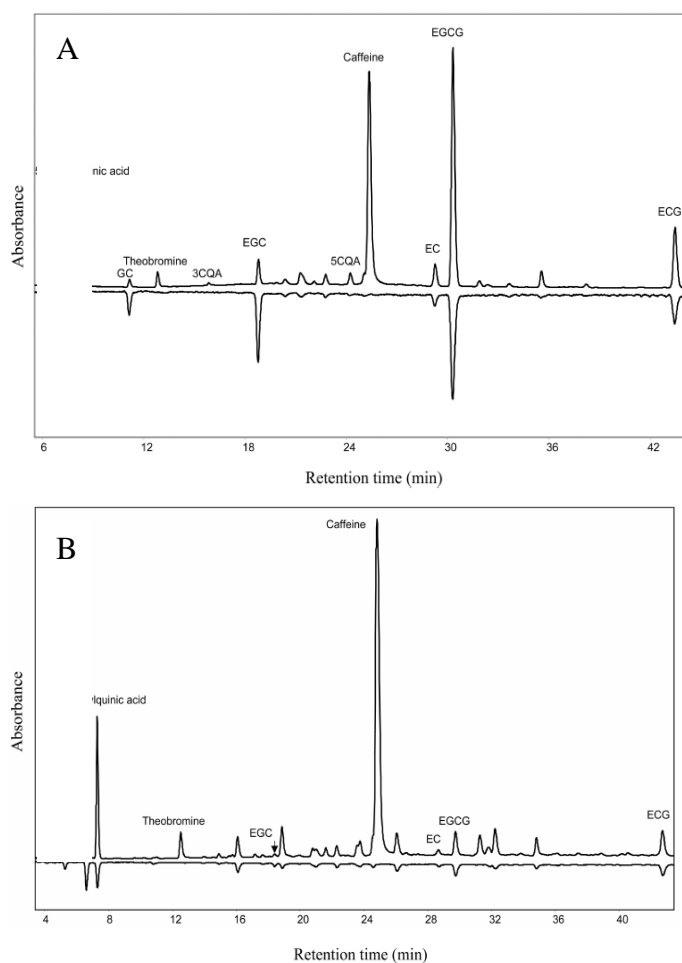
Gupta *et al.* (2001) ont montré sur des souris présentant un cancer de la prostate qu'un mélange de catéchine contenant 62% d'EGCG permettait d'inhiber le développement des métastases et de la tumeur. L'EGCG inhiberait l'enzyme cyclooxygénase-2 (Cox-2) sans affecter l'expression de Cox-1 (Hussain *et al.*, 2005).

Il protège également contre des lésions neuronales et un œdème cérébral induits après une ischémie unilatérale cérébrale chez des gerbilles (Lee *et al.*, 2004) et prévient les lésions oxydatives et inflammatoires ainsi que le dépôt de protéines β-amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer et serait un bon agent thérapeutique dans la maladie de Parkinson (Rezai-Zadeh *et al.*, 2005 ; Mandel *et al.*, 2008).

Au niveau cardiovasculaire, l'EGCG protège la cellule endothéliale et améliore le flux sanguin chez des patients souffrant d'atteintes coronaires (Widlansky *et al.*, 2007). Elle active la eNOs qui libère le NO vasodilatateur.

De plus, Nakagawa *et al.* (1999) ont montré qu'une administration d'extrait de thé vert, contenant majoritairement de l'EGCG, inhibe l'oxydation des phospholipides dans le plasma humain et réduit l'oxydation du LDL-cholestérol chez l'homme (Miura *et al.*, 2000 ; Yang *et al.*, 2000).

Enfin, l'EGCG protège la peau humaine des dommages induits par les UV en restaurant le taux de GSH intracellulaire et l'activité de la Gpx (Katiyar *et al.*, 2001). De plus, c'est la seule molécule des catéchines qui est présente dans le plasma en grande quantité (77 à 90%) tandis que les autres formes de catéchines sont conjuguées avec des acides glucuroniques ou des groupements sulfates (Chen *et al.*, 1997), et ne sont donc pas disponibles pour exercer un effet antioxydant. D'autre part, l'état d'oxydation du thé joue sur les propriétés antioxydantes de celui-ci. Stewart *et al.* (2005) ont comparé les profils chromatographiques du thé vert et du thé noir qui est oxydé de façon enzymatique, contrairement au premier. Le pic d'EGCG est présent uniquement dans le thé vert (cf. figure 54 A) alors qu'il disparaît du chromatogramme dans le cas du thé noir (cf. figure 54 B).



**Figure 54 : Chromatogramme des composants du thé vert et du thé noir (Stewart *et al.*, 2005).**

La principale modification à l'origine de la différence thé vert / thé noir est la disparition des catéchines (85 %) au cours de la fermentation. L'oxydation des feuilles de thé diminue donc finalement la capacité antioxydante de la plante.

### 3. Effet du thé vert et de l'EGCG sur le diabète

Des études *in vitro* ont montré que les catéchines du thé préviennent l'hyperglycémie en augmentant l'activité de l'insuline et en protégeant les cellules  $\beta$  du stress oxydant (Bolling *et al.*, 2009). Elles permettent également d'inverser ou de réduire les dommages du stress oxydant induit par des cytokines sur les cellules  $\beta$  (Han, 2003). Plus récemment, le rôle du thé comme modulateur de la sensibilité à l'insuline et facteur de prévention du diabète et de l'obésité, a été évoqué (Kao *et al.*, 2006) (Wolfram *et al.*, 2006). Waltner-Law *et al.* (2002) ont montré que l'EGCG mime l'insuline en diminuant l'expression des gènes contrôlant la néoglucogenèse et donc en diminuant la production de glucose hépatique. De plus, il augmente la phosphorylation du récepteur à l'insuline. Sur des modèles animaux, l'EGCG prévient la diminution de la masse des îlots induite par des injections de STZ (Song *et al.*, 2003) et réduit la prise de poids et de nourriture chez des rats obèses insulino-résistants associé à un effet anti-lipogénique et hypocholestérolémiant (Hasegawa *et al.*, 2003).

De par son fort pouvoir antioxydant, de nombreuses études ont été réalisées sur l'Homme, avec des effets divers. Ainsi Ryu *et al* (2006) ont montré que des patients diabétiques de type 2 n'amélioraient pas leur sensibilité à l'insuline après avoir bu pendant quatre semaines 9g de thé vert. Un extrait de thé vert administré pendant 2 mois n'avait également pas d'effet non plus sur la glycémie, le taux d'HbA1c et l'insulino-résistance chez 66 patients diabétiques (Fukino *et al.*, 2005), ni sur le glucose plasmatique et l'HbA1c chez 97 patients souffrant d'un diabète de type 2 (Mackenzie *et al.*, 2007).

#### E. L'exercice physique : oxydant ou antioxydant ?

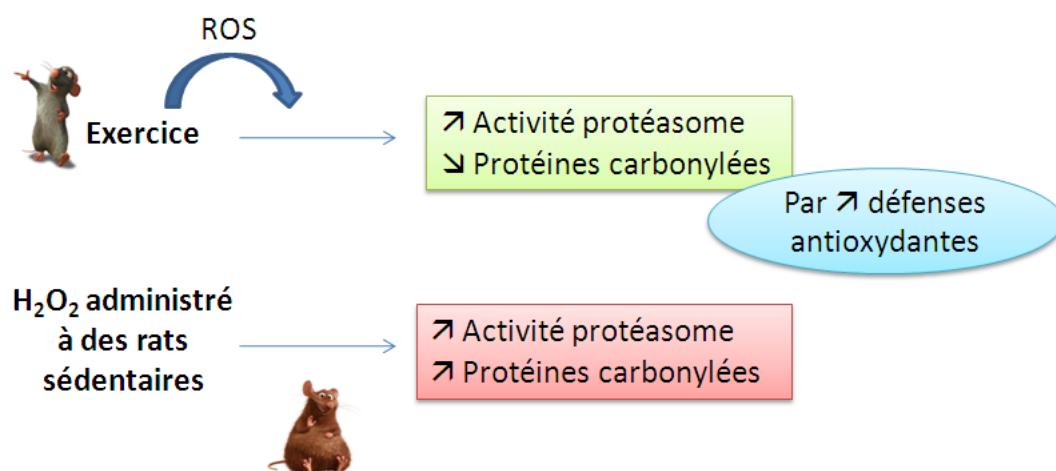
Dans nos sociétés, l'inactivité physique est associée à une augmentation de l'incidence de diverses maladies comme les maladies cardio-vasculaires, le diabète de type 2, l'obésité, l'atrophie musculaire, la maladie d'Alzheimer et de Parkinson (Booth and Lees, 2007).

L'exercice physique favorise l'augmentation des dépenses énergétiques et des activités oxydantes. Un exercice intensif augmente de 100 à 200 fois la consommation d'oxygène au niveau des muscles striés squelettiques et au niveau du myocarde et peut provoquer une augmentation de ROS (Davies *et al.*, 1982). En conséquence de l'augmentation de ces derniers, les lésions oxydatives des lipides, des protéines et de l'ADN ont été signalées à la suite des épisodes d'exercice (Alessio *et al.*, 1988 ; Davies *et al.*, 1982 ; Ikeda *et al.*, 2006).



En raison de leur instabilité, les ROS sont parfois difficiles à mesurer. Ils leur sont préférés des marqueurs biologiques comme le taux de lipides peroxydés par la méthode TBARS dont le malondialdéhyde fait partie. Le taux de ce dernier augmente de façon importante dans le muscle après un exercice maximal chez le rat (Brady *et al.*, 1979 ; Davies *et al.*, 1982). Des résultats similaires ont été obtenus chez l'Homme. Ainsi, les lipides peroxydés sont augmentés chez des coureurs de longue distance (Viinikka *et al.*, 1984 ; Duthie *et al.*, 1990). De plus, l'exercice intense diminue les concentrations en vitamine E du foie et des muscles (Aikawa *et al.*, 1984).

Cependant, des différences sont observées en fonction de l'intensité et de la durée de l'exercice. Selon Lovlin *et al.* (1987), un exercice intense augmente la peroxydation lipidique tandis que de courtes périodes d'exercice pourraient l'inhiber. Des études menées *in vitro* dans des muscles de souris suggèrent une diminution de la production de lipides peroxydés avec un entraînement et de l'endurance (Alessio and Goldfarb, 1988). Il a été montré qu'un exercice régulier augmente l'activité du protéasome dans le myocarde et diminue le taux de protéines carbonylées. A l'opposé, une administration d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 2 semaines à des rats sédentaires aboutit à une activité accrue du protéasome mais à une augmentation de protéines carbonylées (cf. figure 55). Ces données suggèrent que l'exercice, au contraire d'un stress oxydant provoqué chez des rats sédentaires, stimule les mécanismes de résistance au stress oxydant en augmentant les systèmes de défenses antioxydantes (Radak *et al.*, 2000).



**Figure 55** : Effet de l'exercice contre un stress sédentaire (adapté de Radak *et al.*, 2000).

Cette génération de ROS lors d'un exercice est importante car elle conduit à un processus d'adaptation, qui permet de diminuer les ROS de par l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes et du protéasome pour la dégradation des protéines oxydées (Radak *et al.*, 2005). Il en résulte que l'exercice diminue l'incidence des maladies associées aux ROS comme les maladies

cardiovasculaires, les AVC, la maladie d'Alzheimer et certains types de cancers (Radak *et al.*, 2005 ; Mattson and Magnus, 2006 ; Mattson and Wan, 2005).

Dans le diabète, des études ont suggéré qu'une activité physique régulière, modérée, associée à un équilibre alimentaire permet de retarder l'apparition du diabète de type 2 chez des patients intolérants au glucose (Oppert, 2005). Ils ont également montré qu'après un exercice musculaire, il y avait une amélioration de la captation du glucose due à une augmentation de l'insulino-sensibilité qui persiste plusieurs heures après l'exercice, et à une meilleur efficacité des transporteurs GLUT 4 associée à une augmentation de l'hexokinase et de la glycogène synthase.

## OBJECTIFS

Le but de ce travail est de définir le rôle propre du stress oxydant dans l'apparition du diabète et de ses complications, de quantifier le stress oxydant et d'évaluer l'effet préventif d'antioxydants d'origine naturelle.

Dans un premier temps, une méthode de screening cellulaire sur des cellules  $\beta$  insulino-sécrétrices de rat (RINm5F) doit être développée. Cette approche permettra la sélection d'un ou de plusieurs antioxydants d'origine naturelle ayant les propriétés de prévention les plus importantes, parmi un extrait de polyphénols de vin rouge de Corbières (AOC), un extrait de thé vert contenant de l'épigallocatechine gallate, le resvératrol *cis* et *trans*, et la procyanidine B2.

Dans un second temps, le travail s'est focalisé sur la mise au point d'un modèle animal diabétique présentant un stress oxydant. Ces animaux sont caractérisés par la présence d'une intolérance au glucose et d'un hyperinsulinisme chronique.

Enfin le troisième objectif est de valider les antioxydants sélectionnés dans la première partie de l'étude, sur ce modèle de rat intolérant au glucose, par son retentissement direct sur le contrôle métabolique et les marqueurs du stress oxydant, et indirect sur la stéatose hépatique développée dans ce modèle.

# MATERIELS ET METHODES

## I. Etudes des antioxydants sur des cellules bêta pancréatiques

### A. Matériels

#### 1. Lignée cellulaire

Les cellules cancéreuses d'insulinôme de rat clone m5F ou RINm5F (ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, USA) sont issues d'un clone de cellules  $\beta$  RIN-m, qui produisent et sécrètent de l'insuline. Les cellules sont cultivées en milieu RPMI-1640 (Sigma, St Louis, USA) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (Sigma) et de 1% de solution antibiotique-antimycotique (ABAM, Gibco®, Invitrogen, Grand Island, USA) comprenant 10 000U/mL de pénicilline G associée à 10mg/mL de streptomycine et 25 $\mu$ g/mL d'amphotéricine B. Les cellules sont incubées à 37°C sous atmosphère enrichie à 5% en CO<sub>2</sub>. Lorsque les cellules sont en phase de pré-confluence (80% de confluence), elles sont trypsinées à l'aide de trypsine EDTA à 0,05% (Sigma). Le milieu est changé toutes les 48 heures.

#### 2. Molécules antioxydantes

Les extraits de polyphénols de vin rouge (RWP pour Red Wine Polyphenols) proviennent d'un vin rouge français (Corbières, AOC) et ont gracieusement été fournis par le Professeur M. Moutounet de l'Institut National de la Recherche Agronomique (Montpellier, France) et analysés par le Professeur PL. Teisseidre du Département d'Œnologie (Bordeaux, France). Les composés phénoliques de l'extrait ont été adsorbés sur une colonne préparatrice, puis désorbés à l'aide d'alcool. L'éluât ainsi obtenu a été doucement évaporé et le résidu a été lyophilisé puis pulvérisé pour obtenir l'extrait sec. Un litre de vin rouge produit 2,9g d'extrait phénolique, qui contient 471mg de composés phénoliques totaux par gramme d'extrait, exprimé en acide gallique. Les taux phénoliques de l'extrait ont été mesurés par HPLC. L'extrait contient 8,6mg/g de catéchine, 8,7mg/g d'épicatéchine, des dimères (B1 : 6,9mg/g ; B2 : 8,0mg/g ; B3 : 20,7mg/g et B4 : 0,7mg/g), des anthocyanines (malvidin-3-glucoside : 11,7 mg/g ; peonidin-3-glucoside : 0,66mg/g et cyanidine-3-glucoside : 0,06mg/g) et des acides phénoliques (acide gallique : 5,0mg/g ; acide caféique : 2,5mg/g et acide caftarique : 12,5mg/g). Une solution mère d'extrait de polyphénols est préparée à 10mg/mL dans 50% d'éthanol en diluant la poudre dans un mélange volume à volume d'eau distillée et d'éthanol 100%. L'épigallocatechine gallate (EGCG), forme pure d'un extrait de thé vert Teavigo® (DSM Nutritional Product, Gland, Suisse) est préparée sous forme d'une solution stock à 10mg/mL en dissolvant la poudre dans du milieu pour la culture des cellules RINm5F.

Les molécules chimiques caractérisées et utilisées sont le resvératrol *trans* (Rt) (Sigma), le resvératrol *cis* (Rc) synthétisé par un processus chimique par le Docteur P. Chabert du Laboratoire de Chimie des Polyphénols (Strasbourg, France). Les deux produits sont préparés de façon extemporanée dans de l'éthanol 100%, respectivement à des concentrations mères de 20mmol/L et 10mmol/L pour Rt et Rc. La procyanidine B2 (PB2), (Extrasynthèse, Lyon, France) est préparée à une concentration initiale de 10mg/mL dans du tampon Phosphate-Buffered Saline (PBS) (Gibco®, Invitrogen) et conservée à - 80°C. Tous les composés antioxydants sont préparés à l'abri de la lumière.

### 3. Molécules induisant un stress oxydant

Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), plus communément appelé eau oxygénée, est préparé extemporanément à partir d'une solution commerciale à 33% (Sigma) qui est diluée dans du milieu de culture. La streptozotocine, STZ, (Sigma) sous forme de poudre est dissoute dans un tampon citrate à 0,1mol/L à pH acide (pH 4,2). Un mélange d'hypoxanthine (Sigma) et de xanthine oxydase issue de lait de babeurre (Sigma) est réalisé en respectant un rapport de 1 pour 40 et est également utilisé pour induire un stress oxydant. Les deux molécules sont préparées séparément, l'hypoxanthine (HX) est diluée dans du PBS et solubilisée avec de l'hydroxyde de sodium 5N et la xanthine oxydase est diluée dans du PBS également. Les deux molécules sont conservées à - 80°C.

## B. Méthodes

### 1. Viabilité cellulaire

Le screening de molécules antioxydantes a été réalisé à l'aide d'un test de cytotoxicité mesurant la viabilité cellulaire, le CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, Madison, USA). Il s'agit d'une méthode colorimétrique basée sur la réduction du composé tétrazolium [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tétrazolium, appelé MTS en un produit coloré, le formazan. La réaction est permise grâce à des enzymes de la famille des déshydrogénases présentes dans les cellules métaboliquement actives. La quantité de formazan produite est proportionnelle à l'activité cellulaire et peut être extrapolée à la prolifération cellulaire. Les cellules sont pour celaensemencées dans des micro-plaques 96 puits traitées (BD Falcon™, Franklin Lakes, USA) à raison de 30 000 cellules par puits dans un volume de 200µL de milieu de culture supplémenté et incubées pendant 48 heures avant le test.

Dans un premier temps, les molécules générant un stress oxydant sont testées seules. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est testé de 0 à 50µmol/L pendant 30 minutes, STZ de 0 à 50mmol/L pendant 2 heures et le couple HX/XO de 0 à 0,3mmol/L pour HX et 0 à 12mU/mL pour XO pendant une heure. Dans une

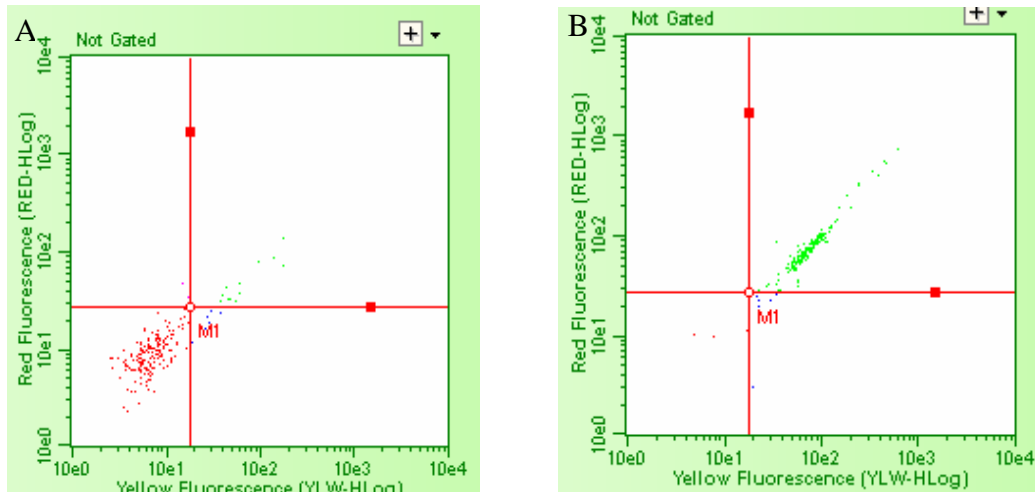
seconde partie, les antioxydants ont également été testés seuls pendant une heure à différentes concentrations : de 0 à 1000µg/mL pour les RWP, 0 à 1000µmol/L pour Rc et Rt, et 0 à 1000µg/mL pour ECGC et PB2. Enfin, dans une dernière partie, les tests ont été réalisés avec une pré-incubation des molécules antioxydantes pendant une heure aux concentrations décrites ci-dessus. Puis sont ajoutées des solutions de molécules oxydantes à des concentrations finales de 40µmol/L pendant 30 minutes pour H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de 25mmol/L pour la STZ pendant 2 heures ou un mélange de 0,25mmol/L d'HX avec 10mU/mL de XO pendant une heure.

Après le traitement, les puits sont rincés à l'aide de PBS, puis 100µL de milieu de culture supplémenté et 20µL de MTS sont ajoutés. Les plaques de culture sont incubées 2 heures à 37°C en atmosphère enrichie à 5% en CO<sub>2</sub>, et l'absorbance est mesurée à 490nm sur un lecteur de micro-plaque 96 puits Metertech 960 (Metertech Inc., Taipei, Taiwan). Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité par rapport au témoin négatif qui correspond à des cellules sans traitement.

## 2. Détection de l'apoptose par cytométrie en flux (Annexine V-PE)

Les cellules sont cultivées en plaque de 96 puits et le témoin positif d'apoptose (cinnamaldéhyde oxydé ou acide cinnamique ou (E)-3-phényl-2-propénal) est co-incubé à une concentration finale dans le puits de 0,25µmol/L avec les cellules, pendant 48 heures.

Les molécules oxydantes seules ou les composés antioxydants seuls ou les deux sont incubés au temps déterminés précédemment. Puis 10µL de réactif Guava Nexin (Millipore, Guava Technologies, Hayward, CA) sont ajoutés pendant 15 minutes. Le réactif comprend deux fluorophores : la phycoerythrine (PE) couplée à l'annexine-V et la 7 amino-actinomycineD (7'AAD). Le premier marque les cellules en apoptose car dans cet état, elles externalisent de la membrane les phosphatidylsérines, ligand de l'annexine-V, par un phénomène de flip-flop. Le second marque les cellules mortes d'une manière générale. Les cellules sont ensuite décollées de leur support selon un procédé confidentiel, développé par l'équipe du Dr CD. Muller de la Faculté de Pharmacie (Illkirch, Strasbourg), et les plaques de tests sont insérées dans le cytomètre en flux Guava Easycyte (Millipore). Les fluorophores sont excités à une longueur d'onde de 488nm et réémettent à une longueur d'onde d'émission de 575 et 647nm respectivement pour PE et 7'AAD. Cette technique permet de discriminer des cellules en apoptose précoce (annexinV-PE positive / 7'AAD négatif) et des cellules en apoptose tardive (annexinV-PE positive / 7'AAD positif). Pour chaque test, 200 événements sont collectés et les résultats sont analysés avec le logiciel CytoSoft 5.3 (Guava Technologies Inc., Hayward, CA, USA), (cf. figure 56). Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules apoptotiques (fluorescentes) par rapport au nombre total de cellules comptées.



**Figure 56 : Analyses des résultats par le logiciel CytoSoft 5.3.**

Les cellules marquées de façon différente apparaissent dans les différents cadrans. Par exemple, des cellules non marquées par l'iodure de propidium et le PE apparaîtront dans le cadran en bas à gauche (A) au contraire des cellules ayant incorporées les deux fluorophores qui apparaîtront en haut à droite (B). Les pourcentages de cellules dans chacun des cadrans sont ensuite calculés.

### [3. Détection de l'apoptose par cytométrie en flux \(Caspase 8 et 9\)](#)

Les cellules RINm5F sontensemencées dans des plaques de 96 puits à raison de 10 000 cellules par puits, dans 200µL de milieu de culture et incubées 48 heures avant le test, à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. L'apoptose des cellules est induite par des concentrations croissantes d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, puis 10µL de chaque caspase sont ajoutés dans chaque puits : caspase 9-SR (sulforhodamine) et caspase 8-FAM (carboxyfluoresceine), mélangées et incubées une heure à 37°C (kit Guava Caspase 8 FAM et Caspase 9 SR, Guava Technologies Inc.). Puis 100µL de tampon de lavage 1X sont déposés dans les puits, les plaques sont ensuite centrifugées 5 minutes à 300g (24°C). Après avoir retiré le surnageant, 200µL de tampon de lavage 1X sont ajoutés et les cellules sont doucement remises en suspension, puis centrifugées 5 minutes à 300g et le surnageant est retiré. Enfin, 200µl de solution de 7'AAD sont ajoutés et les plaques sont incubées 10 minutes à température ambiante et dans l'obscurité. Pour chaque test, 200 événements sont collectés et les résultats sont analysés avec le logiciel CytoSoft 5.3 (Guava Technologies Inc.). Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules marquées au SR ou FAM par rapport au nombre total de cellules comptées.

### [4. Mesure de la production de peroxyde d'hydrogène par cytométrie en flux \(DCFH-DA\)](#)

Les cellules RINm5F sontensemencées dans des plaques de culture cellulaire de 24 puits traitées (BD Falcon™, Franklin Lakes, USA) à raison de 500 000 cellules/puits dans un volume de 1mL de milieu de culture supplémenté pendant 48 heures. Les molécules oxydantes ou les composés antioxydants ou les deux sont incubés aux temps déterminés par le test de viabilité

cellulaire au Cell Titer. Puis le milieu est retiré et 500µL de milieu frais sont ajoutés, additionnés de 2',7'-Dichlorofluorescein diacétate (DCFH-DA, Sigma) à une concentration finale de 5µM. La DCFH-DA, lorsqu'elle rentre dans la cellule, est désacétylée par les estérases de la membrane, puis la forme DCFH est transformée par le peroxyde d'hydrogène intracellulaire en un composé fluorescent, le DCF. Les cellules sont incubées pendant une heure, puis le milieu est retiré, les cellules sont lavées au PBS et trypsinées. Après centrifugation, les culots cellulaires sont dissouts avec 500µL de PBS et 200µL de suspension sont transférés dans des micro-plaques de 96 puits. 10µL d'iodure de propidium (PI) sont ajoutés pendant 15 minutes et les plaques sont déposées dans le cytomètre Guava Easycyte avec une longueur d'onde d'excitation à 488nm pour des émissions respectives à 647 et 530nm pour le PI et la DCF. Les données sont analysées avec le logiciel CytoSoft 5.3 (Guava Technologies Inc.), exprimées en pourcentage de cellules marquées et comparées au témoin sans traitement.

#### 5. Etudes des gènes du stress oxydant et des défenses antioxydantes par RT-qPCR array

Les extractions d'ARN totaux ont été réalisées avec un tampon d'extraction TRI<sup>®</sup> Reagent (Sigma, Steinheim, Allemagne) sur des cellules en culture après traitement. 5 minutes après ajout du produit, 200µL de chloroforme Purex (Carlo ERBA Réactifs SDS, Peypin, France) sont ajoutés et la solution est vivement mélangée. Après repos de 10 minutes, les solutions sont centrifugées à 12 000g pendant 15 minutes à 4°C (Centrifugeuse Allegra<sup>™</sup> 21R, Beckman, Fullerton, CA, USA). La phase aqueuse est prélevée et les ARN sont précipités par ajout de 500µL d'isopropanol (Fluka, Buchs, Suisse). Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, les solutions sont centrifugées à 12 000g pendant 10 minutes à 4°C (Centrifugeuse Allegra<sup>™</sup> 21R, Beckman). Les ARN sont ensuite lavés par ajout d'un mL d'éthanol 75% glacé (Labonord, Templemars, France), puis centrifugés à 7 500g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot contenant les ARN est ensuite séché à température ambiante pendant 5 minutes puis dissous par ajout de 20µL d'eau milliQ (Millipore) et chauffé à 55°C dans un bain-marie à sec pendant 10 minutes.

Le dosage des ARN est réalisé en les diluant au 1/50<sup>ème</sup> dans de l'eau milliQ et l'absorbance est mesurée à 260 et 280nm (spectrophotomètre Beckman DU<sup>®</sup>530, Beckman, Fullerton, CA, USA). Le ratio  $A_{260}/A_{280}$  rend compte de la pureté de la préparation et doit être proche de 2. La concentration en ARN est calculée en sachant qu'une unité d'absorbance à 260nm équivaut à 40µg d'ARN simple brin/mL.

Les ARNs sont ensuite transcrits par le kit RT<sup>2</sup> First Strand Kit (SABiosciences, Frederick MD, USA). Les ARNs sont débarrassés de potentiels contaminants d'ADN génomique (ADNg) par ajout de 2µL de tampon d'élimination d'ADNg concentré 5X (GE) à 1µg d'ARN extrait, dans un



volume final de 10 $\mu$ L, complété à l'aide d'eau sans RNase fournie par le kit. Cette solution est incubée à 42°C pendant 5 minutes et placée une minute dans la glace. 10 $\mu$ L de solution « cocktail » de reverse transcription sont ensuite préparés par échantillon, en ajoutant : 4 $\mu$ l d'un tampon de reverse transcription 3 concentré 5X (BC3), 1 $\mu$ L de primers hexamériques aléatoires (P2), 2 $\mu$ L d'un mélange d'enzyme de reverse transcription (RE3) et 3 $\mu$ L d'eau sans RNase. Le mélange est ensuite incubé précisément 15 minutes à 42°C et la réaction est arrêtée par chauffage de la solution à 95°C pendant 5 minutes (thermocycleur iCycler<sup>TM</sup> Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). L'ADN complémentaire (ADNc) ainsi formé est directement utilisé en étape de PCR ou conservé à -20°C.

L'étude des gènes du stress oxydant et des défenses antioxydantes est réalisée à l'aide d'un kit RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR Array « Rat Oxidative Stress and Antioxydant Defense » (PARN-065A, SABiosciences). Le kit contient une plaque 96 puits contenant les amorces spécifiques de 84 gènes impliqués dans le stress oxydant, 5 gènes de références, des contrôles de transcription, d'amplification d'ADNg et des contrôles positifs (cf. figure 57).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Aass	Als2	Apc	Apoe	Aqr	Cat	Ccs	Cmya1	Ctsb	Duox2	Cygb	Dhcr24
B	Dnm2	Duox1	Ehd2	Epx	Ercc2	Ercc6	Fancc	Fmo2	Gab1	Gpx1	Gpx2	Gpx3
C	Gpx4	Gpx5	Gpx6	Gpx7	Gsr	Gstk1	Hba-a1	Hbz	Idh1	LOC387198	Lpo	Mb
D	Mpo	Mpp4	Ncf1	Ncf2	Ngb	Nos2	Nox4	Noxa1	Noxo1	Nqo1	Nudt1	Nudt15
E	Nxn	Park7	Ppp1r15b	Prdx1	Prdx2	Prdx3	Prdx4	Prdx5	Prdx6	Pmp	Psmb5	Pigs1
F	Ptgs2	Rag2	RGD1307506	RGD1560658	RGD1565187	Scd1	Sib	Slc38a1	Slc38a4	Slc38a5	Slc41a3	Sod1
G	Sod2	Sod3	Srxn1	Tmod1	Tpo	Txnip	Txnrd1	Txnrd2	Ucp3	Vim	Xpa	Zmynd17
H	Rplp1	Hprt	Rpl13a	Ldha	Actb	RGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

**Figure 57 : Plan de plaque des gènes « Rat oxidative stress and antioxydant defense » (PARN065A, SABiosciences)**

(RTC = reverse transcription control ; PPC = Positive PCR control)

Rapidement, 200ng d'ADNc (20 $\mu$ L) d'une condition de traitement sont ajoutés à 1,275mL de RT<sup>2</sup> qPCR Master Mix (contenant la Taq DNA polymérase, les nucléotides et le Sybr Green qui s'intercale dans l'ADN double brin) dans un volume final de 2,55mL. 25 $\mu$ L de ce mélange sont dispatchés dans les 96 puits qui sont ensuite recouverts par des capuchons. La plaque est centrifugée 30 secondes à 400rpm et disposée dans le thermocycleur. L'amplification d'ADN est mise en évidence par intercalation du Sybr Green dans les doubles brins d'ADN. Le signal fluorescent est capté par le module optique MyiQ<sup>TM</sup> (Bio-Rad). Le programme de qPCR ainsi que le plan de plaque sont prédéfinis et l'analyse des résultats est réalisée sur l'interface du site SABiosciences (<http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>). Les résultats d'expression des gènes apparaissent en nombre de fois par rapport au témoin sans traitement.

## 6. Enzymes antioxydantes CAT et SOD

Les extractions protéiques ont été réalisées avec un tampon de lyse contenant du Tris ultra pure pH 8 à 20mmol/L (Euromedex, Mundolsheim, France), du NaCl à 137mmol/L NaCl (Sigma), de l'Igepal CA-630 1% (Sigma), du PMSF ou phényl méthyl sulfonide fluoride à 31mmol/L (Eurobio, Les Ullis, France) et 10% de glycérol (Sigma) avec un inhibiteur de protéase Complete Mini® (Roche, Indianapolis, USA) dilué au 1/10<sup>ème</sup> dans de l'eau distillée. Dix µL de XT sample buffer 4x (Bio-Rad, Hercules, USA) sont ensuite ajoutés à 50µg de protéines totales puis chauffés 5 minutes à 95°C et déposés sur un gel dénaturant SDS-PAGE Criterion™ XT 4-12% Bis-Tris gel (Bio-Rad). La migration est réalisée dans un tampon XT MES Running buffer (Bio-Rad) à 200V pendant 35 minutes. Ensuite, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose de 0,45µm (Bio-Rad) dans un tampon de transfert Tris/glycine pendant 30 minutes à 100V. Les membranes sont ensuite saturées en utilisant la solution de blocage du kit WesternBreeze® Chemiluminescent (Invitrogen, Grand Island, USA) pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation faible et rincées deux fois avec de l'eau distillée. Elles sont ensuite incubées avec un anticorps primaire anti-catalase produit chez la souris dilué au 1/1000<sup>ème</sup>, un anticorps primaire anti-SOD produit chez le rat (Sigma) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> ou un anticorps monoclonal anti β-actine produit chez la souris (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) dilué au 1/5000 dans la solution de blocage sur la nuit à 4°C. Les membranes sont ensuite lavées 3 fois avec la solution de lavage du même kit et l'anticorps secondaire (anti-souris ou anti-rat) est ajouté pendant 30 minutes. Les membranes sont à nouveau rincées avec la solution du kit puis à l'eau distillée. La révélation des membranes est réalisée avec la combinaison d'un substrat chimioluminescent (ECL) et d'un initiateur de réaction (enhancer) qui réagissent à l'enzyme couplée à l'anticorps secondaire, la phosphatase alcaline (PAL). Les membranes sont ensuite exposées dans un système de détection ChemiDoc XRS (Bio-Rad) surmonté d'une caméra (pendant 600 secondes) et les images sont capturées et analysées par le logiciel Quantity One. Les expressions de la CAT et de la SOD sont normalisées par rapport à la quantité de β-actine et les quantités sont exprimées en pourcentage par rapport au témoin négatif sans traitement.

## 7. Détection des protéines carbonylées par ELISA

Le dosage des protéines carbonylées s'effectue à l'aide d'un kit ELISA OxiSelect™ Protein Carbonyl (Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA). Les groupements carbonyles des protéines, fixées au fond des puits, résultant d'une modification covalente induite par les dérivés radicalaires ou les espèces réactives de l'oxygène, sont mis en évidence par réaction avec la dinitrophénylhydrazine (DNPH) pour former une dinitrophénylhydrazone (DNP-hydrazone). Celle-ci va être reconnue par un anticorps primaire anti-DNP IgG de lapin qui va fixer un anticorps

secondaire conjugué à la HRP. La quantité de protéines carbonylées est proportionnelle à la quantité de substrat transformée par la HRP et les concentrations inconnues sont déterminées par droite d'étalonnage de BSA oxydées.

Rapidement, les cellules sont cultivées en boîte de Pétri 150mm (Iwaki, Asahi Techno Glass Corp., Tokyo, Japan) pendant 48 heures à raison de  $15 \cdot 10^6$  cellules par boîte. Après induction du stress ou test des antioxydants ou des deux aux temps et doses déterminées, les cellules sont rincées au PBS et 500 $\mu$ L de tampon de RIPA (Millipore, Temecula, CA, USA) contenant un inhibiteur de protéase dilué au 1/10<sup>ème</sup> (Complete Mini®, Roche) sont ajoutés. Les cellules sont décollées à l'aide d'un grattoir à cellules (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Allemagne), récoltées et centrifugées. Cent  $\mu$ L d'échantillon contenant 10 $\mu$ g/mL de protéines ou de point de gamme de BSA oxydée, sont déposés dans une plaque 96 puits et incubés à 4°C pendant toute la nuit. Les échantillons sont ensuite lavés trois fois au PBS 1X et 100 $\mu$ L de solution contenant le DNPH sont incubés pendant 45 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante. Les puits sont ensuite lavés 2 fois pendant 5 minutes avec du PBS 1X / éthanol (v/v), puis 2 fois 5 minutes avec du PBS seul. La solution de saturation est ajoutée aux échantillons et incubée pendant une heure. Trois rinçages sont ensuite réalisés avec une solution de lavage fournie dans le kit. Les échantillons sont ensuite mis en contact avec 100 $\mu$ L d'anticorps primaire anti-DNP produit chez le lapin dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans la solution de saturation, et incubés pendant une heure à température ambiante. Les puits sont rincés 3 fois comme vu précédemment. Les échantillons sont ensuite mis en contact avec l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la HRP, pendant une heure, puis rincés 5 fois avec la solution de lavage. Cent  $\mu$ L de substrat sont ajoutés dans chaque puits, incubés 5 minutes puis 100 $\mu$ L de solution d'arrêt sont ajoutés afin de stopper la réaction. La lecture de l'absorbance est réalisée immédiatement à 450nm sur le lecteur iMark (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). La quantité de protéines carbonylées des échantillons est exprimée en nmol/mg de protéines totales.

## 8. [Mesure de la peroxydation lipidique](#)

La peroxydation lipidique est mesurée par la quantification du malondialdéhyde libre (MDA), un produit de dégradation des réactions de peroxydation lipidique se formant lors de l'attaque des lipides polyinsaturés par des espèces réactives de l'oxygène. La mesure du MDA dans chaque échantillon est réalisée par spectrophotométrie à l'aide du kit BIOXYTECH® MDA-586<sup>TM</sup> (Oxis Research, Foster City, CA, USA). Rapidement, les cellules sont mises en culture, à raison de  $15 \cdot 10^6$  par boîtes de Pétri de 150mm pendant 48 heures. Les cellules sont ensuite traitées ou non avec les antioxydants et les molécules pro-oxydantes aux temps et concentrations préalablement déterminées. Les cellules sont lysées à l'aide du tampon RIPA (Millipore), récupérées, centrifugées

à 3000g pendant 10 minutes à 4°C. Puis 1% de  $\beta$ -mercaptoéthanol est ajouté dans un microtube de 1,5mL à 40 $\mu$ L de surnageant cellulaire après centrifugation, pour éviter l'oxydation. 2 $\mu$ L de probucol y sont ajoutés ainsi que 128 $\mu$ L de réactif R1. Les microtubes sont vortexés rapidement et 30 $\mu$ L de réactif R2 sont déposés avant de vortexer soigneusement les tubes et de les incuber 1 heure à 45°C dans un bain-marie à sec. Les échantillons sont ensuite centrifugés 10 minutes à 10 000g et l'absorbance est déterminée à 586nm (spectrophotomètre Beckman DU<sup>®</sup>530, Beckman, Fullerton, CA, USA) pour calculer le taux de MDA libre à partir d'une courbe étalon. Les résultats sont exprimés en  $\mu$ mol/L par rapport au témoin négatif.

## 9. Analyses statistiques

Pour chaque test, les résultats sont présentés par leur moyenne  $\pm$  écart-type (avec  $n \geq 3$ ). La significativité des tests statistiques est donnée par les tests One Way Anova avec une comparaison de Student Newman-Keuls post hoc pour des échantillons indépendants à plusieurs variables ou par un T-test pour des échantillons dépendants (une seule variable). Des valeurs de  $p < 0,05$  sont considérés comme statistiquement significatives.

## II. Etudes des antioxydants *in vivo* chez le rat hyperinsulinique

### A. Mise au point du modèle animal

Pour l'étude des antioxydants *in vivo*, le choix s'est porté sur des rats Wistar mâles de 200g (8-10 semaines) du centre d'élevage DEPRE (Saint Doulchard, France). Les rats ont été bagués à l'oreille et ont subi une quarantaine d'une semaine avant de commencer l'étude.

L'induction d'un hyperinsulinisme conduisant à un diabète de type 2 chez le rat est rendu possible grâce à un régime alimentaire hypercalorique « WESTERN RD » (SDS, Special Diets Services, Saint Gratien, France). Ce régime « High Fat Diet » (HFD) contient en valeur brute 21,4% de matières grasses ; 17,5% de protéines ; 3,5% de fibres ; 4,1% de cendres (matières minérales) et 50% de sucre. Il s'agit d'un régime hypercalorique (4,6kcal/g de nourriture) et hyperlipidique, composé d'acides gras saturés (11,35%) majoritaires et d'acides gras polyinsaturés en moindre quantité (7,16%). Par comparaison l'alimentation des groupes témoins « Normal Diet » (ND) de la société SAFE (Augy, France) est de plus faible énergie (2,9kcal/g) et contient en valeur brute 3,1% de matières grasses ; 16,1% de protéines ; 3,9% de fibres et 5,1% de cendres. Pour réaliser cette étude, deux groupes d'animaux ont été réalisés de façon randomisée : un groupe ND + eau (6 rats) et un groupe HFD + eau (10 rats).

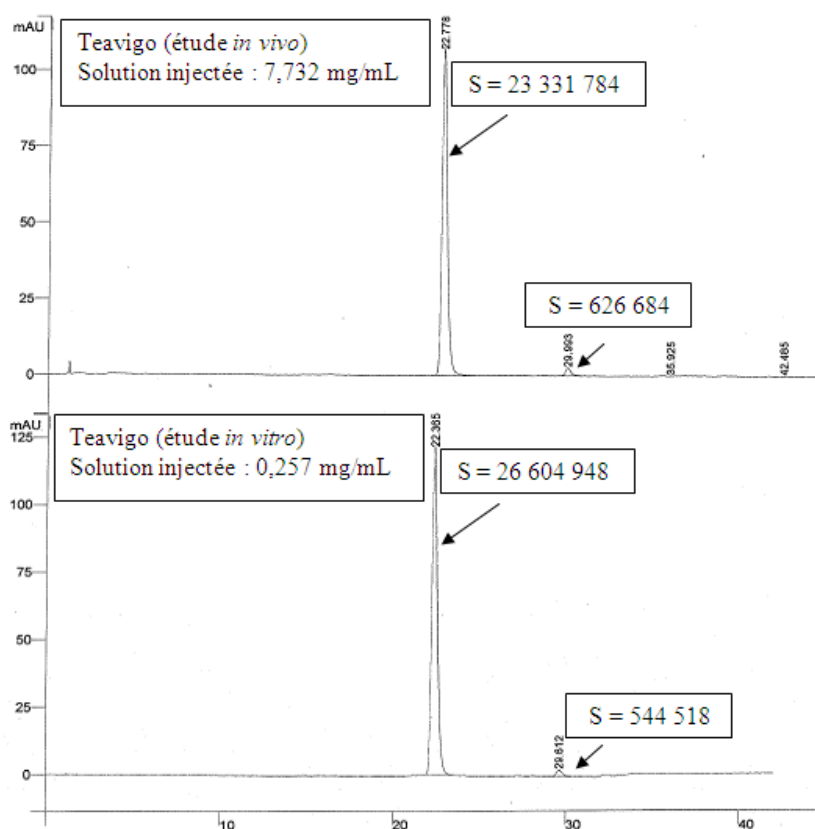
Les deux groupes ont été alimentés avec ces deux régimes pendant 7 mois et ont eu accès à la nourriture et à l'eau de boisson *ad libitum*. Les résultats ont montré qu'à deux mois de traitement par régime HFD, les rats présentaient un hyperinsulinisme marqué.

## B. Etudes des antioxydants et de l'exercice physique

Un régime alimentaire de deux mois HFD suffit pour induire un hyperinsulinisme. Ainsi 135 rats ont été traités pendant deux mois avec de la nourriture HFD (65 rats) et ND (65 rats) et de l'eau *ad libitum*. Après cette période, les animaux se sont vus administrer les antioxydants et faire de l'exercice tout en continuant leur régime alimentaire. Au sein des deux groupes initiaux, quatre sous-groupes ont été effectués de la façon suivante :

- Groupe ND + placebo (solvant)
- Groupe ND + RWP
- Groupe ND + EGCG
- Groupe ND + Exercice
- Groupe HFD + placebo (solvant)
- Groupe HFD + RWP
- Groupe HFD + EGCG
- Groupe HFD + Exercice

Chaque groupe comprend 15 animaux. Les polyphénols (RWP) sont les mêmes que ceux utilisés dans l'étude *in vitro*. En revanche, l'EGCG Teavigo<sup>®</sup> utilisée provient du même fournisseur que dans l'étude *in vitro* (DSM Nutritional Product, Gland, Suisse), mais n'a pas la même teneur en EGCG. L'EGCG utilisée est 34 fois moins concentrée que celle de l'étude *in vitro* (cf. figure 58).



**Figure 58 :** Etude de deux solutions de Teavigo par HPLC.

L'étude a été réalisée sur une colonne (dimensions :  $l = 0,125\text{mm}$  ;  $\Phi = 4,0\text{mm}$ ) en gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R ( $5\ \mu\text{m}$ ), à particules sphériques. La phase mobile est constituée de deux solvants (A : eau contenant 0,1% d'acide formique et B : méthanol contenant 0,1% d'acide formique). Le temps de rétention de l'EGCG est de 22,5 minutes.

En effet pour cette étude, 1,7g de produit fini commercial contient 50mg d'EGCG. Les molécules sont administrées dans les biberons à raison de 50mg/kg/jour. Les biberons sont préparés pour deux jours en semaine et trois jours pour le week-end. Le solvant utilisé pour diluer les poudres est de l'éthanol absolu à 3,3%. Les biberons sont recouverts de papier d'aluminium pour que les molécules ne soient pas détériorées par la lumière. Le groupe placebo reçoit uniquement du solvant comme boisson. Le groupe exercice reçoit le placebo en boisson et effectue une nage forcée dans de l'eau à ~33°C (cf. figure 59) pendant une heure, cinq fois par semaine, pendant toute la durée de l'étude (3 mois).



**Figure 59** : Nage des rats en piscine (source personnelle).

### C. Méthodes

#### 1. Masse des animaux et préparation des biberons d'antioxydants / placebo

La masse des animaux est relevée une fois par semaine (le lundi) pendant toute la durée de l'étude.

#### 2. Sacrifices, prélèvement des organes et dissections des artères

Des sacrifices ont eu lieu avant l'administration des antioxydants, du placebo et avant l'exercice soit 10 rats au total (5 rats HFD et 5 rats ND). Puis 5 rats par groupe sont sacrifiés chaque mois.

Les rats sont endormis avec un mélange xylazine / kétamine soit 2,7mL de Rompun<sup>®</sup> 2% (Bayer, Puteaux, France) ajouté à 10mL d'Imalgène<sup>®</sup> 1000 (Merial, Lyon, France) à une dose de 100µL/100g. Après vérification du stade de l'endormissement des animaux (vibrisses inertes, perte du réflexe palpébral, non réactivité à des stimuli externes), le rat est placé en décubitus dorsal et une laparotomie médiane xypho-pubienne des plans cutané puis musculaire est réalisée. Après dégagement des tissus conjonctifs et graisseux autour de la bifurcation aorto-iliaque, l'animal est exanguiné par ponction dans l'aorte, à l'aide d'une aiguille jaune Neolus 20G et d'une seringue de 10mL (Terumo Europe, Louvain, Belgique). Le sang total recueilli est directement transvasé dans



des tubes EDTA BD Vacutainer (BD, Plymouth, Royaume-Uni) puis centrifugé dans une centrifugeuse Eppendorf 5810R (Eppendorf AG, Hambourg, Allemagne) pendant 30 minutes à 4000g à 4°C. Le plasma dans la partie supérieure du tube est prélevé et conservé dans des micro-tubes de 2mL à -80°C.

Rapidement, le mésentère est prélevé et placé dans une solution de Krebs à pH 7,4 (118mmol/L NaCl ; 4,7mmol/L KCl ; 1,18mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 1,17mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O ; 1,25mmol/L CaCl<sub>2</sub> ; 25mmol/L NaHCO<sub>3</sub> et 11mmol/L glucose) jusqu'à dissection des artères sous loupe binoculaire. Puis le pancréas est prélevé suivi du rein, de la rate, de la graisse, du muscle gastrocnémien, du cœur, du foie total et des deux yeux. En parallèle, les aortes thoracique et fémorale sont prélevées et placées dans le Krebs.

Les vaisseaux (aorte, artère mésentérique et artère fémorale) prélevés et conservés dans du tampon Krebs sont rapidement disséqués sous loupe binoculaire afin de retirer le tissu conjonctif et adipeux sans léser l'endothélium vasculaire.

### 3. Etudes biochimiques plasmatiques

#### a) Dosage des protéines totales

Les protéines plasmatiques totales sont dosées par la méthode de Bradford. Les échantillons sont au préalable dilués au 1/100<sup>ème</sup> dans de l'eau distillée. 10µL d'échantillons dilués ou de point de gamme de BSA sont déposés dans une plaque 96 puits non stérile (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Allemagne), puis 200µL de réactif de Bradford (Bio-Rad, Munich, Allemagne) dilué au 1/5<sup>ème</sup> est ajouté aux échantillons. La réaction se poursuit dans le noir pendant 10 minutes, puis l'absorbance est lue à 595nm sur le lecteur de plaque 96 puits iMark (Bio-Rad). Les résultats sont déterminés à partir de la droite d'étalonnage obtenue avec la BSA et sont exprimés en mg.

#### b) Etude de la glycémie

La concentration en glucose plasmatique est déterminée à l'aide du kit de dosage Glucose RTU® (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). 10µL de plasma sont déposés au fond d'une semi-microcuve à spectrophotomètre en polystyrène (Ratiolab, Dreieich, Allemagne) et 1mL de réactif glucose RTU® est ajouté. La réaction se déroule pendant 20 minutes à température ambiante, puis l'absorbance est lue à 505nm au spectrophotomètre Beckman DU®530. La glucose oxydase contenu dans le réactif catalyse de façon spécifique l'oxydation du glucose produisant ainsi de l'acide gluconique et de l'eau oxygénée. Cette dernière va réagir avec du phénol et de l' amino-4 antipyrine pour former en présence de peroxydase un produit de couleur rose, la quinonéimine dont l'intensité de coloration est proportionnelle à la quantité de glucose présente dans l'échantillon. Les glycémies sont exprimées en g/L.

### c) Dosage du C-peptide

Le C-peptide reflète mieux la sécrétion d'insuline par le pancréas car celle-ci possède un temps de demi-vie extrêmement court. C'est pourquoi, il est mesuré dans le plasma par le kit ELISA C-peptide (Merckodia, Uppsala, Suède).

Le test repose sur un dosage immunologique enzymatique du C-peptide par la technique de sandwich directe. Des anticorps monoclonaux fixés aux plaques de microtitration, lient spécifiquement un épitope du C-peptide. Après lavage, des anticorps anti-peptide C conjugués à la peroxydase et dirigés contre un autre épitope se fixent sur le peptide et le surplus est enlevé. L'enzyme transforme alors son substrat TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine) en un produit coloré bleu (milieu neutre) qui devient jaune lorsque la réaction est arrêtée par ajout d'acide. La quantité de ce produit jaune a un pic d'absorption à 450nm et est proportionnelle à la quantité de C-peptide, déterminée par courbe d'étalonnage.

Les points de gamme sont reconstitués avec 1mL d'eau ultra pure (milliQ). Puis 10µL de plasma ou de points de gamme sont déposés en duplicate dans les puits. 50µL de tampon Assay Buffer sont ajoutés dans chaque puits et la plaque est incubée une heure à température ambiante sur un agitateur de plaque Titramax 100 entre 700 et 900rpm, (Heidolph Instruments, Schwabach, Allemagne). Les plaques sont ensuite lavées 6 fois à l'aide d'une pissette contenant la solution de lavage. 100µL de la solution d'enzyme conjuguée sont ajoutés dans chaque puits et incubés une heure à température ambiante. Six lavages sont réalisés et 200µL de substrat TMB sont ajoutés dans chaque puits pendant 15 minutes à température ambiante. La réaction est stoppée par ajout de 50µL de solution neutralisante et les puits sont rapidement mélangés sur l'agitateur avant d'être insérés sur le lecteur de plaque iMark à 450nm. La C-peptidémie est exprimée en pmol/L.

### d) Dosage de la proinsuline

Le dosage de la proinsuline est un dosage complémentaire de celui du C-peptide ou de l'insuline. La proinsuline est dosée dans des échantillons plasmatiques par le kit Rat/Mouse Proinsulin ELISA (Merckodia) dont le principe repose exactement sur celui du peptide C. Les points de gamme sont reconstitués de la même manière, puis 50µL de la solution d'enzyme conjuguée sont ajoutés dans chaque puits et 25µL de plasma ou de point de gamme sont déposés en duplicate dans les puits correspondants. La plaque est incubée deux heures à température ambiante sur un agitateur de plaque Titramax 100. Les plaques sont ensuite lavées 6 fois comme décrit précédemment et 200µL de substrat TMB sont ajoutés dans chaque puits et incubé 30 minutes à température ambiante. La réaction est stoppée par ajout de 50µL de solution neutralisante et les puits sont rapidement mélangés sur l'agitateur avant d'être lus au lecteur iMark à 450nm. La proinsulinémie est exprimée en pmol/L.



#### e) Dosage des triglycérides

Les triglycérides sont des esters d'acide gras et de glycérol, présents dans le sang et que l'on retrouve dans le plasma. Leur quantité est anormalement augmentée au cours d'un diabète de type 2 et liée à l'hyperinsulinisme. Le dosage des triglycérides est réalisé à l'aide du kit Triglycerides Quantification Kit (BioVision Research Products, Mountain view, CA, USA) sur des échantillons plasmatiques dilués au 1/50<sup>ème</sup> dans le tampon triglycéride fourni dans le kit. Une gamme de concentration de triglycérides est directement réalisée dans une plaque 96 puits non stérile à l'aide d'une solution standard à 1mmol/L fournie, dans un volume final de 50µL. 50µL d'échantillons plasmatique dilué sont également déposés dans des puits correspondants. 1,5µL de lipase est ajoutée à chacun des puits et la plaque est incubée 20 minutes à température ambiante. Un mélange de réactif comprenant 46µL de tampon triglycéride, 2µL d'amorce triglycéride et 2µL d'un mélange enzymatique sont ajoutés par puits et incubés une heure à température ambiante, à l'abri de la lumière. L'absorbance est mesurée à 550nm sur le lecteur iMark. Après soustraction du zéro de la gamme à toutes les valeurs d'absorbance, la droite d'étalonnage est tracée. Les concentrations des échantillons sont déterminées en divisant les taux de triglycérides trouvés à partir de la droite par le volume d'échantillon initial avant dilution. Le taux de triglycérides sanguin est exprimé en mmol/L.

#### f) Etude de l'inflammation par la protéine C-réactive

La protéine C réactive ou CRP est une protéine synthétisée par le foie dans la phase aiguë de l'inflammation. C'est un marqueur précoce, sensible et spécifique de la réaction inflammatoire. Dans le plasma des rats de l'étude, la CRP est dosée par le kit ELISA Rat C-Reactive Protein de chez Millipore (Temecula, CA, USA). Les échantillons plasmatiques sont dilués au 1/4000<sup>ème</sup> dans du tampon de lavage et incubés à température ambiante pendant 30 minutes, comme les points de la droite d'étalonnage. Les puits sont lavés 5 fois et l'excès est éliminé. 100µL de solution conjuguée contenant le second anticorps couplé à la HRP, sont ajoutés pendant 30 minutes à température ambiante et les puits sont lavés 3 fois comme décrit précédemment. Le substrat (TMB) est ajouté pendant 10 minutes à température ambiante et la réaction est stoppée par ajout de 100µL de solution stop. L'absorbance est mesurée à 450nm sur le lecteur iMark et les concentrations plasmatiques en CRP des échantillons sont déterminées grâce à une droite d'étalonnage. La concentration en CRP plasmatique est exprimée en µg/mL.

### 4. Etude du stress oxydant

#### a) Dosage des lipides peroxydés par la méthode TBARS

Le malondialdéhyde (MDA) est un produit de peroxydation lipidique, mais il existe d'autres entités radicalaires, qui peuvent également se former au cours de la peroxydation lipidique. Ces

entités sont connues sous le nom de TBARS (Thio Barbituric Acid Reactive Substances). Cette mesure traduit une peroxydation lipidique globale. Le MDA est mesuré en utilisant la réaction de deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) avec une molécule de MDA, à 95° C en milieu acide pour former un adduit de couleur rose qui peut être mesuré par fluorimétrie ou spectrophotométrie. La quantité de lipides peroxydés d'un échantillon est déterminée à l'aide d'une courbe étalon de MDA (Sigma). Cette technique permet de mesurer la peroxydation lipidique de façon globale tandis que le kit utilisé *in vitro*, ne mesure que l'entité majoritaire, à savoir le MDA.

Cent µL de plasma ou de point de gamme de MDA sont déposés dans un microtube de 1,5mL et 200µL d'acide trichloroacétique (TCA, Fisher scientific, Allemagne) 10% sont ajoutés pour précipiter les protéines. Les tubes sont placés 15 minutes dans la glace, puis centrifugés à 2200g pendant 15 minutes à 4°C (Centrifugeuse Allegra™ 21R, Beckman, Fullerton, CA, USA). 200µL de surnageant sont transférés dans un microtube de 1,5mL et 200µL d'acide thiobarbiturique (TBA, Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Allemagne) à 0,67% sont ajoutés. Le tout est placé dans un bain à sec à 95°C pendant 1 heure. Puis 150µL de solution sont déposés en duplicate en plaque de 96 puits non stérile et l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre iMark à 550nm. La quantité de lipides peroxydés contenus dans l'échantillon est exprimée en µmol/L par mg de protéines présentes.

#### b) [Dosages des protéines carbonylées du plasma](#)

L'introduction de groupement carbonyles dans les protéines sont des modifications induites par le stress oxydant. Ces groupements carbonyles peuvent réagir avec le 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) et conduire à la dérivatisation de la protéine en 2,4-dinitrophénylhydrazone (DNP-hydrazone). Le kit ELISA de détection de protéines carbonylées OxiSelect™ (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA) permet la formation de protéines dérivatisées portant le DNP et l'analyse est réalisée selon la technique de l'ELISA.

Les échantillons plasmatiques, dilués à une concentration finale de 10µg/mL, ou les standards de BSA sont adsorbés (100µL) sur une plaque de 96 puits à 4°C pendant la nuit. L'expérimentation suit exactement le protocole qui est décrit dans le chapitre I.B.7 du « Matériels et Méthodes ». La lecture de l'absorbance s'effectue également à 450nm sur le lecteur iMark. La quantité de protéines carbonylées des échantillons est exprimée en nmol/mg de protéines totales.

### 5. [Congélation et inclusions des organes prélevés](#)

#### a) [Congélation à sec](#)

Les organes prélevés sont coupés en quatre morceaux, excepté les yeux, et les reins sont chacun coupés en deux. Deux morceaux de tissus et des sections de vaisseaux sont mis dans des

micro-tubes de 2mL et plongés directement dans de l'azote liquide (Linde, Velaine-en-Haye, France) et conservés à -80°C pour une congélation à sec. Le but de ces prélèvements est de constituer une tissuthèque afin de procéder à des analyses de façon ultérieure.

#### b) Congélation en OCT

Un morceau de chaque tissu restant ainsi que des sections de vaisseaux sont disposés dans des moules en plastique Histomold (Leica, Biosystems, Nussloch, Allemagne), recouverts d'une colle physiologique Tissue Tek OCT (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) et congelés avec de l'azote liquide, puis conservés à -80°C.

#### c) Inclusions d'organes en paraffine

Un morceau de chaque organe est directement imprégné dans une solution de paraformaldéhyde 4% (Sigma) pendant quatre heures. Ensuite, les organes sont lavés deux fois 10 minutes avec du PBS 1X pH 7,4 (Euromedex, Mundolsheim, France) afin d'éliminer l'excédent de PFA. La paraffine n'étant pas miscible au milieu aqueux, les organes sont ensuite déshydratés par des bains successifs et concentrés d'éthanol (Labonord). Ils sont trempés deux fois 10 minutes dans de l'éthanol 70%, puis trois fois 15 minutes dans de l'éthanol 95% et enfin deux fois 30 minutes dans de l'éthanol 100%. Un milieu intermédiaire est également requis car la paraffine n'est pas non plus miscible à l'éthanol. Pour cela, les organes sont plongés dans trois bains successifs de toluène (Labonord) pendant 15 minutes chacun. Ce solvant sert également d'éclaircissant de la pièce à inclure. Les organes sont ensuite immergés dans trois bains de 20 minutes de paraffine Q Path Paraffin Normal (Labonord) pré-fondue à 64°C dans une étuve (Memmert, Schwabach, Allemagne) puis déposés dans des moules à inclusions jetables Macrosette (Starlab, Bagneux, France) remplis de paraffine fondue. Une cassette d'inclusion Macro Star V (Labonord) est identifiée pour chaque organe issu de chaque animal, déposée sur le moule et recouverte de paraffine. Le tout est sorti de l'étuve et disposé à température ambiante pour refroidissement. Les pièces sont facilement démoulées après avoir passé quelques heures dans le réfrigérateur et conservées à température ambiante.

### 6. Etudes histologiques

#### a) Mise en évidence des plaques d'athérome dans l'aorte

L'aorte de chaque animal, conservée dans une solution de Krebs et débarrassée des tissus adipeux et conjonctifs, est disséquée en deux de la crosse aortique aux bifurcations iliaques et est fixée sur une matrice gélosée. Le tissu est ensuite déshydraté pendant 5 minutes par de l'éthanol 70%, puis une solution de Sudan IV à 0,9% (Sigma), dissoute dans 35% d'éthanol, 50% d'acétone (Labonord) et 15% d'eau distillée, est ajoutée, pendant 15 minutes sous agitation. L'aorte est

ensuite rincée par une solution d'éthanol à 80% et des photographies sont réalisées afin d'observer les plaques d'athérome.

#### b) Coupe au microtome et déparaffinage de lames

Avant la coupe des organes inclus en bloc de paraffine, ces derniers sont placés à -20°C pendant 10 à 15 minutes. Ils sont ensuite disposés sur un microtome Leica (Nusslach, Allemagne) et dégrossis en le coupant à une épaisseur de 10µm. Les coupes d'intérêt sont réalisées à une épaisseur de 4µm. Chaque coupe est délicatement déposée dans un bain-marie à environ 50°C et récupérée sur une lame porte-objet Superfrost (Menzel GmbH, Braunschweig, Allemagne). Chaque lame est disposée dans un porte-lame et celui-ci est placé à l'étuve (Memmert, Scwabach, Allemagne) à 60°C pendant une heure afin de faire fondre la paraffine. Le surplus de paraffine est enlevé en trempant le porte-lame dans 3 bains successifs de toluène pendant 5 minutes, 3 bains d'éthanol 100% pendant 2 minutes et un rinçage dans de l'eau du robinet. Les lames sont directement utilisées.

#### c) Coloration hématoxyline / éosine

La coloration par de l'hématoxyline / éosine est une technique qui permet d'apprécier l'état basal d'un tissu. Une fois que les lames du porte-lame sont déparaffinées, celui-ci est trempé dans un bain d'hématoxyline de Harris (Labonord) pendant 30 secondes. Les éléments basophiles des tissus vont alors prendre une coloration rouge-violette. Les lames sont rincées dans deux bacs d'eau du robinet successifs puis trempées et agitées 2 à 3 fois dans un bain contenant 1% d'acide chlorhydrique 32% (Riedel-de Haën, Sigma Chemie, Seelze, Allemagne) et 99% d'éthanol 96% (Labonord) qui va légèrement décolorer la préparation et donner une teinte orangée à la préparation. Les lames sont encore rincées avec de l'eau puis trempées dans une solution d'eau ammoniacale à 0,25% (Ammoniaque 20%, Fisher Scientific, Leicestershire, Royaume-Uni) jusqu'à obtention d'une couleur bleue (coloration violette des noyaux). Les lames sont rincées puis disposées dans un bain d'éosine filtrée contenant 3,125g d'éosine et 1,875g d'érythrosine (Réactif RAL, Martillac, France) pour un litre d'eau distillée, pendant 10 secondes pour colorer les éléments acidophiles du tissu. Après un rinçage, les lames sont trempées dans trois bains successifs d'éthanol 100% (décoloration) puis passées rapidement dans un bain de toluène. Les lames sont ensuite scellées avec une lamelle à l'aide d'une colle EUKITT® (Kindler GmbH, Fribourg, Allemagne) et conservées dans des boîtes à température ambiante jusqu'à analyse sous microscope.

- Mesure de la taille des îlots de Langerhans

Sur chaque coupe de pancréas colorée à la HE, une moyenne de dix champs optiques contenant un ou plusieurs îlots ont été photographiés au microscope AxioSkop 20 (Carl Zeiss,

Allemagne) à l'aide d'une caméra Nikon Digital Sight (Nikon, Tokyo, Japon). Sur ces champs, la surface des îlots est mesurée par le logiciel Nikon NIS Elements Br, version 3,00 SP7 (Nikon) et la grosseur des îlots est définie par les tailles suivantes :

- Une taille inférieure à  $10\,000\mu\text{m}^2$  correspond à un petit îlot,
- Une taille comprise entre  $10\,000$  et  $30\,000\mu\text{m}^2$  correspond à un îlot moyen,
- Et une taille supérieure à  $30\,000\mu\text{m}^2$  correspond à un gros îlot.
- 

- Méthode d'évaluation de la stéatose hépatique

Pour chaque coupe de foie, la stéatose est évaluée par un système de score pour les maladies du foie gras d'origine non alcoolique selon Kleiner *et al.* (2005) :

- score 0 pour une stéatose inférieure à 5%,
- score 1, si elle est comprise entre 5 et 33%,
- score 2, si elle est strictement comprise entre 33 et 66%,
- score 3, si elle est strictement supérieure à 66%.

d) Coloration au trichrome de Masson

Cette coloration permet de mettre en évidence la fibrose dans des tissus. Les lames d'intérêt sont disposées dans une boîte à coloration (type Hellendahl) contenant une solution de Bouin (Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Allemagne) et chauffées à  $56\text{ }^\circ\text{C}$  pendant 15 minutes dans une étuve (Memmert). La boîte à coloration est refroidie dans un bain d'eau du robinet, et les lames sont rincées à l'eau du robinet pour enlever la coloration jaune. Elles sont ensuite trempées dans l'hématoxyline de Weigert's (Sigma) pendant 5 minutes et rincées dans de l'eau du robinet pendant 5 minutes puis à l'eau distillée. Les lames sont ensuite disposées dans la fuchsine acide (Sigma) pendant 5 minutes, rincées à l'eau distillée et placées 5 minutes dans la solution d'acide phosphotungstique / phosphomolybdique (Sigma). Les lames sont ensuite trempées dans une solution de bleu d'aniline (Sigma) et rincées plusieurs fois à l'eau distillée. Enfin, les lames sont placées 2 minutes dans l'acide acétique 1% (Labonord), déshydratées dans l'éthanol 95% (Labonord) et nettoyées dans le toluène, collées avec une lamelle Menzel Gläser (Braunschweig, Allemagne).

e) Mise en évidence de ROS tissulaire

La présence d'espèces réactives de l'oxygène est notamment l'anion superoxyde  $\text{O}_2^-$  peut être mise en évidence par un marquage à la dihydroéthidine. Cette molécule a la propriété de s'oxyder en présence d'anions superoxydes pour devenir de l'éthidium, une molécule fluorescente qui s'intercale ensuite dans l'ADN. Le marquage est réalisé sur des coupes de foie et de pancréas réalisées au cryostat à  $10\mu\text{m}$  d'épaisseur. Les coupes sont laissées à température ambiante environ

15 minutes en chambre humide puis incubées en présence de 2,5 $\mu$ mol/L de DHE (Anaspec, Fremont, CA, USA) diluée dans du tampon PBS, en chambre humide et à 37°C pendant 30 min. Après un rinçage au PBS et séchage des lames, celles-ci sont observées au microscope à fluorescence AxioSkop 20 (Carl Zeiss, Allemagne) avec une source d'excitation à 488nm pour une émission à 585nm. Des photographies sont réalisées à l'aide d'un logiciel d'acquisition d'images Nikon NIS Elements Br (Nikon) et la fluorescence de chaque champ d'observation est quantifiée à l'aide du même logiciel et est exprimée en pourcentage de fluorescence par rapport au témoin (rats ND recevant l'eau ou le solvant).

## 7. Etude immuno-histologique : immuno-marquage insuline

Une fois les lames déparaffinées, les sites antigéniques sont démasqués en incubant pendant 20 minutes à 37°C, les lames dans une solution de PBS 0,1% trypsine (Sigma) pré-chauffée 30 minutes à 37°C. Les peroxydases endogènes sont ensuite éliminées en trempant les lames dans une solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % à 4°C pendant 10 minutes. Les lames sont ensuite rincées dans du PBS pendant 2 minutes et égouttées à l'aide de papier absorbant. Elles sont disposées dans une chambre humide et 300 $\mu$ L d'anticorps primaire anti-insuline produit chez la souris (Sigma) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans du PBS 1% BSA (Sigma) sont déposés sur chaque lame et celles-ci sont incubées une heure à température ambiante (ou la nuit à 4°C). Les lames sont rincées 5 minutes dans du PBS et replacées dans la chambre humide après avoir été égouttées. L'anticorps secondaire anti-souris biotinylé (Sigma), produit chez la chèvre et dilué au 1/200<sup>ème</sup> est ajouté (300 $\mu$ L par lame) pendant 30 minutes. Les lames sont ensuite rincées 5 minutes dans du PBS et replacées comme précédemment décrit. Elles sont ensuite incubées 30 minutes avec une solution d'extravidine-peroxydase (Sigma) diluée au 1/20<sup>ème</sup> dans du PBS 1% BSA à raison de 300 $\mu$ L par lame, puis rincées dans du PBS pendant 5 minutes.

La révélation du couplage anticorps secondaire/peroxydase est réalisée en plaçant les lames à plat dans la chambre humide et en les incubant 5 minutes avec 300 $\mu$ L de solution de révélation contenant : 200 $\mu$ L de solution AEC stock (une pastille AEC dans 2,5mL de DMF) dans 3,8mL de tampon acétate 0,05mol/L, avec 20 $\mu$ L d'eau oxygénée à 3% (Riedel-de Haën, Sigma Chemie, Seelze, Allemagne) ajoutés extemporanément. La réaction est stoppée en plongeant les lames remises sur le porte-lame dans un bain d'eau distillée. Une contre-coloration dans un bain d'hématoxyline de Harris de 15 secondes est réalisée pour colorer les noyaux. Un rinçage rapide dans l'eau du robinet est effectué et les lames sont montés sous lamelles en milieu aqueux pour microscopie Aquatex® (Merck, Darmstadt, Allemagne) et sont conservées à température ambiante jusqu'à observation sous microscope AxioSkop 20.

## 8. Analyses statistiques

La significativité des tests statistiques est donnée par les tests One Way Anova avec une comparaison de Student Newman-Keuls post hoc pour des groupes d'échantillons indépendants (plusieurs variables) ou par un T-test pour deux groupes d'échantillons (une seule variable). Des valeurs de  $p < 0,05$  sont considérées comme statistiquement significatives.

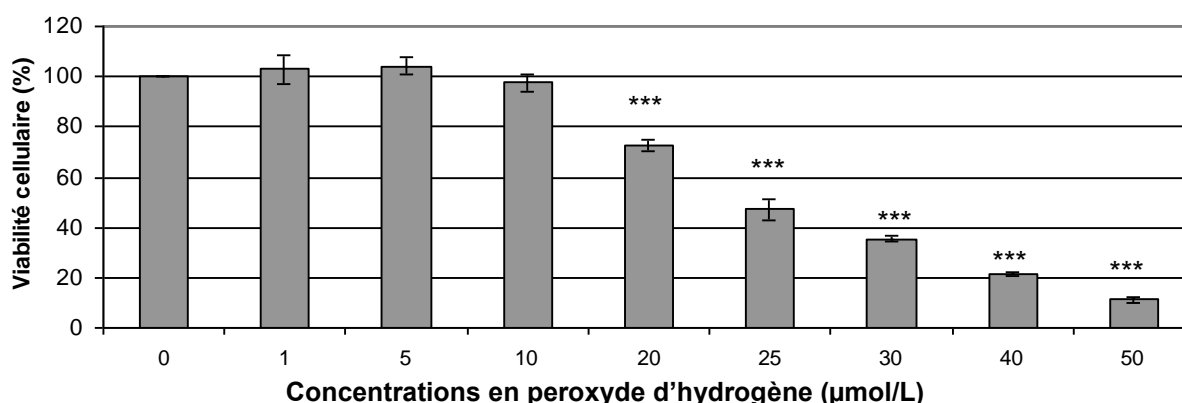
## RÉSULTATS

### I. Étude *in vitro* du stress oxydant et prévention par des antioxydants

#### A. Mise au point du modèle de stress oxydant

L'induction du stress oxydant sur un modèle de cellules RINm5F a été réalisée par trois traitements chimiques différents, sources d'espèces réactives de l'oxygène : le peroxyde d'hydrogène, la streptozotocine et un mélange hypoxanthine / xanthine oxydase. Les doses choisies pour la poursuite de l'étude sont celles pour lesquelles la viabilité cellulaire est comprise entre 20 et 50%.

Ainsi, une incubation de cellules RINm5F en présence de peroxyde d'hydrogène pendant 30 minutes à des doses croissantes induit une perte significative de viabilité à partir de 20 $\mu$ mol/L (72,6  $\pm$  2,2% ;  $p < 0,001$ ) qui est maintenue jusqu'à 50 $\mu$ mol/L. La dose choisie pour la suite de l'étude est celle de 40 $\mu$ mol/L où la viabilité cellulaire n'est plus que de 21,5  $\pm$  0,9% ( $p < 0,001$ ) ; (cf. figure 60).

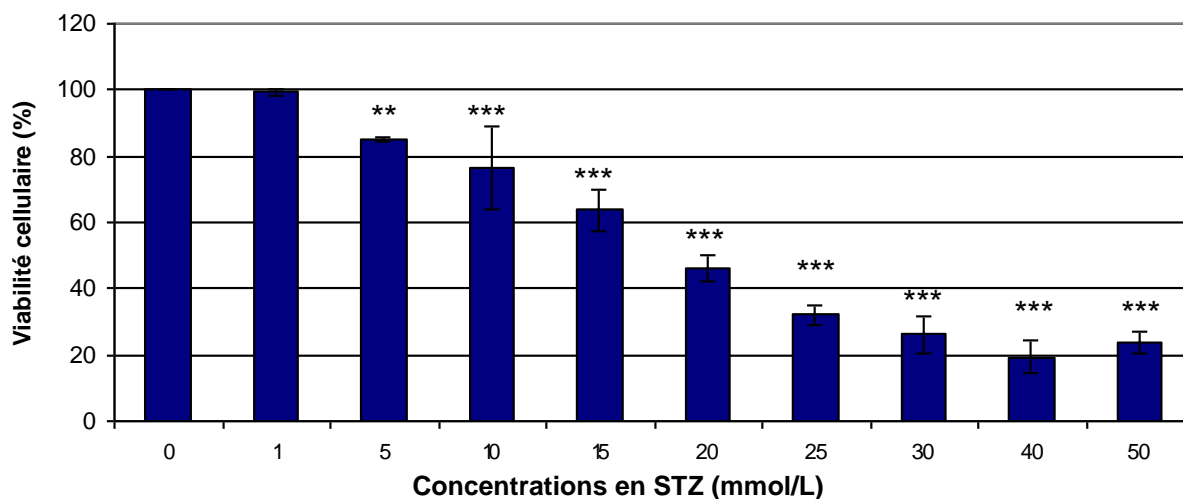


**Figure 60 :** Viabilité en % des cellules RINm5F en présence de quantités croissantes de peroxyde d'hydrogène pendant 30 minutes.

\*\*\* :  $p < 0,001$  ; peroxyde d'hydrogène versus témoin sans traitement, One Way ANOVA, Student-Newman-Keuls Method post test ( $n=3$ ).

Une incubation de 2 heures des cellules RINm5F en présence de streptozotocine permet d'induire une perte de viabilité dose dépendante. Cette perte de viabilité devient significative à partir de 5mmol/L (84,8  $\pm$  0,7% ;  $p < 0,01$ ) et reste significative jusqu'à 50mmol/L. La dose retenue pour le reste de l'étude est celle de 25mmol/L qui induit une perte de viabilité de 32,0  $\pm$  2,8% ( $p < 0,001$ ) ; (cf. figure 61).

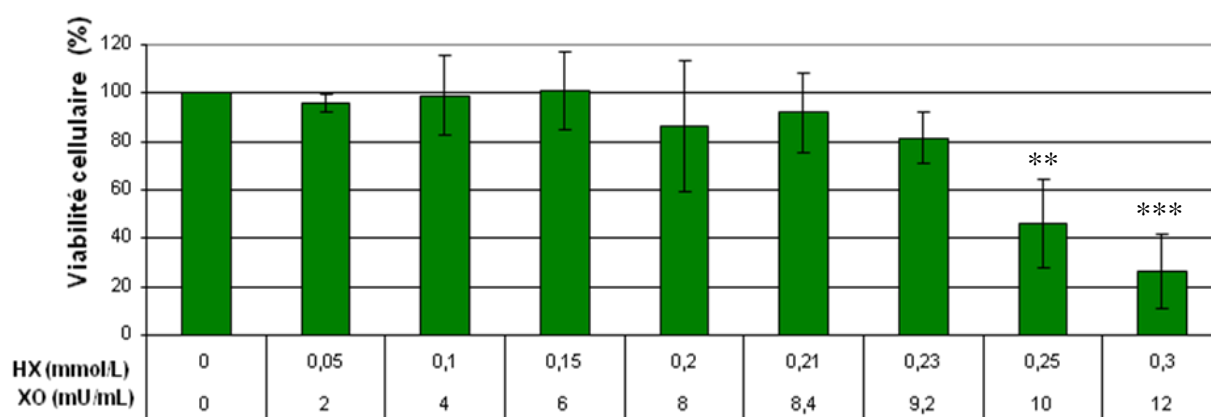




**Figure 61** Viabilité en % des cellules RINm5F en présence de quantités croissantes de streptozotocine (STZ) pendant deux heures.

\*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; STZ versus témoin sans traitement, One Way ANOVA, Student-Newman-Keuls Method post test (n=3).

Un stress oxydant induit par un mélange hypoxanthine / xanthine oxydase, avec un ratio conservé de 1 pour 40, permet de diminuer la viabilité cellulaire de façon croissante. Ainsi, la perte de viabilité devient statistiquement significative à partir d'un mélange de 0,25mmol/L d'hypoxanthine associé à 10mU/mL de xanthine oxydase (cf. figure 62). Cette dose sera conservée pour la suite de l'étude : elle correspond à une viabilité cellulaire de  $45,9 \pm 18,5\%$  ( $p < 0,001$ ).

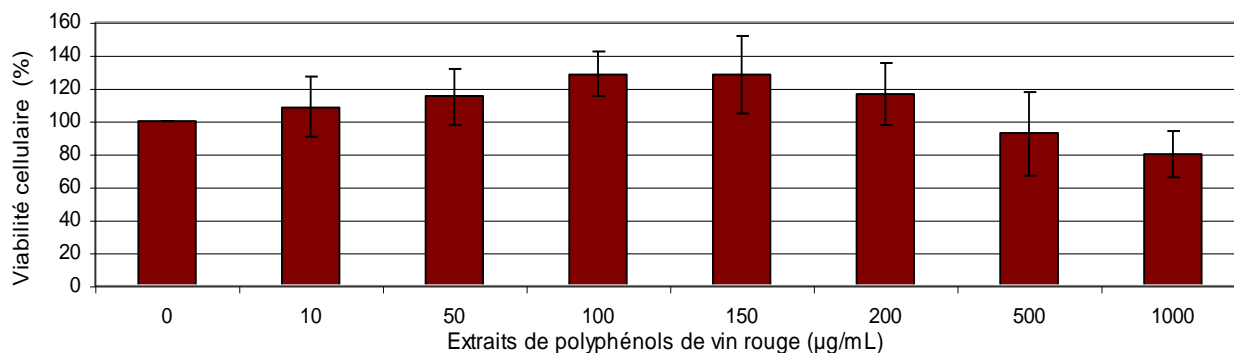


**Figure 62 :** Viabilité en % des cellules RINm5F en présence de quantités croissantes d'un mélange d'hypoxanthine (HX) et de xanthine oxydase (XO) pendant une heure.

\*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; HX/XO versus témoin sans traitement, One Way ANOVA, Student-Newman-Keuls Method post test (n=4).

## B. Étude des effets des antioxydants sur la viabilité des cellules

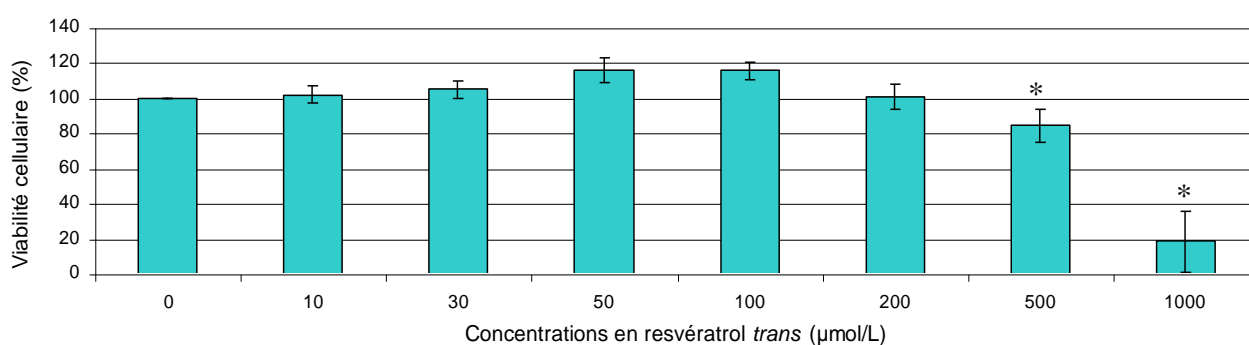
L'effet des antioxydants a été testé sur la viabilité des cellules RINm5F à des doses croissantes pendant une heure. Ainsi, sur ces cellules, l'addition d'extrait de polyphénols de vin rouge n'induit pas de perte significative de la viabilité cellulaire (cf. figure 63).



**Figure 63 : Viabilité des cellules RINm5F en % après une incubation d'une heure en présence d'extrait de polyphénols de vin rouge.**

NS ; Extrait de polyphénols versus témoin sans traitement, One Way ANOVA, Student-Newman-Keuls Method post test (n=3).

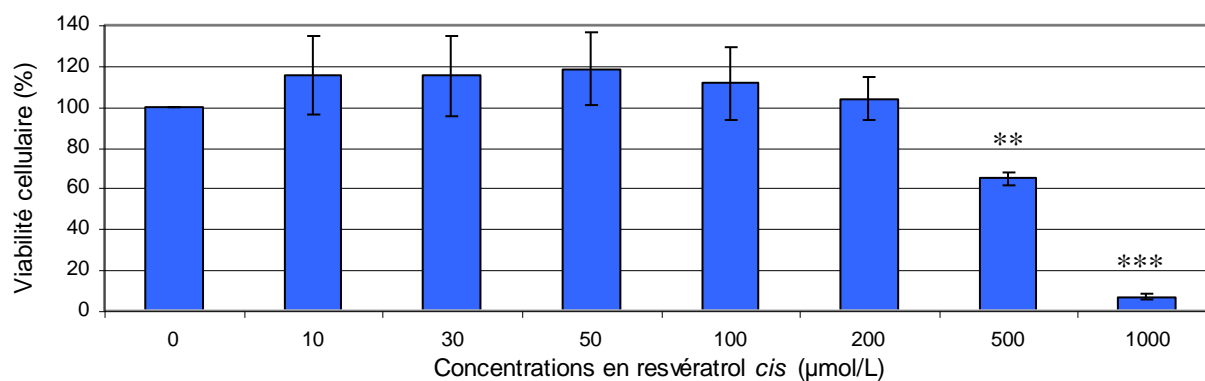
Le resvératrol *trans* induit, quand à lui, une perte de viabilité significative au-delà de 500µg/mL ( $84,4 \pm 9,1\%$  ;  $p < 0,05$ ) ; (cf. figure 64). Cette perte de viabilité est également dose dépendante car à 1000µg/mL de resvératrol *trans*, la viabilité cellulaire n'est plus que de  $18,4 \pm 17,2\%$  ( $p < 0,05$ ).



**Figure 64 : Viabilité des cellules RINm5F en % après une incubation d'une heure en présence de resvératrol *trans*.**

\* :  $p < 0,05$  ; Resvératrol *trans* versus témoin sans traitement, One Way ANOVA, Student-Newman-Keuls Method post test (n=3)

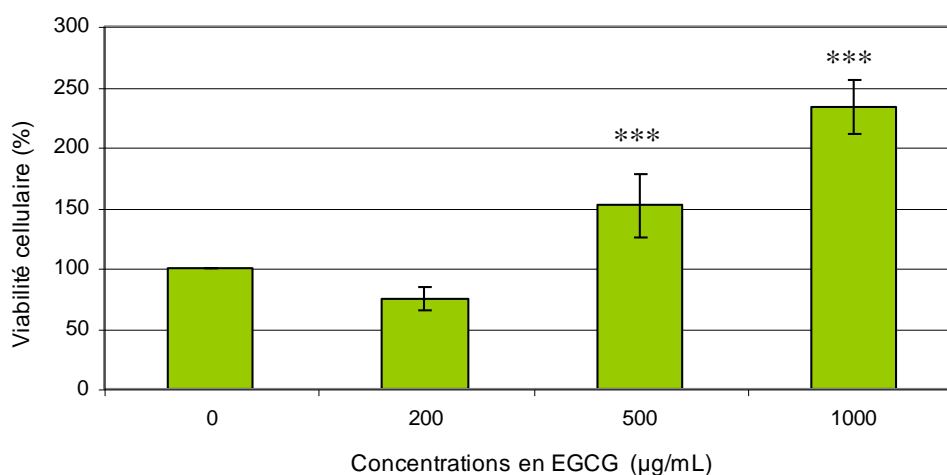
Le resvératrol *cis* présente une perte de viabilité similaire à son stéréoisomère. En effet, à faibles concentrations, il n'induit pas de perte de viabilité des cellules. En revanche à 500 et 1000µg/mL, la perte de viabilité est significative (cf. figure 65). En effet, la viabilité cellulaire est de  $64,9 \pm 3,2\%$  ( $p < 0,01$ ) et à  $6,7 \pm 1,1\%$  ( $p < 0,001$ ), respectivement pour les doses de 500 et 1000µg/mL.



**Figure 65 : Viabilité des cellules RINm5F en % après une incubation d'une heure en présence de resvératrol *cis*.**

\*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; Resvératrol *cis* versus témoin sans traitement, One Way ANOVA, Student-Newman-Keuls Method post test (n=3).

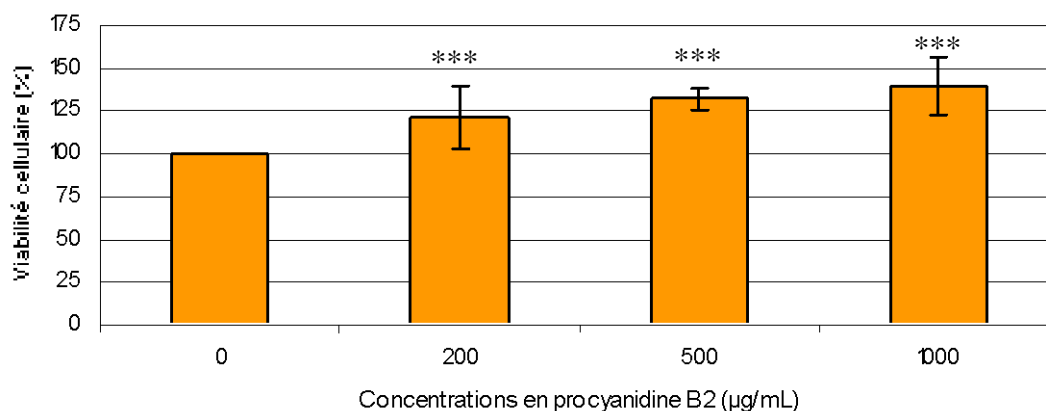
Les résultats obtenus avec l'EGCG du thé vert ne montrent pas de perte de viabilité des cellules RINm5F avec la molécule quelles que soient les concentrations testées (cf. figure 66). Au contraire, à 500 et 1000µg/mL, la viabilité cellulaire est significativement augmentée à  $151,8 \pm 26,0\%$  et  $233,5 \pm 22,6\%$  respectivement ( $p < 0,001$ ).



**Figure 66 : Viabilité des cellules RINm5F en % après une incubation d'une heure en présence de l'EGCG.**

\*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; EGCG versus témoin sans traitement, One Way ANOVA, Student-Newman-Keuls Method post test (n=3).

Des résultats similaires sont obtenus avec la procyanidine B2. En effet, aucune perte de viabilité n'est observée. La PB2 induit même une augmentation significative de la viabilité des cellules à 200, 500 et 1000 µg/mL avec des viabilités respectives de  $122,0 \pm 18,3\%$  ;  $133,5 \pm 6,3\%$  et  $139,9 \pm 17,0\%$  (cf. figure 67).



**Figure 67** : Viabilité des cellules RINm5F en % après une incubation d'une heure en présence de procyanidine B2.

\*\*\* :  $p < 0,001$  ; Procyanidine B2 versus témoin sans traitement, One Way ANOVA, Student-Newman-Keuls Method post test ( $n=3$ ).

### C. Effet préventif des antioxydants

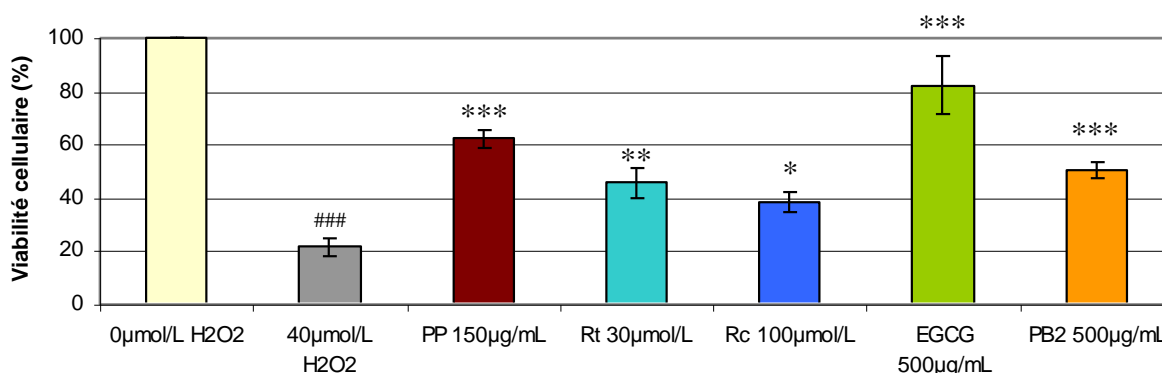
L'effet des antioxydants a ensuite été étudié sur les trois conditions de stress par l'étude de la viabilité des cellules RINm5F. Les résultats obtenus sont présentés figures 68 à 70.

Sur un stress oxydant induit par  $40 \mu\text{mol/L}$  de peroxyde d'hydrogène pendant 30 minutes, les cinq antioxydants testés permettent de limiter la perte de viabilité cellulaire induit par le stress (cf. figure 68). Ainsi, en présence de  $40 \mu\text{g/mol}$  de peroxyde d'hydrogène, la viabilité cellulaire diminue significativement à  $21,5 \pm 3,3\%$  par rapport au témoin sans traitement (100%) ; ( $p < 0,001$ ). En pré-incubant les cinq antioxydants séparément, la viabilité des RINm5F augmente de façon significative :

- Les polyphénols (PP), à une concentration de  $150 \mu\text{g/mL}$ , permettent d'augmenter la viabilité des cellules à  $62,2 \pm 3,2\%$  ( $p < 0,001$ ) en présence de peroxyde d'hydrogène par rapport au témoin  $\text{H}_2\text{O}_2$  seul ( $21,5 \pm 3,3\%$ ),
- Le resvératrol *trans* (Rt), augmente la viabilité à  $45,3 \pm 5,6\%$  de façon significative ( $p < 0,01$ ) par rapport au témoin  $\text{H}_2\text{O}_2$  seul, pour une concentration de  $30 \mu\text{mol/L}$ ,
- Son stéréoisomère, le resvératrol *cis* (Rc), à  $100 \mu\text{mol/L}$ , permet d'obtenir une viabilité de  $38,4 \pm 3,5\%$ , significativement supérieure ( $p < 0,05$ ) au témoin  $\text{H}_2\text{O}_2$  seul,
- Pour  $500 \mu\text{g/mL}$  d'EGCG, la viabilité cellulaire est significativement augmentée ( $p < 0,001$ ) à  $82,3 \pm 10,8\%$  après un stress induit par  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,

- En présence de 500µg/mL de procyanidine B2 (PB2), la viabilité des RINm5F est également augmentée de façon significative ( $p < 0,001$ ) à  $50,5 \pm 3,2\%$ .

Parmi ces cinq antioxydants testés, les PP et l'EGCG sont ceux qui présentent la plus forte préservation de la viabilité cellulaire après l'induction d'un stress par le peroxyde d'hydrogène.

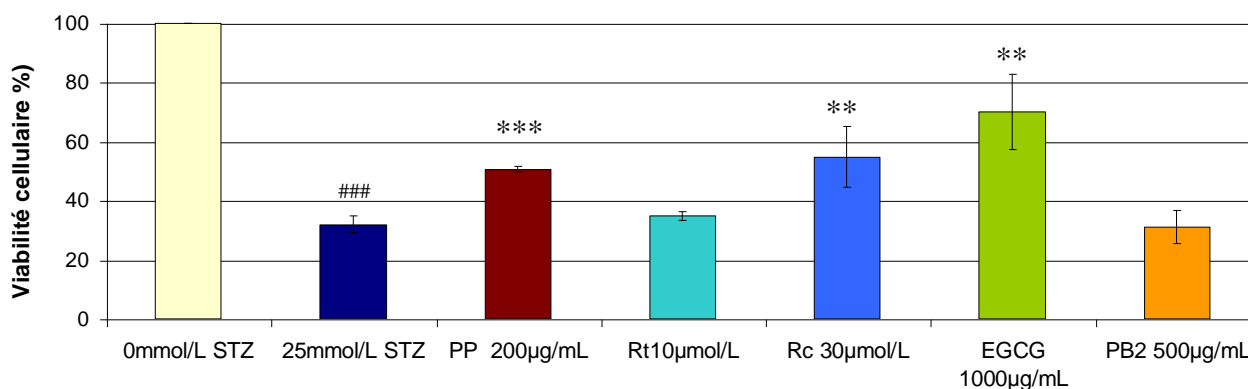


**Figure 68** : Viabilité des RINm5F en % en présence des molécules antioxydantes pré-incubées une heure avant l'induction d'un stress oxydant par 40µmol/L de peroxyde d'hydrogène.

### :  $p < 0,001$  ; Peroxyde d'hydrogène versus témoins sans traitement (0µmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),

\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; Antioxydants versus peroxyde d'hydrogène, t-test (n=3).

Des résultats similaires sont obtenus pour un stress oxydant induit par la STZ pendant 2 heures. Comme démontré précédemment, en présence de STZ à 25mmol/L, la viabilité des RINm5F est significativement diminuée à  $32,0 \pm 2,8\%$  ( $p < 0,001$ ) par rapport au témoin sans traitement (100%) ; (cf. figure 69).



**Figure 69** : Viabilité des RINm5F en % en présence des molécules antioxydantes pré-incubées une heure avant l'induction d'un stress oxydant par 25mmol/L de STZ, pendant 2 heures.

### :  $p < 0,001$  ; Streptozotocine versus témoin sans traitement,

\*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; Antioxydants versus streptozotocine, t-test (n=3).

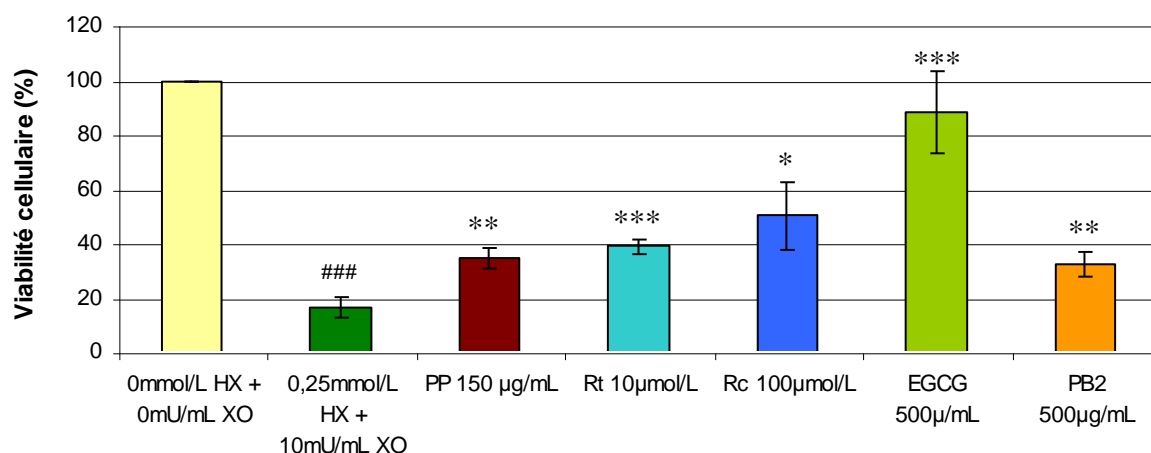
Les résultats montrent que :

- Les PP à 200µg/mL permettent de limiter la perte de viabilité cellulaire induite par la STZ. La viabilité obtenue est augmentée significativement à  $50,6 \pm 0,9\%$  ( $p < 0,001$ ) par rapport au témoin STZ seul ( $32,0 \pm 2,8\%$ ),

- Le Rt, quand à lui, ne permet pas de limiter la perte de viabilité des cellules, la viabilité étant de  $34,8 \pm 1,6\%$ ,
- En revanche son stéréoisomère, le Rc à  $30\mu\text{mol/L}$ , limite de façon significative la perte de viabilité induite par la STZ, la viabilité obtenue étant de  $54,7 \pm 10,3\%$  ( $p < 0,01$ ),
- L'EGCG à  $1000\mu\text{g/mL}$  augmente significativement la viabilité cellulaire à  $70,0 \pm 12,6\%$  ( $p < 0,01$ ),
- Enfin, la PB2 à une concentration de  $500\mu\text{g/mL}$  n'empêche pas la perte de viabilité cellulaire induite par la STZ. La viabilité des RINm5F obtenue est de  $31,0 \pm 5,7\%$ .

D'après ces résultats, l'EGCG à  $1000\mu\text{g/mL}$ , le resvératrol *cis* à  $30\mu\text{mol/L}$  et les polyphénols de vin rouge à  $200\mu\text{g/mL}$  sont les molécules qui permettent de limiter la perte de viabilité induite par la STZ.

Dans le cas d'un stress oxydant induit par un mélange de  $0,25\text{mmol/L}$  HX et  $10\text{mU/mL}$  de XO pendant une heure, la viabilité cellulaire est diminuée à  $16,5 \pm 3,7\%$  ( $p < 0,001$ ) ; (cf. figure 70).



**Figure 70** : Viabilité des RINm5F en % en présence des molécules antioxydantes pré-incubées une heure avant l'induction d'un stress oxydant par  $0,25\text{mmol/L}$  d'HX et  $10\text{mU/mL}$  de XO, pendant une heure.

### :  $p < 0,001$  ; Mélange HX/XO versus témoin sans traitement,

\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; Antioxydants versus HX/XO, t-test ( $n=3$ ).

La viabilité des RINm5F est significativement augmentée en présence des cinq antioxydants :

- Les PP, à  $150\mu\text{g/mL}$ , permettent de limiter la perte de viabilité cellulaire. La viabilité est significativement augmentée à  $34,5 \pm 3,9\%$  ( $p < 0,01$ ) par rapport au témoin HX/XO seul.
- Le Rt à  $10\mu\text{mol/L}$ , limite également la perte de viabilité des RINm5F, car la viabilité obtenue est de  $39,0 \pm 2,9\%$  ( $p < 0,001$ ),
- Une pré-incubation par  $100\mu\text{mol/L}$  de Rc permet d'augmenter la viabilité cellulaire à  $50,2 \pm 12,5\%$  ( $p < 0,05$ ),

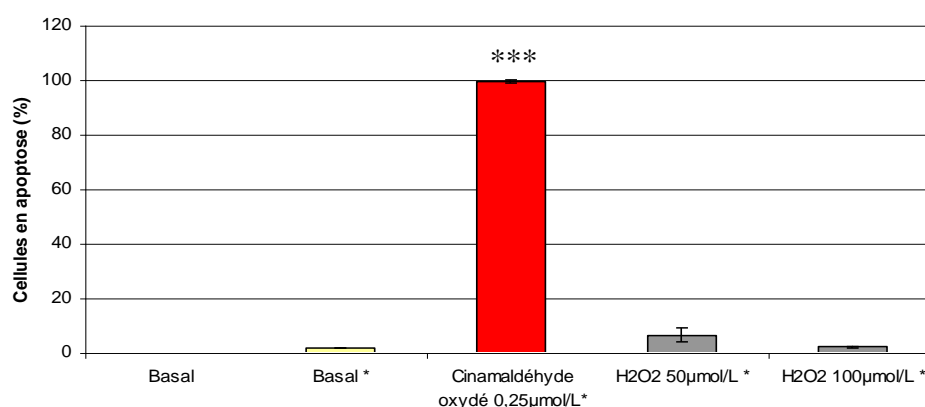
- L'EGCG à 500µg/mL permet d'obtenir une viabilité cellulaire de  $88,5 \pm 15,0\%$  ( $p < 0,001$ ) après induction du stress,
- La PB2 à 500µg/L quand à elle, augmente significativement la viabilité des cellules RINm5F à  $32,4 \pm 4,8\%$  ( $p < 0,01$ ) après l'induction du stress.

D'après les résultats obtenus, les cinq antioxydants permettent de limiter la perte de viabilité des cellules RINm5F due à un stress induit par 0,25mmol/L d'HX et 10mU/mL de XO. Celui qui a la plus grande efficacité sur ce stress est l'EGCG à 500µg/mL, suivi du Rc à 100µmol/L, de son stéréoisomère à 10µmol/L, des PP à 150µg/mL et enfin de la procyanidine B2 à 500µg/mL.

Dans les trois modèles de stress oxydant mis en place, les deux antioxydants qui permettent de limiter la perte de viabilité due à ces stress sont les polyphénols de vin rouge et l'épigallocatechine gallate. Ces deux molécules sont donc choisies pour la suite de l'étude.

#### D. Etude de l'apoptose par l'annexine-V

Les résultats obtenus par la mesure de viabilité, ont été approfondis par mesure de l'apoptose *via* l'annexineV-PE. Les résultats obtenus montrent que le témoin positif d'apoptose, le cinnamaldéhyde oxydé, induit une augmentation significative de l'apoptose ( $99,5 \pm 0,7\%$  ;  $p < 0,001$ ) par rapport aux cellules non traitées ( $1,5 \pm 0,0\%$ ) ; (cf. figure 71).



**Figure 71 : Quantification de l'apoptose des cellules RINm5F en % en présence de peroxyde d'hydrogène pendant une heure et de cinnamaldéhyde oxydé pendant 24 heures.**

Les étoiles représentent les cellules ayant reçu les fluorophores.

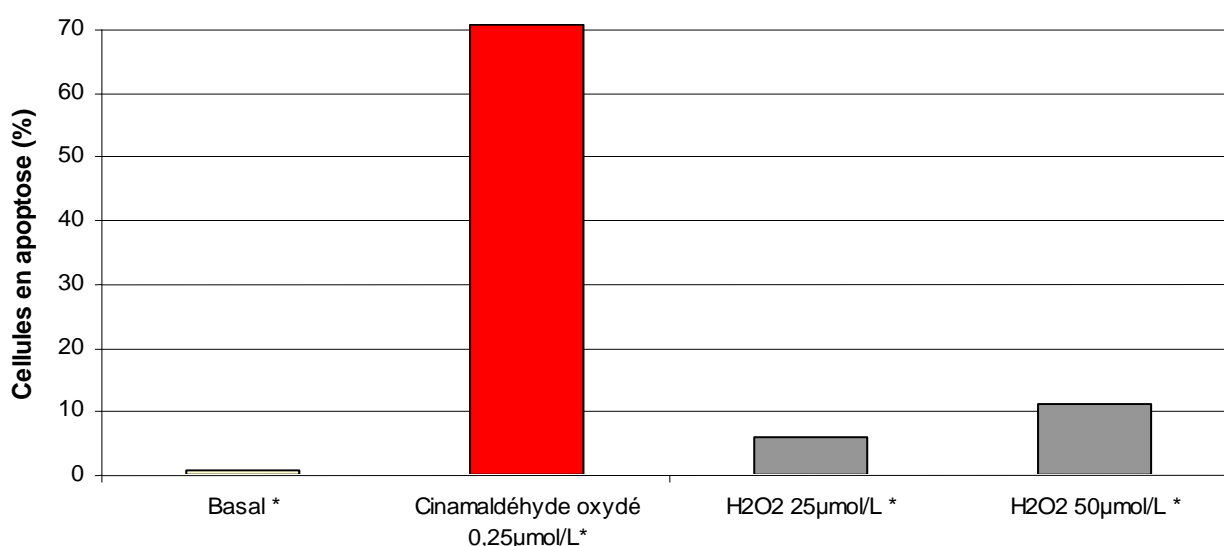
\*\*\* :  $p < 0,001$  ; basal versus cinnamaldéhyde, t-test ( $n=3$ ).

En revanche, lorsque les cellules sont traitées par du peroxyde d'hydrogène à 50 ou 100µmol/L pendant 30 minutes, on n'obtient pas de variation significative du pourcentage de cellules en apoptose. En effet, à 50µmol/L, le nombre de cellules apoptotiques n'est que de  $6,5 \pm 2,8\%$ , et à 100µmol/L, il n'est que de  $2,2 \pm 0,3\%$ .

## E. Etude de l'apoptose par les caspases 8 et 9

Compte tenu des résultats obtenus sur la mesure de l'apoptose induite par le peroxyde d'hydrogène, et à la vue du temps d'incubation (30 minutes), une autre technique de cytométrie a été utilisée. En effet, pour mesurer plus précocement l'apoptose, une détection de l'activation des caspases 8 et 9 a été réalisée.

Les résultats montrent que le cinnamaldéhyde oxydé (témoin positif d'apoptose), induit l'activation des deux caspases à hauteur de 70,5% comparé aux cellules sans traitement où seul 0,5% des cellules ont activé les deux caspases (cf. figure 72). Lorsque que les RINm5F sont traitées pendant 30 minutes avec du peroxyde d'hydrogène à 25 et 50 $\mu\text{mol/L}$ , le nombre de cellules apoptotiques ayant activé les caspases 8 et 9, sont respectivement de 6 et 10,9%.

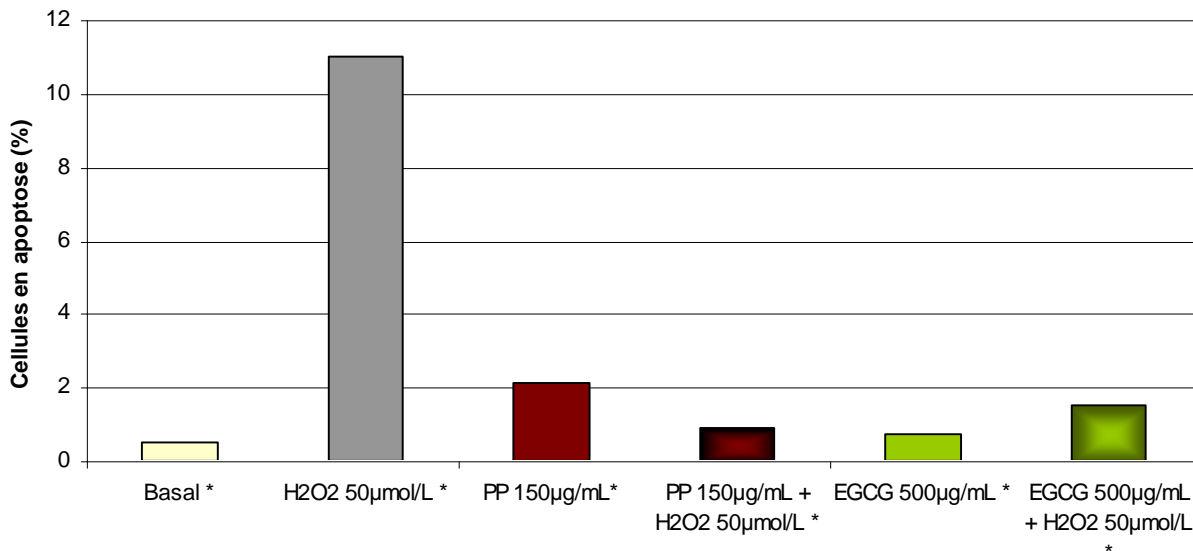


**Figure 72 :** Quantification de l'apoptose en % par l'activation des caspase 8 et 9 de cellules RINm5F soumises à des concentrations de peroxyde d'hydrogène pendant 30 minutes.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules apoptotiques ayant activé les caspases 8 et 9, par rapport au nombre total de cellules détectées (n=2).

Le peroxyde d'hydrogène activant les caspases 8 et 9, les antioxydants PP et EGCG ont été testés sur les cellules RINm5F (cf. figure 73). Les résultats obtenus montrent que les PP seuls et l'EGCG activent de façon très limitée les caspases 8 et 9 (2,11 et 0,72%) par rapport aux cellules n'ayant pas subies de traitement (0,5%). Lorsque les PP et l'EGCG sont pré-incubées pendant une heure avant l'induction du stress, ils permettent de diminuer le nombre de cellules ayant activé les caspases 8 et 9 (0,9 et 1,5%) par rapport aux cellules soumises au peroxyde d'hydrogène (10,9%).





**Figure 73 : Quantification de l'apoptose en % par l'activation des caspase 8 et 9 de cellules RINm5F soumises à un stress par le peroxyde d'hydrogène, en présence ou non d'antioxydants pré-incubés pendant une heure.**

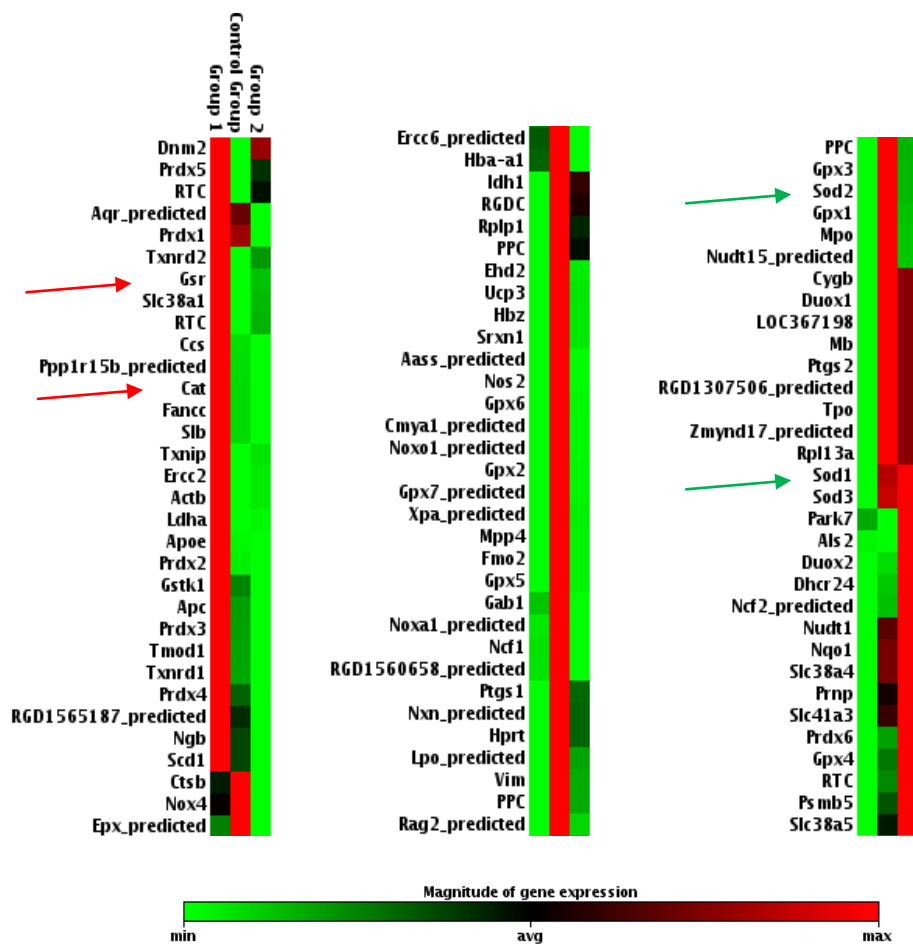
Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules apoptotiques ayant activé les caspases 8 et 9, par rapport au nombre total de cellules détectées (n=1).

Ces résultats, bien que préliminaires, semblent confirmer que l'apoptose joue un rôle primordial dans la perte de viabilité des cellules suite à un stress oxydant et l'effet préventif des antioxydants. Cependant, compte tenu du nombre d'expériences, ils doivent être confirmés.

#### F. Étude de l'expression des gènes du stress oxydant

L'étude de l'expression des gènes du stress oxydant et des défenses antioxydantes est présentée figure 74. Pour cette étude, trois conditions expérimentales ont été testées afin de cibler spécifiquement des gènes d'intérêt dont l'expression protéique sera étudiée dans une partie ultérieure.

Les trois conditions testées sont : un groupe témoin de cellules RINm5F sans traitement, un groupe de cellules soumises à un stress induit par un mélange de 0,25mmol/L d'HX avec 10mU/mL de XO et un dernier groupe constitué de cellules pré-incubées avec 150µg/mL de PP et ayant subi un stress par l'HX/XO. Les résultats de la figure 74 montrent que la catalase (Cat) et la glutathion réductase (Gsr) sont surexprimées dans le groupe 1 (0,25mmol/L d'HX avec 10mU/mL de XO pendant 1 heure) par rapport au groupe témoin (groupe sans traitement), tandis que les enzymes superoxydes dismutase Sod1 et Sod2 sont sous-exprimées dans ce même groupe par rapport au groupe témoin.



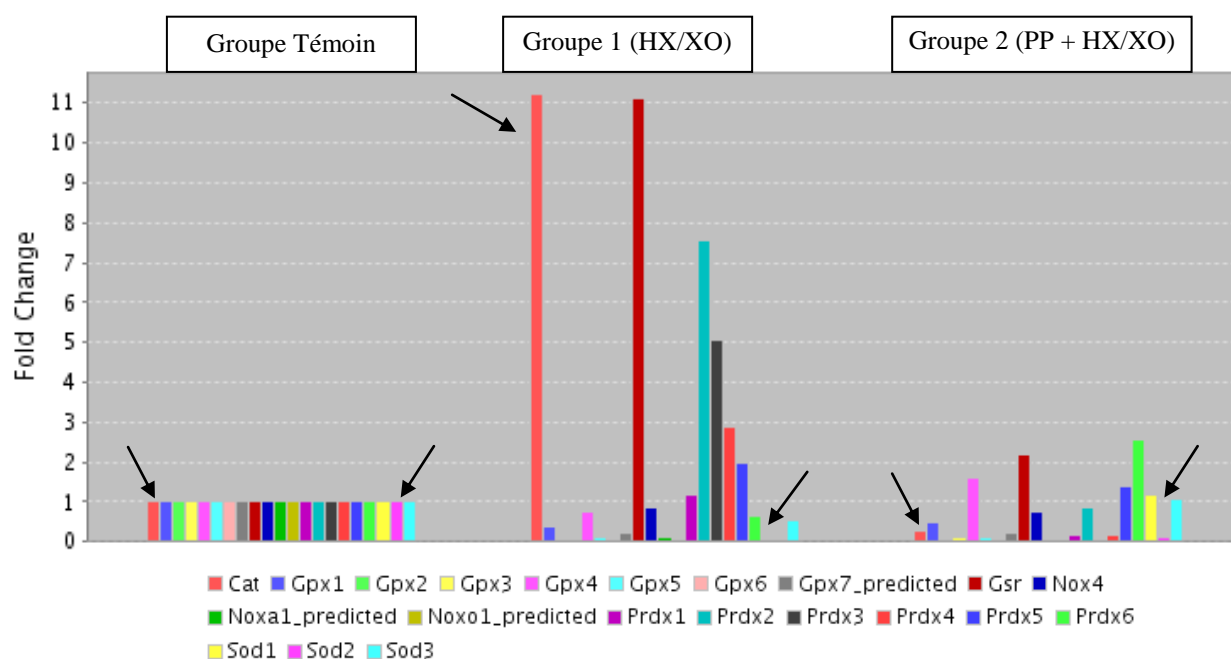
**Figure 74 :** Clustergramme de l'expression des gènes du stress oxydant.

Le groupe témoin (Control group) correspond aux cellules sans traitement, le groupe 1 (group 1) aux cellules traitées par 0,25mmol/L d’HX avec 10mU/mL de XO pendant 1 heure, et le groupe 2 (group 2) correspond aux cellules pré-incubées avec 150µg/mL de PP suivis d’un stress induit par l’HX/XO. En se référant au groupe témoin, les gènes apparaissant en rouge sont surexprimés au contraire de ceux qui apparaissent en vert, qui eux sont sous-exprimés.

Le détail des gènes d’intérêt est présenté sur la figure 75. Pour chaque gène, un Ct (« Cycle Threshold » ou cycle seuil) est défini et permet de quantifier l’ADN. Ainsi, en comparant les Ct d’un même gène dans des conditions expérimentales différentes, un gène pourra être sur- ou sous-exprimé. En prenant comme référence le groupe témoin (sans traitement) et en considérant l’expression des gènes de ce groupe comme référents, l’expression des gènes est représentée en nombre de fois augmentée ou diminuée dans le groupe 1 ou 2 :

- L’expression de la catalase Cat est augmentée de près de 11,22 fois en condition de stress induit par HX/XO, alors qu’elle est diminuée à 0,26 fois en présence de PP, par rapport au niveau témoin. Lorsque les PP sont pré-incubés une heure avant l’induction du stress, l’expression de cette enzyme est diminuée de 43 fois par rapport à la condition de stress induit par HX-XO.

- Celle de la glutathion réductase Gsr, est augmentée de 11,14 fois et lorsque les cellules sont pré-incubées avec des PP, l'expression de ce gène est diminuée à 2,19 fois. Une diminution de 5 fois de l'expression de la Gsr est donc observée par rapport à la condition de stress induit par l'HX-XO.
- En revanche, l'expression de l'enzyme Sod1 (superoxyde dismutase soluble) est quasiment nulle (0,0007) en condition de stress tandis qu'avec une pré-incubation des PP suivie du stress, elle est augmentée pour atteindre le niveau témoin (1,16 fois). Entre ces deux groupes, l'expression de Sod1 est augmentée de 1657 fois.
- Dans le cas de Sod2 (superoxyde dismutase à Mn mitochondriale), en condition de stress, son expression est fortement diminuée (0,0049), voire quasiment nulle alors qu'en présence de PP, son expression est légèrement augmentée (0,14 fois). L'augmentation entre ces deux groupes est de 28 fois environ.
- Enfin, pour la superoxyde dismutase Sod3 (enzyme extracellulaire), en présence d'HX/XO, son expression est diminuée de 0,53 fois tandis qu'en pré-incubant les cellules avec des PP, son expression passe à 1,06 fois. L'expression de cette enzyme est donc augmentée de 2 fois environ.



**Figure 75 :** Expression différentielle des gènes entre les groupes témoin et soumis à un stress oxydant par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

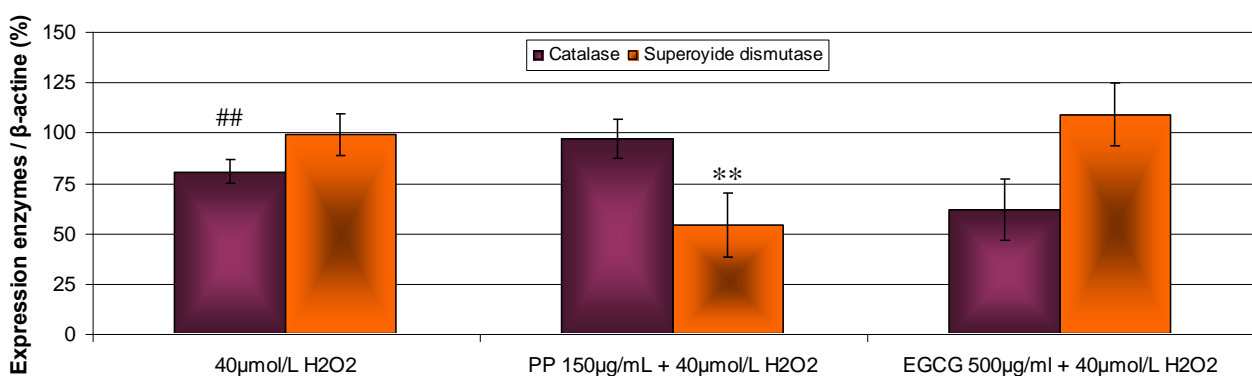
Le groupe témoin (Control group) correspond aux cellules sans traitement, le groupe 1 (group 1) aux cellules traitées par 0,25mmol/L d'HX avec 10mU/mL de XO pendant 1 heure, et le groupe 2 (group 2) correspond aux cellules pré-incubées avec 150µg/mL de PP suivis d'un stress induit par l'HX/XO. Le groupe témoin sans traitement est le groupe référent, le taux d'expression de ces gènes est de 1.

Cette étude n'a pour objectif que de cibler les modulations d'expression de gènes d'intérêt. Compte tenu des résultats obtenus pour les gènes cités ci-dessus, l'étude de l'expression de la catalase est d'un réel intérêt au vu des modulations de son expression en fonction des conditions expérimentales. De plus, une autre enzyme antioxydante, la Sod2 est également intéressante. D'une part, son expression génique est augmentée en présence de PP et d'HX/XO par rapport à la condition HX/XO seule et d'autre part, son expression est mitochondriale ; elle est susceptible de jouer un rôle au niveau de la production des ROS par la chaîne respiratoire de la mitochondrie. Des résultats similaires de modulation d'expression de ces deux enzymes ont été obtenus pour un stress induit par du peroxyde d'hydrogène ; cependant, dans un souci de clarté, ces résultats ne seront pas présentés.

### G. Étude de l'expression des enzymes antioxydantes : catalase et superoxyde dismutase

Suite aux résultats obtenus par PCR arrays, le choix de l'étude de l'expression de protéines impliquées dans le stress oxydant s'est porté sur les enzymes antioxydantes catalase et superoxyde dismutase à Mn mitochondriale. L'expression de ces deux protéines d'intérêt est normalisée par rapport à l'expression de la protéine  $\beta$ -actine et les résultats sont exprimés en pourcentage d'expression par rapport au témoin sans traitement (100% d'expression).

Dans le cas d'un stress induit par 40 $\mu$ mol/L de peroxyde d'hydrogène, l'expression de la catalase est significativement diminuée à 80,4  $\pm$  5,7% (p < 0,01) par rapport au témoin sans traitement (100%), (cf. figure 76).



**Figure 76** : Expression des enzymes antioxydantes CAT et SOD en % rapportée à celle de la  $\beta$ -actine, dans les cellules RINm5F en présence d'un stress induit par 40 $\mu$ mol/L d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et en présence ou non d'antioxydants.

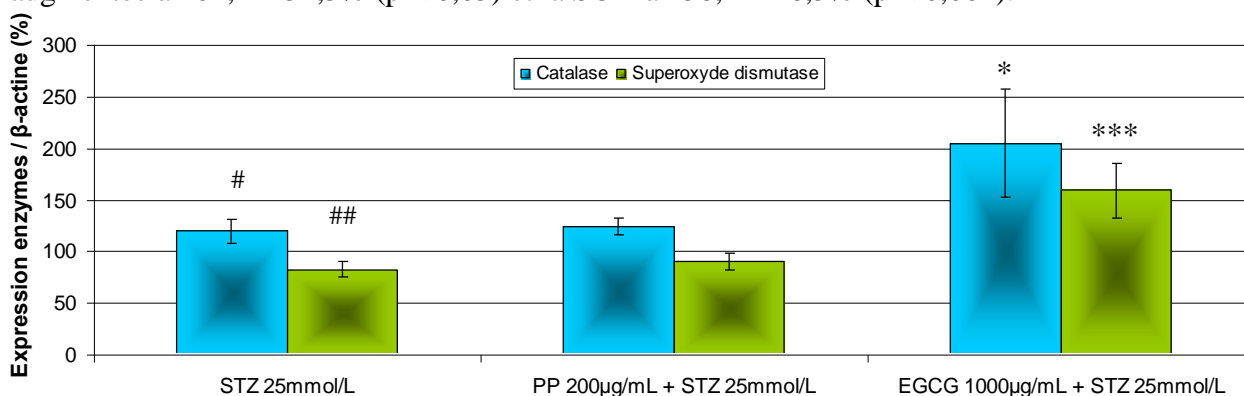
## : p < 0,01 ; Peroxyde d'hydrogène versus témoin sans traitement,

\*\* : p < 0,01 ; Antioxydants + peroxyde d'hydrogène versus peroxyde d'hydrogène, t-test (n=3).

En revanche, l'expression de la SOD dans cette même condition n'est pas modifiée par rapport au témoin sans traitement (98,8  $\pm$  10,5%). En pré-incubant les PP à 150 $\mu$ g/mL pendant une heure puis en induisant le stress par 40 $\mu$ mol/L d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'expression de la CAT semble augmenter

(96,7 ± 9,4%) par rapport au témoin positif H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40µmol/L, mais cette variation n'est pas significative. L'expression de la SOD, quand à elle, est significativement diminuée (53,8 ± 16,1% ; p < 0,01) par rapport au témoin positif. Au contraire des PP, lorsque l'EGCG est pré-incubée une heure à 500µg/mL et que le stress est induit, l'expression de la CAT semble diminuer (61,8 ± 15,2%) par rapport au témoin positif tandis que celle de la SOD n'est pas modifiée (108,7 ± 15,6%).

Lorsque le stress est induit par la STZ à 25mmol/L pendant deux heures, l'expression de la CAT est significativement augmentée à 119,0 ± 11,8% (p < 0,05) tandis que celle de la SOD est significativement diminuée à 82,1 ± 7,7% (p < 0,01) par rapport au témoin sans traitement (100% d'expression), (cf. figure 77). Une pré-incubation de PP pendant une heure, avant l'induction du stress par la STZ, ne permet pas de moduler l'expression des deux enzymes (CAT : 123,2 ± 7,9% ; SOD : 89,5 ± 8,0%) par rapport au témoin positif STZ 25mmol/L. En revanche, une pré-incubation de l'EGCG augmente l'expression des deux enzymes par rapport au témoin positif : la CAT est augmentée à 204,2 ± 52,3% (p < 0,05) et la SOD à 158,2 ± 26,5% (p < 0,001).

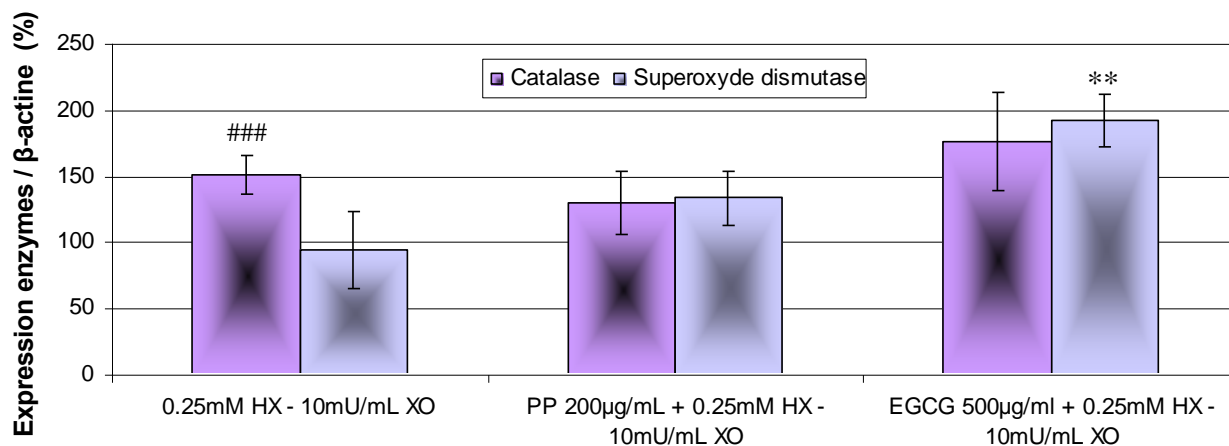


**Figure 77 :** Expression des enzymes antioxydantes CAT et SOD en % rapportée à celle de la β-actine, dans les cellules RINm5F en présence d'un stress induit par 25mmol/L de STZ et en présence ou non d'antioxydants.

# : p < 0,05 ; ## : p < 0,01 ; Streptozotocine versus témoin sans traitement,

\* : p < 0,05 ; \*\*\* : p < 0,001 ; Antioxydants + streptozotocine versus streptozotocine, t-test (n=3).

Lors d'un stress induit par 0,25mmol/L d'HX et 10mU/mL de XO, l'expression de la CAT est fortement augmentée 150,9 ± 15,0% (p < 0,001) par rapport au témoin sans traitement, contrairement à l'expression de la SOD qui n'est pas modifiée (94,2 ± 29,3%). Lorsque les PP sont pré-incubés avant le stress, l'expression des deux enzymes n'est pas significativement modifiée par rapport au témoin positif HX/XO (CAT : 129,7 ± 24,3% et SOD : 133,0 ± 20,5%). En revanche, lorsque l'EGCG est pré-incubée une heure avant l'induction du stress, l'expression de la CAT semble augmentée (176,5 ± 37,0%). L'expression de la SOD est également augmentée de façon significative à 191,7 ± 19,4% (p < 0,01), par rapport au témoin positif (cf. figure 78).



**Figure 78 :** Expression des enzymes antioxydantes CAT et SOD en % rapportée à celle de la  $\beta$ -actine, dans les cellules RINm5F en présence d'un stress induit par un couple HX/XO et en présence ou non d'antioxydants.

### :  $p < 0,001$  ; Mélange HX/XO versus témoin sans traitement,

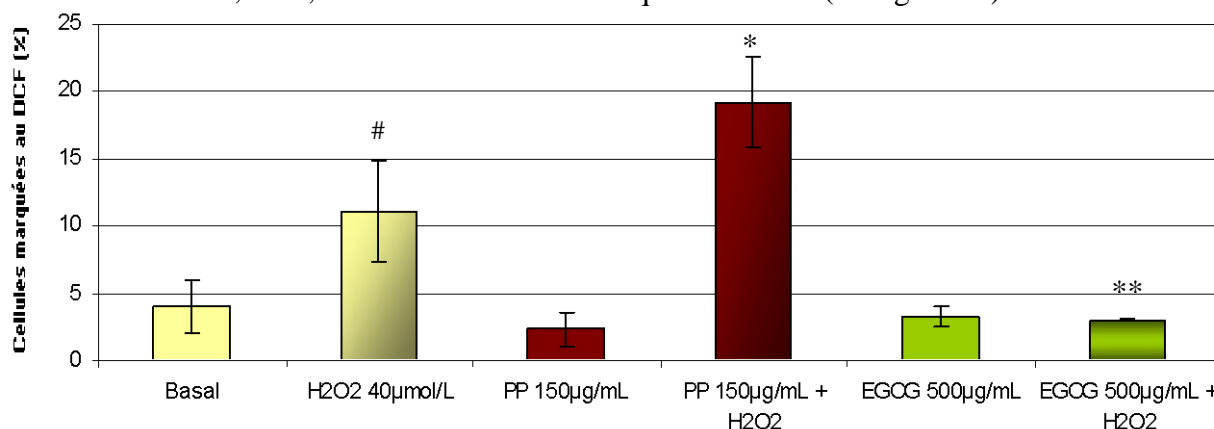
\*\* :  $p < 0,01$  ; Antioxydants + HX/XO versus HX/XO, t-test ( $n=3$ ).

### H. Quantification de la production intracellulaire d' $H_2O_2$

La mesure de la production intracellulaire d' $H_2O_2$  a été réalisée par la sonde DCFH-DA.

La méthode utilisée consiste à créer un stress sur les cellules RINm5F puis d'introduire la sonde afin de quantifier l' $H_2O_2$  intracellulaire produit en réponse au stress.

Une augmentation significative de la production d' $H_2O_2$  intracellulaire est observée en présence de  $40\mu\text{mol/L}$  de peroxyde d'hydrogène ( $11,1 \pm 3,7\%$  ;  $p < 0,05$ ) par rapport au témoin sans traitement où  $4,0 \pm 1,9\%$  des cellules sont marquées au DCF (cf. figure 79).



**Figure 79 :** Quantification de la production d' $H_2O_2$  intracellulaire par analyse du pourcentage de cellules marquées à la DCF, en présence d' $H_2O_2$   $40\mu\text{mol/L}$  pendant 30 minutes, et/ou d'antioxydants pendant une heure.

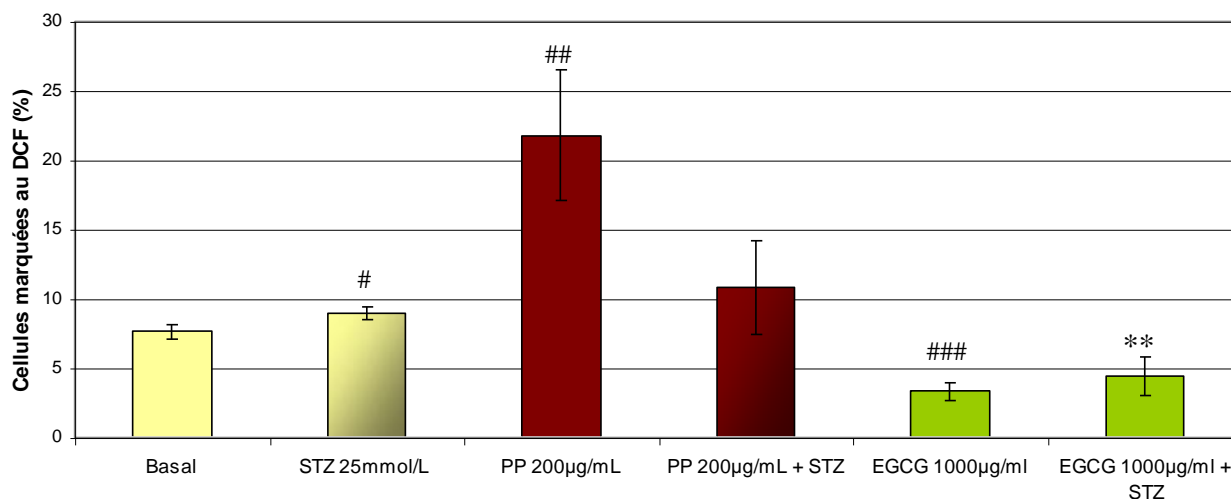
# :  $p < 0,05$  ; Peroxyde d'hydrogène versus témoin sans traitement (basal),

\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; Antioxydants + peroxyde d'hydrogène versus peroxyde d'hydrogène, t-test ( $n=3$ ).

Les polyphénols à  $150\mu\text{g/mL}$  ou l'EGCG à  $500\mu\text{g/mL}$  incubés seuls n'induisent pas de modification de la production intracellulaire d' $H_2O_2$  ( $2,4 \pm 1,3\%$  et  $3,3 \pm 0,7\%$ ) par rapport au témoin sans traitement. En revanche, lorsque les PP sont pré-incubés avant l'induction du stress,

une augmentation significative de la production intracellulaire d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est observée ( $19,2 \pm 3,3\%$  ;  $p < 0,05$ ) par rapport au témoin positif, tandis que la pré-incubation de  $500\mu\text{g}/\text{mL}$  d'EGCG avant l'induction du stress permet de diminuer de façon significative la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire ( $3,1 \pm 0,1\%$  ;  $p < 0,01$ ).

Lorsque les cellules sont traitées par  $25\text{mmol}/\text{L}$  de STZ, la quantité d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire produite est significativement augmentée à  $9,0 \pm 0,4\%$  ( $p < 0,05$ ) par rapport au témoin sans traitement ( $7,6 \pm 0,5\%$ ) ; (cf. figure 80).



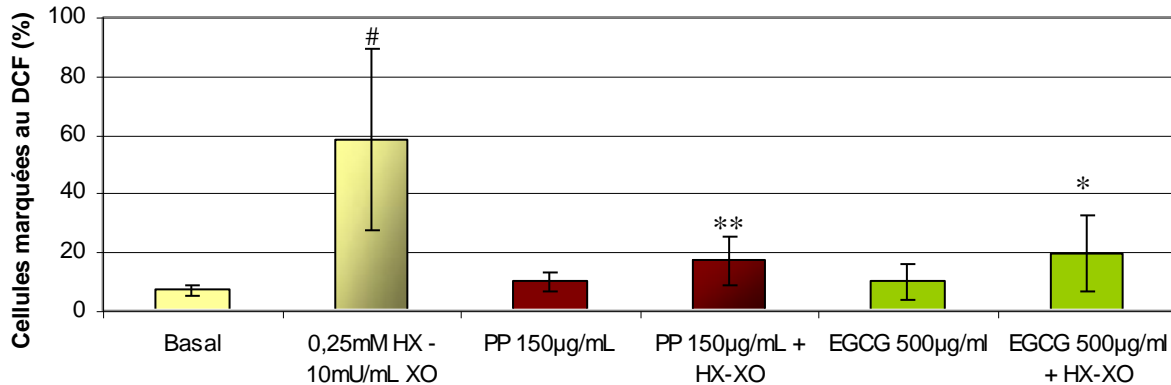
**Figure 80** : Quantification de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire par analyse du pourcentage de cellules marquées à la DCF, en présence de STZ  $25\text{mmol}/\text{L}$  pendant 2 heures, et/ou d'antioxydants pendant une heure.

# :  $p < 0,05$  ; ## :  $p < 0,01$  ; ### :  $p < 0,001$  ; Streptozotocine ou antioxydants seuls versus témoin sans traitement, \*\* :  $p < 0,01$  ; Antioxydants + streptozotocine versus streptozotocine, t-test ( $n=3$ ).

Une pré-incubation des PP seuls à  $200\mu\text{g}/\text{mL}$  sur les cellules induit une augmentation significative de la production intracellulaire d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $21,8 \pm 4,7\%$  ;  $p < 0,01$ ) par rapport au témoin sans traitement, contrairement à l'EGCG où une diminution de la quantité de peroxyde d'hydrogène intracellulaire est observée ( $3,3 \pm 0,7\%$  ;  $p < 0,001$ ). En revanche, lorsque  $200\mu\text{g}/\text{mL}$  de PP sont pré-incubés avant l'induction du stress, il n'y a pas de modification de la production de peroxyde d'hydrogène intracellulaire ( $10,8 \pm 3,4\%$ ) par rapport au témoin positif de stress (STZ  $25\text{mmol}/\text{L}$ ), tandis que la pré-incubation de  $1000\mu\text{g}/\text{mL}$  d'EGCG avant l'induction du stress permet de diminuer de façon significative la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire ( $4,4 \pm 1,4\%$  ;  $p < 0,01$ ).

En présence d'un mélange de  $0,25\text{mmol}/\text{L}$  d'HX et de  $10\text{mU}/\text{mL}$  de XO, la quantité d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire est fortement augmentée à  $58,5 \pm 30,9\%$  ( $p < 0,05$ ) par rapport au témoin sans traitement ( $6,9 \pm 1,9\%$ ) ; (cf. figure 81). Une incubation des cellules en présence de  $150\mu\text{g}/\text{mL}$  de PP ou de  $500\mu\text{g}/\text{mL}$  d'EGCG seuls ne modifie pas la quantité d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produite avec des taux respectifs de  $9,7 \pm 3,4\%$  et de  $9,8 \pm 6,0\%$ , par rapport au témoin sans traitement. Dans ce modèle de

stress cellulaire induit par un mélange HX/XO, la pré-incubation de 150µg/mL de PP ou de 500µg/mL d'EGCG a modifié la production intracellulaire d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En effet, les PP permettent de diminuer de façon significative la production de peroxyde d'hydrogène à 17,2 ± 8,2% (p < 0,01) par rapport au témoin positif. De même, l'EGCG permet de diminuer cette quantité d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire à 19,3 ± 12,9% (p < 0,05).



**Figure 81 :** Quantification de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire par analyse du pourcentage de cellules marquées à la DCF, en présence d'HX/XO pendant une heure, et/ou d'antioxydants pré-incubés une heure.

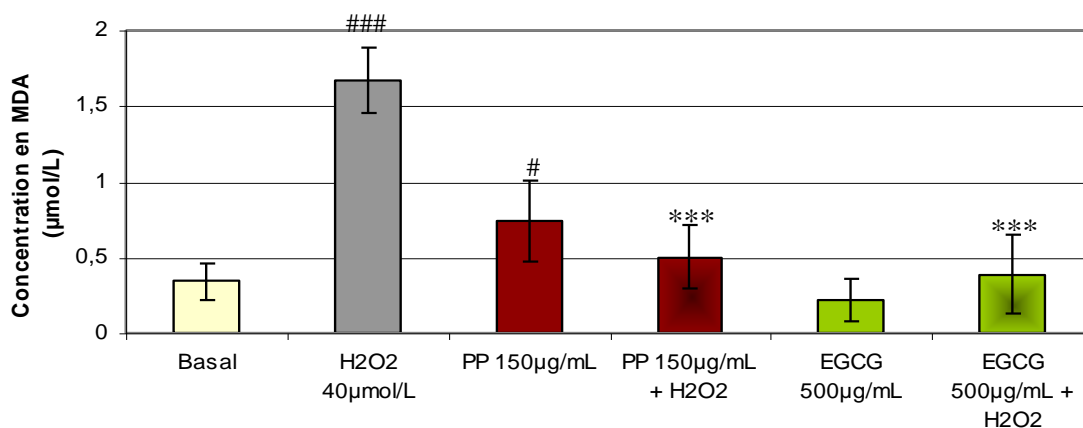
# : p < 0,05 ; Mélange HX/XO versus témoin sans traitement,

\* : p < 0,05 ; \*\* : p < 0,01 ; Antioxydants + HX/XO versus HX/XO, t-test (n=3).

## I. Conséquence du stress oxydant

### 1. Sur la quantité de lipides peroxydés

Les dégâts cellulaires provoqués par le stress oxydant sur les macro-molécules biologiques ont été quantifiés au travers de la mesure des lipides oxydés. Lors d'un stress induit par 40µmol/L en peroxyde d'hydrogène, la quantité de lipides peroxydés est significativement augmentée à 1,7 ± 0,2µmol/L (p < 0,001) par rapport au témoin sans traitement (0,3 ± 0,1µmol/L) ; (cf. figure 82).



**Figure 82 :** Peroxydation lipidique par mesure du MDA en µmol/L sur des cellules RINm5F en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40µmol/L et/ou d'antioxydants.

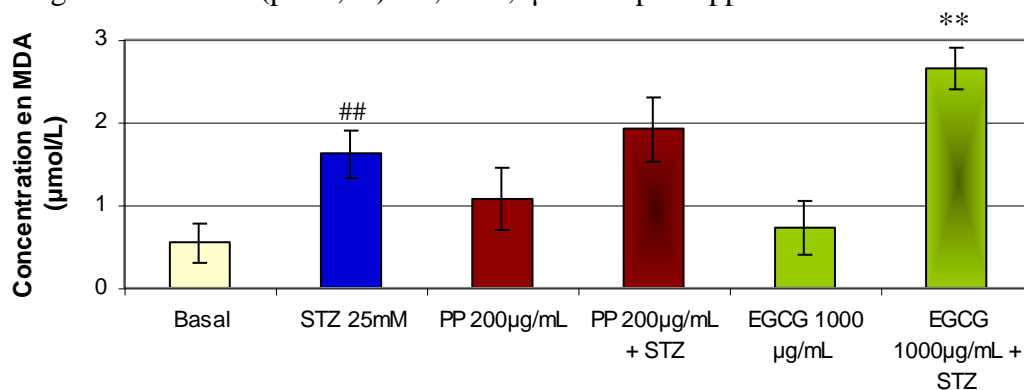
# : p < 0,05 ; ### : p < 0,001 ; Peroxyde d'hydrogène ou antioxydants seuls versus témoin sans traitement (basal),

\*\*\* : p < 0,001 ; Antioxydants + peroxyde d'hydrogène versus peroxyde d'hydrogène, t-test (n=3).



Les polyphénols seuls, à 150µg/mL, incubés une heure sur les cellules, augmentent également significativement la peroxydation lipidique à  $0,7 \pm 0,3\mu\text{mol/L}$  ( $p < 0,05$ ) par rapport au témoin. En revanche, en présence d'EGCG seule (500µg/mL), le taux de peroxydation lipidique n'est pas modifié ( $0,2 \pm 0,1\mu\text{mol/L}$ ) par rapport au témoin sans traitement. Par contre, une pré-incubation de 150µg/mL de PP avant l'induction du stress, permet de réduire significativement la quantité de lipides peroxydés à  $0,5 \pm 0,2\mu\text{mol/L}$  ( $p < 0,001$ ) par rapport au témoin positif à 40µmol/L d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Des résultats similaires ont été obtenus en présence de 500µg/mL d'EGCG où le taux de lipides peroxydés est de  $0,4 \pm 0,3\mu\text{mol/L}$  ( $p < 0,001$ ).

En présence de 25mmol/L de STZ, la quantité de lipides peroxydés est significativement augmentée à  $1,6 \pm 0,3\mu\text{mol/L}$  ( $p < 0,01$ ) par rapport au témoin sans traitement ( $0,5 \pm 0,2\mu\text{mol/L}$ ) ; (cf. figure 83). La présence d'antioxydants seuls (200µg/mL de PP ou 1000µg/mL d'EGCG) ne modifie pas significativement la quantité de lipides peroxydés par rapport au témoin négatif. De plus, une pré-incubation des cellules avec les PP avant l'induction du stress ne change pas le taux de MDA ( $1,9 \pm 0,4\mu\text{mol/L}$ ) par rapport au témoin STZ. En revanche, en présence de 1000µg/mL d'EGCG pré-incubés séparément avant l'induction du stress, la quantité de lipides peroxydés augmente significativement ( $p < 0,01$ ) à  $2,7 \pm 0,3\mu\text{mol/L}$  par rapport au témoin STZ seul.



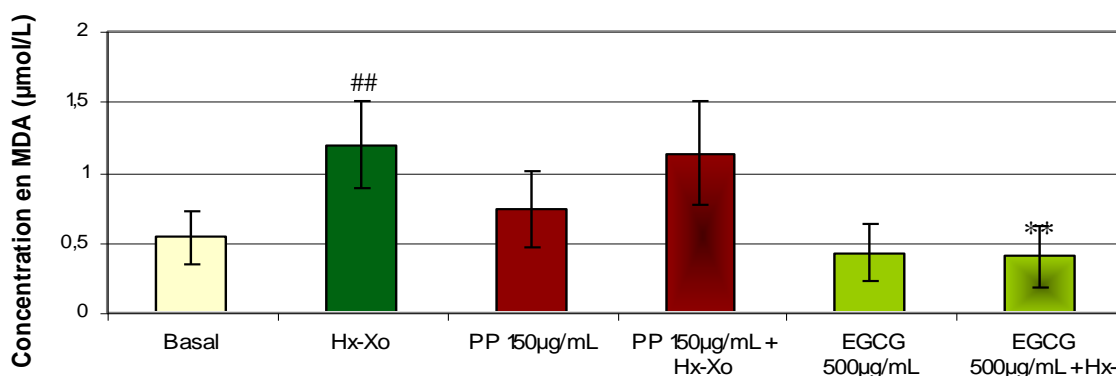
**Figure 83 :** Peroxydation lipidique par mesure du MDA en µmol/L sur des cellules RINm5F en présence de STZ à 25mmol/L pendant deux heures, et/ou d'antioxydants pendant une heure.

## :  $p < 0,01$  ; Streptozotocine versus témoin sans traitement,

\*\* :  $p < 0,01$  ; Antioxydants + streptozotocine versus streptozotocine, t-test (n=3).

Enfin, lors d'un stress induit par 0,25mmol/L d'HX et 10mU/mL de XO, la quantité de lipides peroxydés obtenue est significativement augmentée à  $1,2 \pm 0,4\mu\text{mol/L}$  ( $p < 0,01$ ) par rapport au témoin sans traitement où le taux de lipides est de  $0,5 \pm 0,2\mu\text{mol/L}$  (cf. figure 84). La présence seule de PP à 150µg/mL ou d'EGCG à 500µg/mL ne semble pas avoir d'effet sur la peroxydation lipidique car les taux sont respectivement de  $0,47 \pm 0,02\mu\text{mol/L}$  et de  $0,4 \pm 0,2\mu\text{mol/L}$ . La pré-incubation des PP une heure avant l'induction du stress ne modifie pas la quantité de lipides oxydés

( $1,1 \pm 0,4 \mu\text{mol/L}$ ) par rapport au témoin positif (HX/XO), contrairement à l'EGCG à  $500 \mu\text{g/mL}$ , où le taux de lipides oxydés est significativement diminué à  $0,4 \pm 0,1 \mu\text{mol/L}$  ( $p < 0,01$ ).



**Figure 84 : Peroxydation lipidique par mesure du MDA en  $\mu\text{mol/L}$  sur les cellules RINm5F en présence de  $0,25 \text{mmol/L}$  d'HX et de  $10 \text{mU/mL}$  de XO pendant une heure, et/ou d'antioxydants pré-incubés pendant 1 heure.**

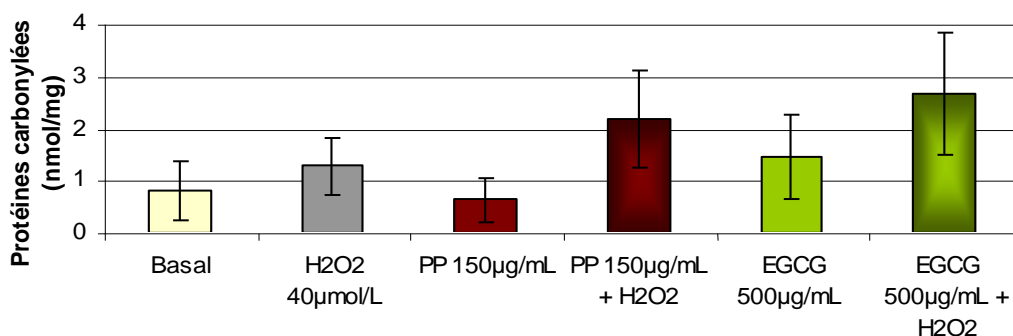
## :  $p < 0,01$  ; Mélange HX/XO versus témoin sans traitement,

\*\* :  $p < 0,01$  ; Antioxydants + HX/XO versus HX/XO, t-test ( $n=3$ ).

## 2. Étude de la carbonylation des protéines

Le stress oxydant provoque également des dégâts au niveau des protéines par des phénomènes d'oxydation. La mesure des protéines carbonylées sous l'effet d'un stress rend compte de l'état cellulaire des protéines.

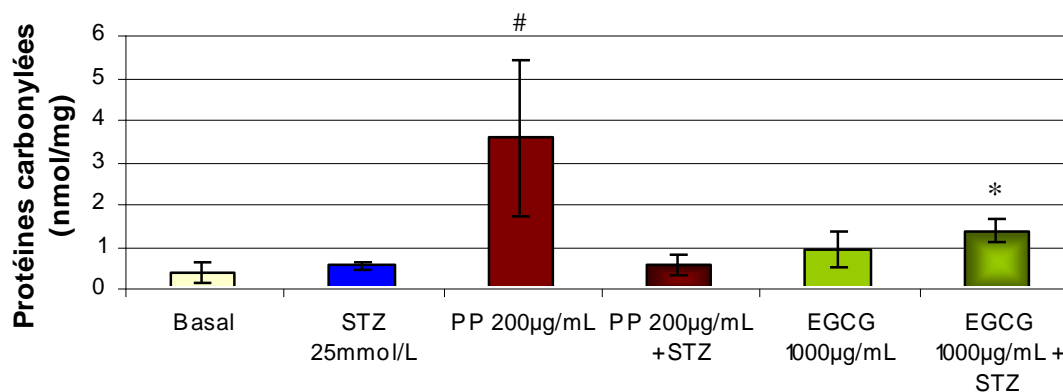
Après avoir induit un stress par  $40 \mu\text{mol/L}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  pendant 30 minutes, aucune augmentation significative de la quantité de protéines carbonylées est observée ( $1,29 \pm 0,55 \text{nmol/mg}$  de protéines totales versus  $0,80 \pm 0,57 \text{nmol/mg}$  de protéines totales du témoin sans traitement) ; (cf. figure 85). Les PP seuls à  $150 \mu\text{g/mL}$  n'augmentent pas le taux de protéines carbonylées ( $0,63 \pm 0,42 \text{nmol/mg}$ ) et l'EGCG n'induit pas également d'augmentation ( $1,46 \pm 0,80 \text{nmol/mg}$ ) significative de ce taux par rapport au témoin sans traitement (basal). Lorsque les antioxydants sont pré-incubés une heure avant l'induction du stress par  $\text{H}_2\text{O}_2$ , le taux de protéines carbonylées semble augmenté (PP :  $2,18 \pm 0,93 \text{nmol/mg}$  ; EGCG :  $2,68 \pm 1,17 \text{nmol/mg}$ ) par rapport à la condition de stress seule ( $1,29 \pm 0,55 \text{nmol/mg}$ ) mais les différences ne sont pas statistiquement significatives.



**Figure 85 : Protéines carbonylées en  $\text{nmol/mg}$  de protéines totales dans les cellules RINm5F en présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$   $40 \mu\text{mol/L}$  pendant 30 minutes et/ou d'antioxydants pré-incubés pendant 1 heure.**

NS, t-test ( $n=3$ ).

Dans le cas d'un stress induit par 25mmol/L de STZ, aucune augmentation du taux de protéines carbonylées n'est observée en présence de STZ à 25mmol/L pendant deux heures ( $0,53 \pm 0,08$  nmol/mg de protéines) par rapport au témoin sans traitement ( $0,36 \pm 0,22$ nmol/mg) ; (cf. figure 86). La présence seule des PP à 200 $\mu$ g/mL induit une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de la quantité de protéines carbonylées cellulaires ( $3,57 \pm 1,85$ nmol/mg) par rapport au témoin contrairement à l'EGCG à 1000 $\mu$ g/mL où l'augmentation observée ( $0,90 \pm 0,41$ nmol/mg) n'est pas significative. Enfin, lorsque les PP sont pré-incubés une heure avant d'induire le stress par la STZ, aucune augmentation du taux de protéines carbonylées n'est observée ( $0,55 \pm 0,25$ nmol/mg) par rapport au témoin positif STZ ( $0,53 \pm 0,08$ nmol/mg). En revanche, l'EGCG pré-incubée associée au stress par la STZ induisent une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) du taux de protéines carbonylées ( $1,36 \pm 0,30$ nmol/mg) par rapport au témoin positif STZ.

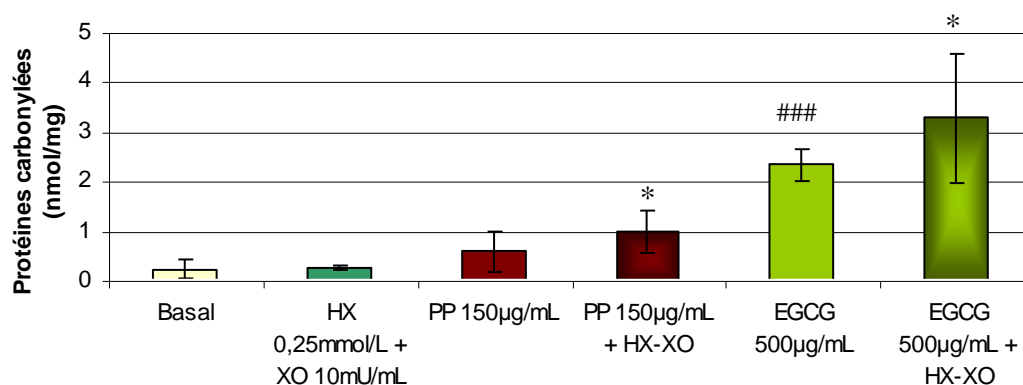


**Figure 86 : Protéines carbonylées en nmol/mg de protéines totales dans les cellules RINm5F en présence de 25mmol/L de STZ pendant 2 heures et/ou d'antioxydants pré-incubés pendant 1 heure.**

# :  $p < 0,05$  ; Antioxydants seuls versus témoin sans traitement (basal),

\* :  $p < 0,05$  ; Antioxydants + STZ versus STZ, t-test (n=3).

Lorsque le stress est induit par 0,25mmol/L d'HX et 10mU/mL de XO, aucune augmentation de la quantité de protéines carbonylées n'est observée ( $0,27 \pm 0,05$ nmol/mg) par rapport au témoin sans traitement (basal) où le taux est de  $0,22 \pm 0,19$ nmol/mg de protéines totales (cf. figure 87). En revanche, l'ajout des antioxydants seuls augmente la carbonylation des protéines pour les PP à 150 $\mu$ g/mL ( $0,58 \pm 0,41$ nmol/L) et pour l'EGCG à 500 $\mu$ g/mL ( $2,33 \pm 0,34$ nmol/mg) de façon significative ( $p < 0,001$ ) par rapport au témoin ( $0,22 \pm 0,19$ nmol/mg). Enfin, la pré-incubation d'une heure des antioxydants avant l'induction du stress par le couple HX-XO, induit une augmentation de la quantité de protéines carbonylées de façon significative ( $p < 0,05$ ) pour les deux molécules (PP :  $0,97 \pm 0,42$ nmol/mg et EGCG :  $3,27 \pm 1,23$ nmol/mg) par rapport au témoin positif HX-XO ( $0,27 \pm 0,05$ nmol/mg).



**Figure 87 :** Protéines carbonylées en nmol/mg de protéines totales dans les cellules RINm5F en présence de 0,25mmol/L d’HX associés à 10mU/mL pendant 1 heure et/ou d’antioxydants pré-incubés pendant 1 heure.

### :  $p < 0,001$  ; Antioxydants seuls versus témoin sans traitement (basal),

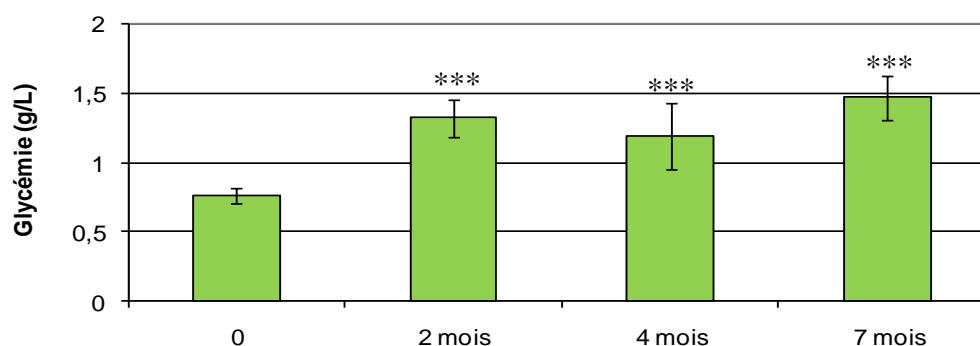
\* :  $p < 0,05$  ; Antioxydants + HX-XO versus HX-XO, t-test ( $n=3$ ).

## II. Étude *in vivo* de l’effet des antioxydants sur un modèle de rats intolérants au glucose

### A. Mise au point du modèle de diabète de type 2

#### 1. Effet des régimes normocalorique ou hypercalorique sur la glycémie

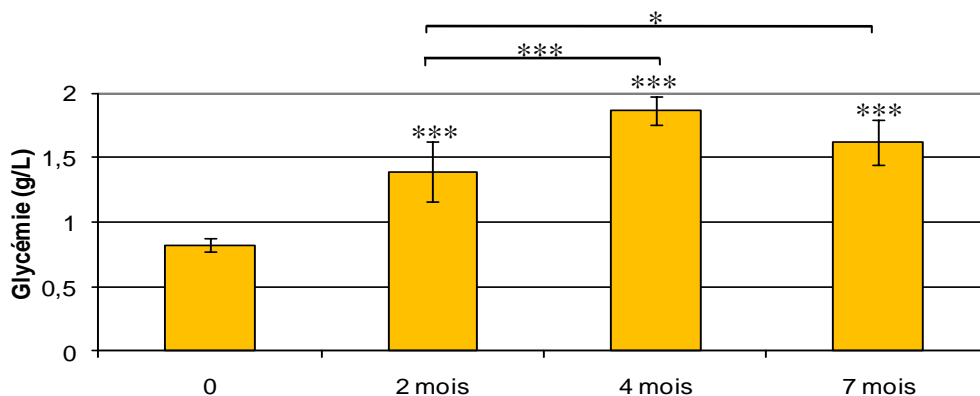
La glycémie des animaux a été mesurée sur 7 mois d’étude. Les résultats montrent que les rats nourris avec l’alimentation ND présentent une glycémie de départ de  $0,76 \pm 0,05$ g/L et que celle-ci augmente de façon significative ( $p < 0,001$ ) au cours de l’étude (cf. figure 88), avec des valeurs de  $1,32 \pm 0,13$ g/L ;  $1,19 \pm 0,24$ g/L et  $1,47 \pm 0,16$ g/L respectivement pour 2, 4 et 7 mois de régime alimentaire.



**Figure 88 :** Glycémie plasmatique en g/L des rats nourris par l’alimentation normocalorique pendant 0, 2, 4 et 7 mois.

\*\*\* :  $p < 0,001$  ; glycémie à 2, 4 et 7 mois versus glycémie à 0 mois, One Way ANOVA, Student-Newman-Keuls Method post test ( $n=10$  à 0 mois, 10 à 2 mois, 4 à 4 mois et 4 à 7 mois de régime)

Lorsque les animaux sont nourris par une alimentation hypercalorique HFD, au cours de l'étude, une augmentation significative de la glycémie est observée (cf. figure 89).

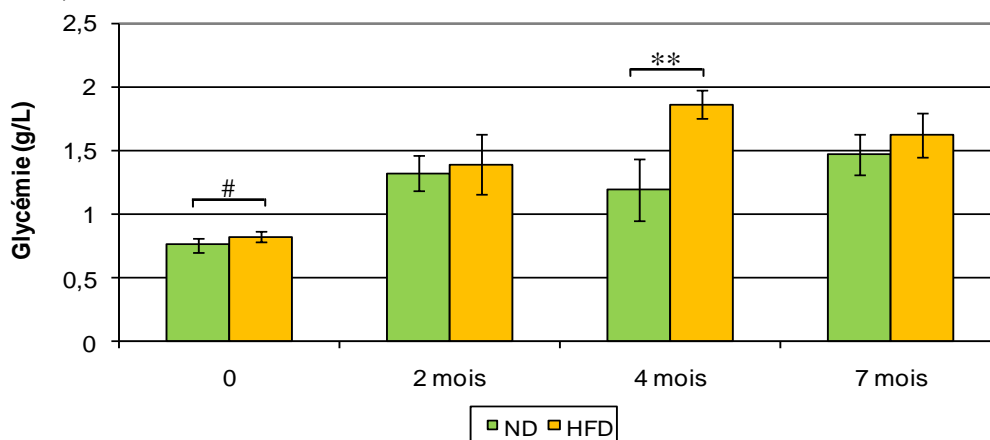


**Figure 89** : Glycémie plasmatique en g/L des rats nourris par l'alimentation hypercalorique pendant 0, 2, 4 et 7 mois.

\*\*\* :  $p < 0,001$  ; glycémie à 2, 4 et 7 mois versus glycémie à 0 mois, One Way ANOVA, Student-Newman-Keuls Method post test (n=6 à 0 mois, 6 à 2 mois, 5 à 4 mois et 3 à 7 mois de régime).

En effet, la glycémie observée à deux mois est augmentée à  $1,39 \pm 0,23\text{g/L}$  ( $p < 0,001$ ) par rapport à la glycémie du début de l'étude (0 mois) qui est de  $0,83 \pm 0,05\text{g/L}$ . A 4 et 7 mois de régime HFD, elles sont également augmentées de façon significative ( $p < 0,001$ ) respectivement à  $1,86 \pm 0,11\text{g/L}$  et  $1,62 \pm 0,17\text{g/L}$ , par rapport au taux de glucose du début de l'étude. De plus, les valeurs de glycémie sont significatives entre elles à 2 et 4 mois ( $p < 0,001$ ) et à 2 et 7 mois ( $p < 0,05$ ).

Lorsque les glycémies plasmatiques des animaux nourris par les alimentations ND et HFD sont comparées (cf. figure 90), une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de la glycémie des rats HFD ( $0,83 \pm 0,05\text{g/L}$ ) est observée par rapport aux animaux ND ( $0,76 \pm 0,05\text{g/L}$ ), au début de l'étude (0 mois).



**Figure 90** : Glycémie plasmatique en g/L des rats nourris par les alimentations normocalorique ou hypercalorique pendant 0, 2, 4 et 7 mois.

# :  $p < 0,05$  ; ND versus HFD à 0 mois, t-test (n=10 et 6).

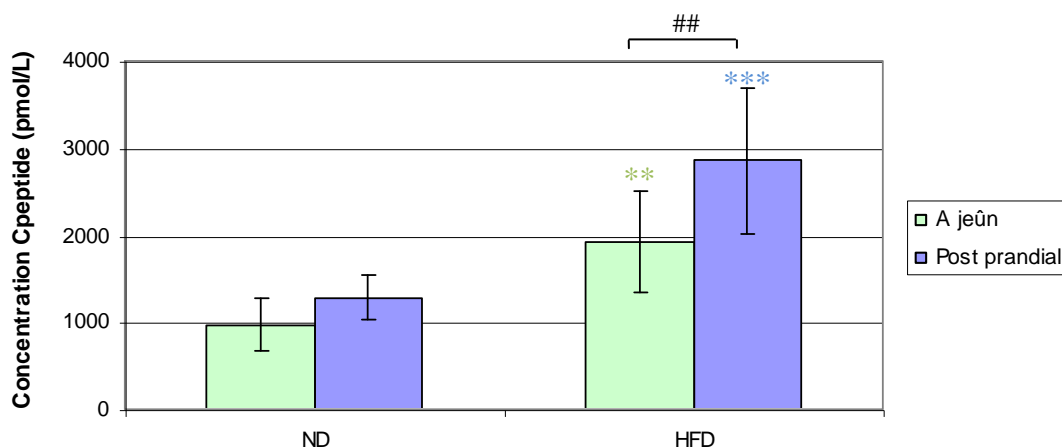
\*\* :  $p < 0,01$  ; ND versus HFD à 4 mois, t-test (n=4 et 5).

Cette différence de glycémie entre animaux ND et HFD n'est pas retrouvée à 2 et 7 mois. Cependant, à 4 mois, les rats HFD présentent une glycémie significativement augmentée à  $1,86 \pm 0,11\text{g/L}$  par rapport aux animaux ND ( $1,29 \pm 0,24\text{g/L}$ ).

## 2. Effet des deux régimes sur la C-peptidémie

La C-peptidémie a été mesurée chez les animaux nourris par les régimes ND ou HFD, après 2 et 7 mois de régime, à jeun ou après 30 minutes d'une réalimentation (post prandiale 30 minutes).

Les résultats de la mesure du C-peptide montrent, qu'après **deux mois de régime**, aucune différence significative n'est observée entre la C-peptidémie à jeun ( $969,96 \pm 297,33\text{pmol/L}$ ) et celle post-prandiale ( $1278,67 \pm 258,19\text{pmol/L}$ ) chez les animaux ND (cf. figure 91). En revanche, chez les animaux nourris par l'alimentation HFD, la C-peptidémie post-prandiale est significativement augmentée ( $2855,30 \pm 835,31\text{pmol/L}$  ;  $p < 0,01$ ) par rapport à celle à jeun ( $1823,38 \pm 641,20\text{pmol/L}$ ). De plus, le taux de C-peptide à jeun est significativement augmenté ( $p < 0,01$ ) chez les animaux HFD ( $1823,38 \pm 641,20\text{pmol/L}$ ) par rapport aux animaux ND ( $969,96 \pm 297,33\text{pmol/L}$ ). Il est également augmenté de façon significative ( $p < 0,001$ ) après une réalimentation de 30 minutes (post-prandiale) chez les animaux HFD ( $2855,30 \pm 835,31\text{pmol/L}$ ) par rapport aux animaux ND ( $1278,67 \pm 258,19\text{pmol/L}$ ).



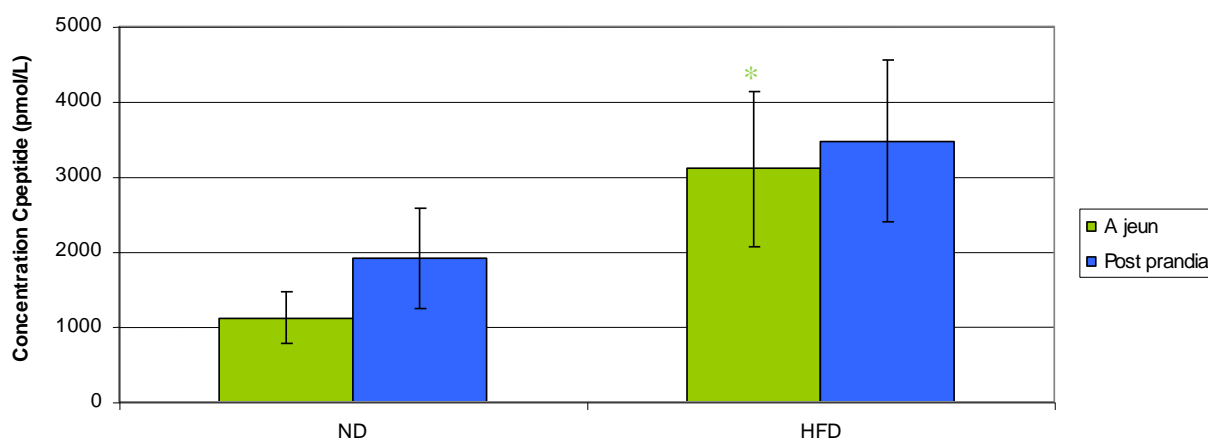
**Figure 91** : Mesure du taux de C-peptide plasmatique chez des animaux ND et HFD après deux mois de régimes, en condition à jeun et post-prandiale 30 minutes.

\*\* :  $p < 0,01$  ; C-peptidémie à jeun ND (n=6) versus C-peptidémie à jeun HFD (n=10), t-test.

\*\*\* :  $p < 0,001$  ; C-peptidémie post-prandiale ND (n=6) versus C-peptidémie post-prandiale HFD (n=10), t-test.

## :  $p < 0,01$  ; C-peptidémie à jeun HFD versus C-peptidémie post-prandiale HFD, t-test (n=10).

Après sept mois de régime alimentaire ND ou HFD, aucune différence n'est observée entre les C-peptidémies à jeun ( $1121,67 \pm 337,26\text{pmol/L}$ ) et post prandiale ( $1911,67 \pm 667,22\text{pmol/L}$ ) chez les rats ND, ainsi que chez les rats HFD (à jeun :  $3100,5 \pm 1043,04\text{pmol/L}$  ; post-prandial :  $3474,25 \pm 1073,05\text{pmol/L}$ ) ; (cf. figure 92).



**Figure 92** : Mesure du taux de C-peptide plasmatique chez des animaux après 7 mois de régimes ND ou HFD, en condition à jeun ou post-prandiale.

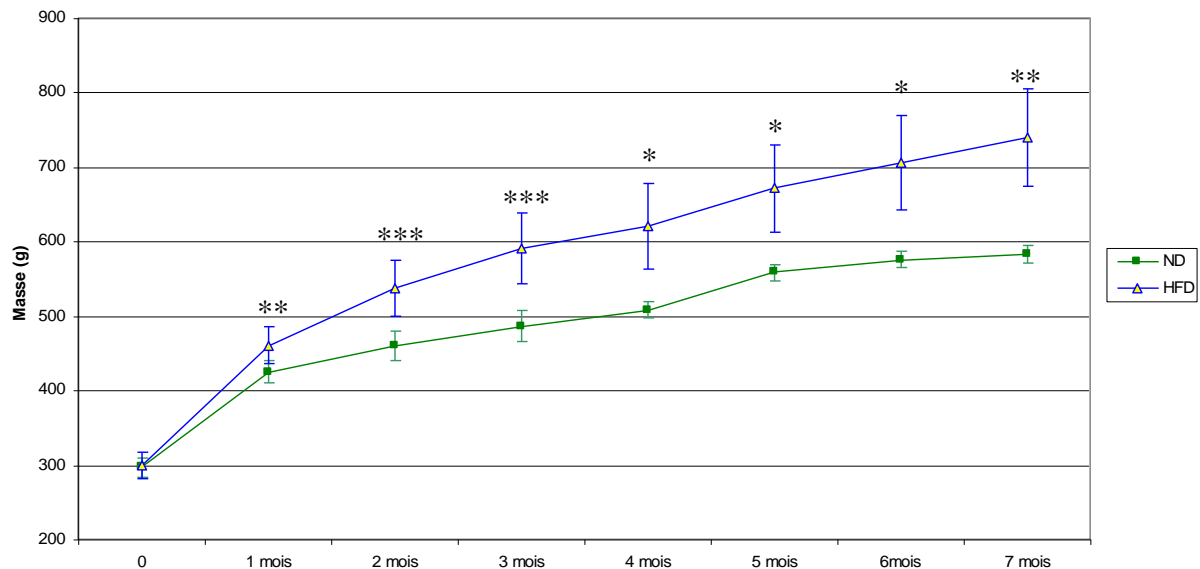
\* :  $p < 0,05$  ; C-peptidémie à jeun ND (n=3) versus C-peptidémie à jeun HFD (n=4), t-test.

En revanche, le taux de C-peptide à jeun est significativement augmenté ( $p < 0,05$ ) chez les animaux HFD ( $3100,5 \pm 1043,04\text{pmol/L}$ ) par rapport aux animaux ND ( $1121,67 \pm 337,26\text{pmol/L}$ ), mais aucune augmentation significative n'est observée au vu des écart-types obtenus, en condition post-prandiale entre les deux groupes d'animaux (ND :  $1911,67 \pm 667,22\text{pmol/L}$  ; HFD :  $3474,25 \pm 1073,05\text{pmol/L}$ ).

Chez les animaux HFD, lorsque les taux de C-peptide à jeun et post-prandial sont comparés à 2 et 7 mois, il en résulte que l'augmentation de C-peptidémie à jeun observée à 7 mois ( $3100,5 \pm 1043,04\text{pmol/L}$ ) est significative ( $p < 0,05$ ) par rapport à celle observée à 2 mois de régime alimentaire ( $1823,38 \pm 641,20\text{pmol/L}$ ). La C-peptidémie post prandiale des animaux HFD à 7 mois ( $3474,25 \pm 1073,05\text{pmol/L}$ ) n'est pas augmentée de manière significative par rapport à celle des animaux à 2 mois de régime ( $2855,30 \pm 835,31\text{pmol/L}$ ).

### 3. [Effet des régimes alimentaires sur la prise de masse des animaux](#)

La prise de masse corporelle des rats a été mesurée tous les mois, pendant sept mois, dans les deux groupes de régimes alimentaires (ND ou HFD). Au début de l'étude, les rats présentent des masses similaires dans les deux groupes (ND :  $296,33 \pm 12,34\text{g}$  et HFD :  $299,20 \pm 17,56\text{g}$ ) ; (cf. figure 93).



**Figure 93 : Mesure de la masse des rats nourris par l'alimentation normocalorique ou hypercalorique, tout les mois, pendant 7 mois**

\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; Masse des animaux ND versus HFD de 0 à 7 mois, t-test.

(De 0 à 4 mois,  $n=6$  animaux ND et  $n=10$  animaux HFD et de 5 à 7 mois,  $n=3$  animaux ND et  $n=47$  animaux HFD).

A partir d'un mois de régime ND ou HFD, la masse des rats HFD est significativement augmentée ( $p < 0,01$ ) à  $460,3 \pm 24,99g$  contre  $424,67 \pm 15,44g$  pour les ND. Cette augmentation significative de masse chez le groupe HFD se maintient tout au long de l'étude. A 2 mois, la masse des rats HFD est augmentée de façon significative ( $p < 0,001$ ) à  $536,80 \pm 37,66g$  par rapport aux rats ND ( $459,33 \pm 19,92g$ ). A la fin de l'étude (7 mois), la masse des rats HFD est de  $739,50 \pm 65,87g$ , masse significativement augmentée ( $p < 0,01$ ) par rapport aux rats ND du même temps ( $582,33 \pm 12,01g$ ).

#### 4. Effet des traitements sur l'histologie du pancréas

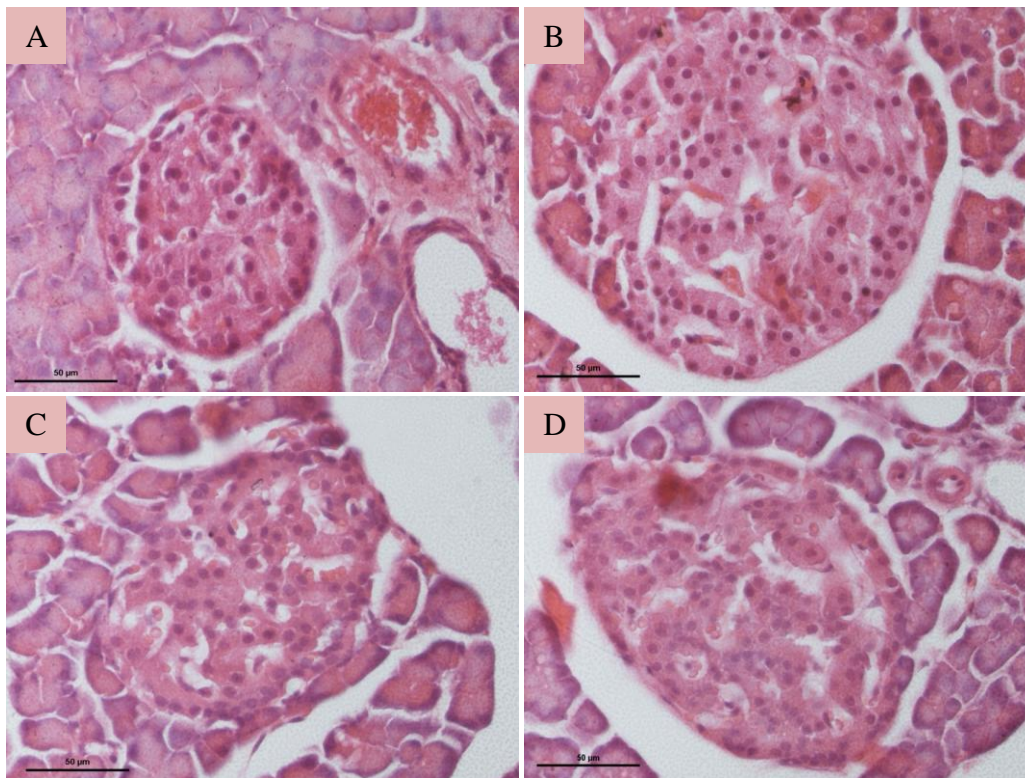
##### a) Coloration Hématoxyline / Éosine

Les coupes histologiques de pancréas de rats, nourris par l'alimentation normocalorique ou hypercalorique, ont été réalisées après 2 et 7 mois de régime alimentaire et colorées à l'hématoxyline / éosine (cf. figure 94).

Après deux mois de régime ND, les rats présentent des îlots pancréatiques pour la plupart de forme ovoïde et de taille moyenne (cf. figure 94 A). En revanche, les animaux nourris avec l'alimentation HFD pendant le même temps, présentent également des îlots de forme arrondie mais de taille un peu plus importante (cf. figure 94 B). De plus, ceux-ci montrent des espaces blancs sans cellules. Lorsque les rats sont nourris sept mois par le régime ND (cf. figure 94 C), les îlots pancréatiques adoptent également une forme arrondie et présentent des trous. Ces caractéristiques



sont également mises en évidence, sur les îlots de rats nourris par alimentation HFD pendant sept mois (cf. figure 94 D). De plus, dans ce groupe d'animaux, la taille des îlots semble augmentée.



**Figure 94 : Photographies de coupes histologiques de pancréas de rats après coloration HE.**

Les animaux ont été nourris avec le régime normocalorique pendant deux mois (photos A) ou sept mois (photos C) ; ou avec le régime hypercalorique pendant 2 mois (photos B) ou sept mois (photos D).

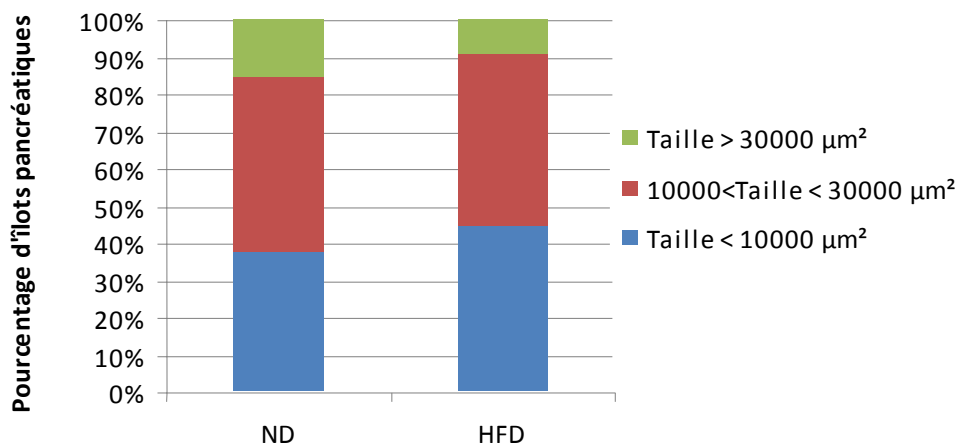
#### b) Mesure de la taille des îlots après coloration Hématoxyline / Éosine

La mesure de la surface des îlots pancréatiques, après coloration HE des coupes, a été réalisée avec le logiciel de capture d'image et a permis un classement arbitraire des îlots dans trois catégories distinctes :

- Une taille inférieure à  $10\,000\mu\text{m}^2$  correspond à des petits îlots,
- Une taille comprise entre  $10\,000$  et  $30\,000\mu\text{m}^2$ , correspond à des îlots moyens,
- Une taille supérieure à  $30\,000\mu\text{m}^2$  correspond à des gros îlots.

Les résultats obtenus montrent que des animaux nourris par alimentation ND pendant 2 mois, ont majoritairement des îlots de taille moyenne ( $46,7 \pm 17,2\%$ ), puis de petite taille ( $37,7 \pm 22,9\%$ ). Les gros îlots sont peu présents chez ces animaux ( $15,6 \pm 5,7\%$ ) ; (cf. figure 95). Les animaux nourris par le régime HFD présentent des tailles d'îlots similaires au groupe ND. En effet, le nombre d'îlots

de petite taille est de  $44,3 \pm 11,1\%$ , celui concernant les îlots de taille moyenne est de  $46,3 \pm 11,4\%$  et enfin, les gros îlots représentent  $9,4 \pm 6,9\%$  des îlots totaux.

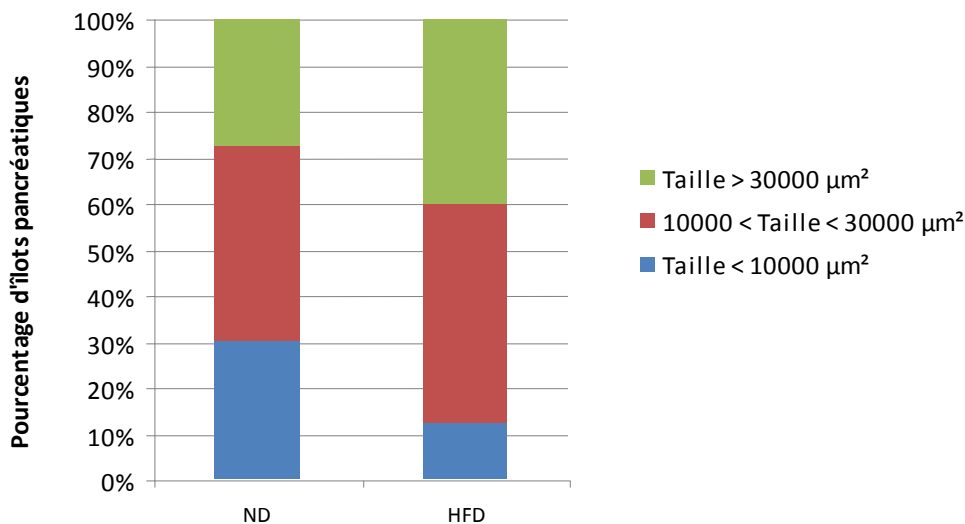


**Figure 95 : Mesure de la taille des îlots de Langerhans, après deux mois de régime ND ou HFD.**

Les proportions de taille des îlots ont été estimées sur un nombre total d'îlots observés sur une même section de pancréas et rapportées à 100%.

NS ; Petit, moyen et gros îlots de rats ND (n=3) versus rats HFD (n=4), t-test.

Lorsque les rats sont soumis au régime HFD pendant 7 mois, le nombre de gros îlots du pancréas augmente ( $39,9 \pm 8,1\%$ ) alors que celui des petits îlots diminue ( $12,6 \pm 9,1\%$ ), par rapport aux rats nourris au régime ND (gros :  $28,7 \pm 8,1\%$  ; petits :  $29,9 \pm 17,5\%$ ). Cependant, ces variations ne sont pas significatives compte tenu des écarts-types obtenus (cf. figure 96). Le nombre d'îlots de taille moyenne des rats ND ( $41,4 \pm 25,1\%$ ) est similaire à celui des rats HFD ( $47,4 \pm 15,5\%$ ).



**Figure 96 : Mesure de la surface des îlots de Langerhans, après sept mois de régime ND ou HFD.**

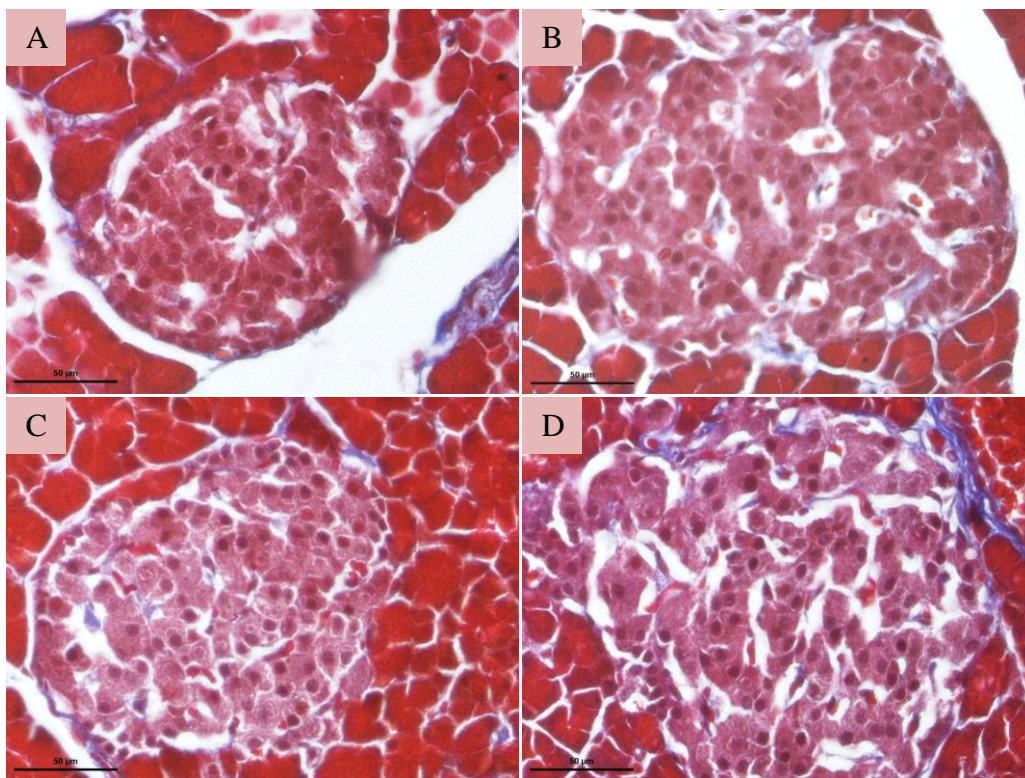
Les proportions de surface des îlots ont été estimées sur un nombre total d'îlots observés sur une même section de pancréas et rapportées à 100%.

NS ; Petit, moyen et gros îlots de rats ND (n=3) versus rats HFD (n=3), t-test.

Lorsque la proportion de surface des îlots de rats ND est comparée après 2 et 7 mois de régime aucune différence statistique n'est obtenue dans chacun des groupes. En revanche, chez les animaux HFD, après 7 mois de régime, est observée une diminution significative ( $p < 0,05$ ) du nombre d'îlots inférieurs à  $10\,000\mu\text{m}^2$  ( $12,6 \pm 9,1\%$ ) par rapport aux rats à 2 mois ( $44,3 \pm 11,1\%$ ). De plus, le nombre de gros îlots est, quant à lui, augmenté de façon significative ( $p < 0,01$ ) chez les animaux HFD après 7 mois d'alimentation ( $39,9 \pm 8,1\%$ ) par rapport aux rats soumis au régime seulement pendant 2 mois ( $9,4 \pm 6,9\%$ ). Les écarts-types des graphiques n'ont pas été représentés par soucis de clarté.

### c) Coloration au trichrome de Masson

Les coupes histologiques de pancréas de rats, qu'ils soient nourris par l'alimentation normocalorique ou hypercalorique pendant 2 et 7 mois ont également été colorées au trichrome de Masson (cf. figure 97).



**Figure 97 : Photographies de coupes histologiques de pancréas de rats après coloration au trichrome de Masson.**

Les animaux ont été nourris avec le régime normocalorique pendant deux mois (photos A) ou sept mois (photos C) ; ou avec le régime hypercalorique pendant 2 mois (photos B) ou sept mois (photos D).

Après deux mois de régime ND, les îlots pancréatiques des rats ont une forme ovoïde et sont de taille moyenne (cf. figure 97 A). Les animaux HFD alimentés pendant le même temps, quant à

eux, présentent également des îlots de forme arrondie mais de taille plus importante (cf. figure 97 B). Lorsque les rats sont soumis à un régime ND pendant 7 mois (cf. figure 97 C), les îlots adoptent une forme arrondie et présentent aussi des trous. Ces caractéristiques sont également retrouvées sur les îlots de rats ayant reçu l'alimentation HFD pendant cette même durée (cf. figure 97 D). De plus, que ce soit après 2 ou 7 mois de régime alimentaire HFD (cf. figure 97 B et D), les îlots semblent présenter une augmentation de taille par rapport aux îlots des rats nourris par le régime ND (cf. figure 97 A et C).

## 5. [Effet des traitements sur l'histologie du foie](#)

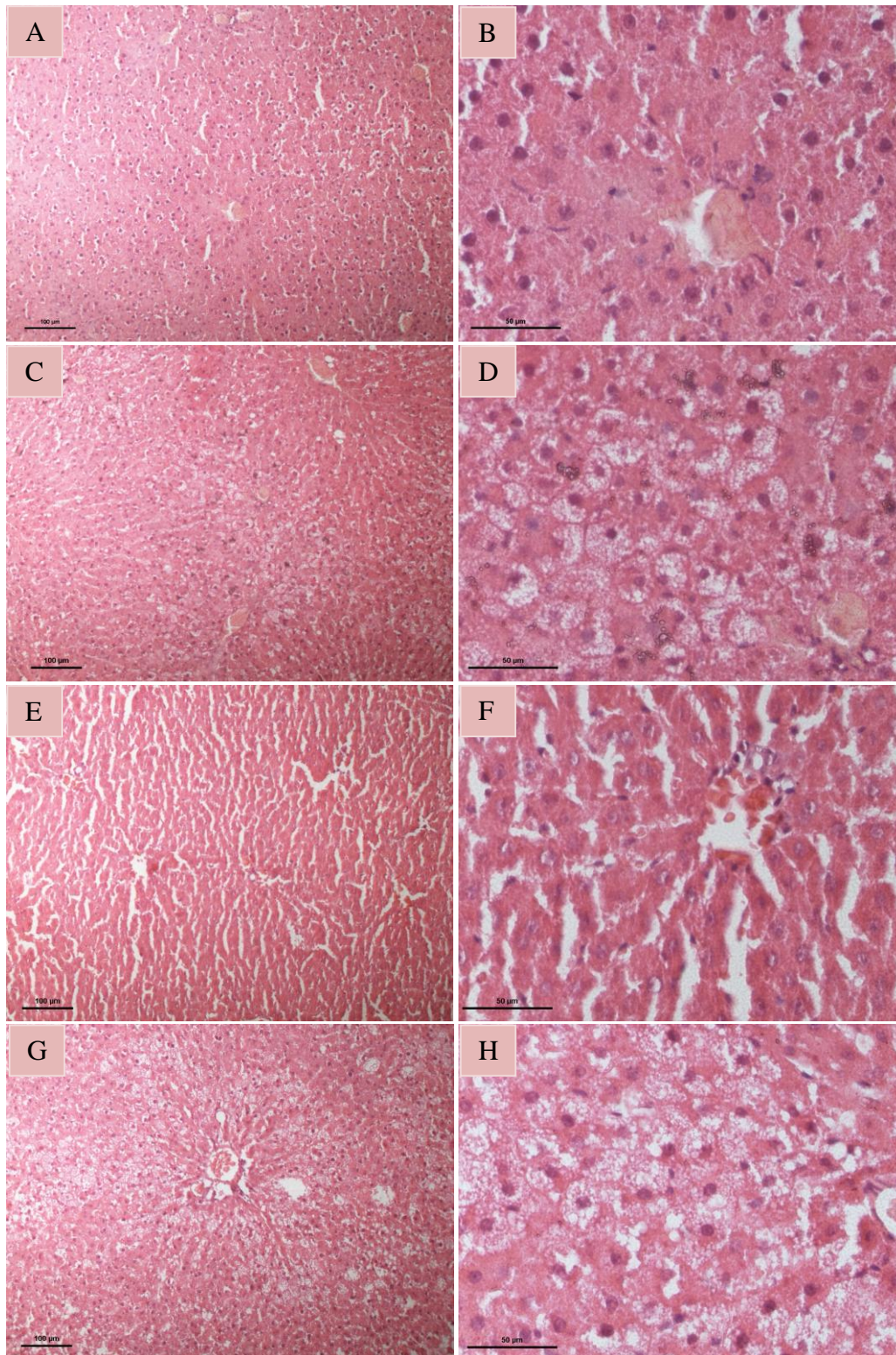
L'étude histologique du foie a été réalisée par les colorations HE et trichrome de Masson qui permettent dans ce cas présent d'évaluer respectivement la stéatose hépatique et l'apparition de phénomène de fibrose. Le degré de stéatose est évalué par le système de score décrit dans le chapitre II. B. 6. C de la partie matériels et méthodes (Méthode de Kleiner *et al.*).

### a) [Coloration Hématoxyline / Éosine](#)

Les coupes histologiques de foie de rats, ayant reçu l'alimentation ND ou HFD, ont été réalisées après 2 et 7 mois de régime alimentaire et colorées à l'hématoxyline / éosine.

Les résultats montrent que le tissu hépatique des rats ND après 2 mois (cf. figure 98 A et B) et 7 mois de régime (cf. figure 98 E et F) sont similaires : le cytoplasme des hépatocytes est rosé et homogène, le noyau bien défini et de couleur violette, et les hépatocytes s'organisent de façon radiale autour des veines centro-lobulaires du tissu. Le score pour ces coupes est alors de 0 puisqu'il n'y a pas de stéatose. En revanche, après 2 mois de régime HFD, les hépatocytes sont gonflés et présentent des vacuoles de gouttelettes lipidiques (cf. figure 98 C et D). Les noyaux sont moins visibles et parfois repoussés à la périphérie du cytoplasme. Ce sont les caractéristiques d'une stéatose hépatique qui est d'autant plus présente lorsque les rats sont soumis à 7 mois de régime HFD. Cette stéatose est supérieure à 66% que ce soit à 2 mois ou 7 mois de régime HFD, le score est donc de 3.





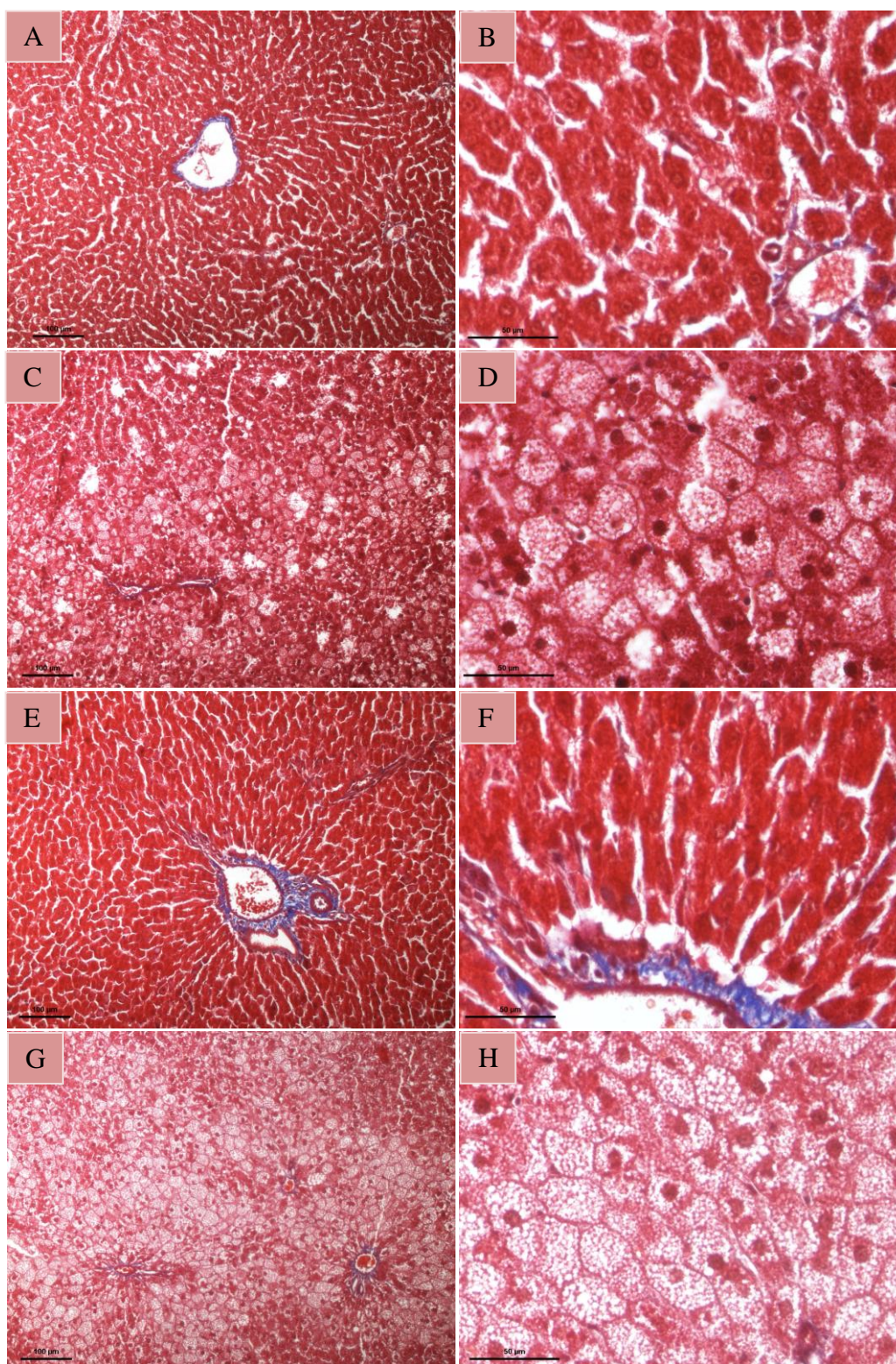
**Figure 98 :** Photographies de coupes histologiques de foie de rats après coloration HE.

Les animaux ont été nourris avec le régime normocalorique pendant deux mois (photos A et B) ou sept mois (photos E et F) ; ou avec le régime hypercalorique pendant 2 mois (photos C et D) ou sept mois (photos G et H).

#### b) Coloration au trichrome de Masson

Une coloration au trichrome de Masson a également été réalisée sur les coupes histologiques de foie, de rats soumis à une alimentation ND ou HFD (cf. figure 99).





**Figure 99 : Photographies de coupes histologiques de foie de rats après coloration au trichrome de Masson.**

Les animaux ont été nourris avec le régime normocalorique pendant deux mois (photos A et B) ou sept mois (photos E et F) ; ou avec le régime hypercalorique pendant 2 mois (photos C et D) ou sept mois (photos G et H).

Après 2 (cf. figure 99 A et B) et 7 mois de régime normocalorique (cf. figure 99 E et F), les hépatocytes sont colorés en rouge tandis que les fibres de collagène sont colorées en bleu.

Comme observé lors de la coloration HE du foie, les hépatocytes s'organisent de façon radiale autour des veines centro-lobulaires ou des espaces-portes. Cependant, après 2 mois de régime HFD, le foie des animaux présente également des vacuoles de lipides dans le cytoplasme qui est gonflé (cf. figure 99 C et D). La stéatose est présente dès deux mois de régime et est accentuée après 7 mois de régimes HFD (cf. figure 99 G et H).

Les scores de stéatose hépatique établis pour chacune de ces coupes sont de 0 pour les animaux soumis au régime ND à 2 et 7 mois, et de 3 (> 66% de stéatose présente dans le tissu) pour les animaux recevant l'alimentation HFD à 2 et 7 mois.

En dehors des espaces-portes ou des veines centro-lobulaires, il n'y a pas de développement de fibres de collagènes dans le tissu, ce qui traduit l'absence de fibrose hépatique.

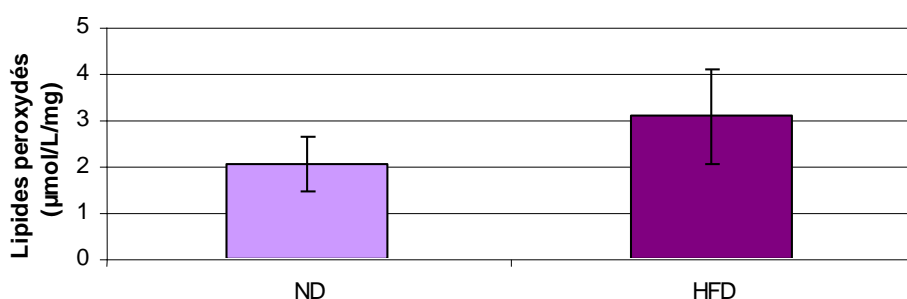
## B. Étude *in vivo* de l'effet des antioxydants

### 1. Étude du stress oxydant

#### a) Dosage des lipides peroxydés par la méthode TBARS

Avant que les animaux ne reçoivent leur régime alimentaire respectif (ND ou HFD), le taux de lipides peroxydés a été mesuré par la technique du TBARS. Les résultats initiaux indiquent que les rats présentent un taux de lipides peroxydés de  $4,01 \pm 1,15 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines.

Après 2 mois de traitement, les rats nourris par l'alimentation HFD présentent un taux de lipides peroxydés de  $3,1 \pm 0,1 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines contre  $2,0 \pm 0,6 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines pour les rats ND (cf. figure 100). De plus, le taux de lipides peroxydés est diminué de façon significative ( $p < 0,05$ ) entre les rats à leur arrivée et après deux mois d'alimentation ND.



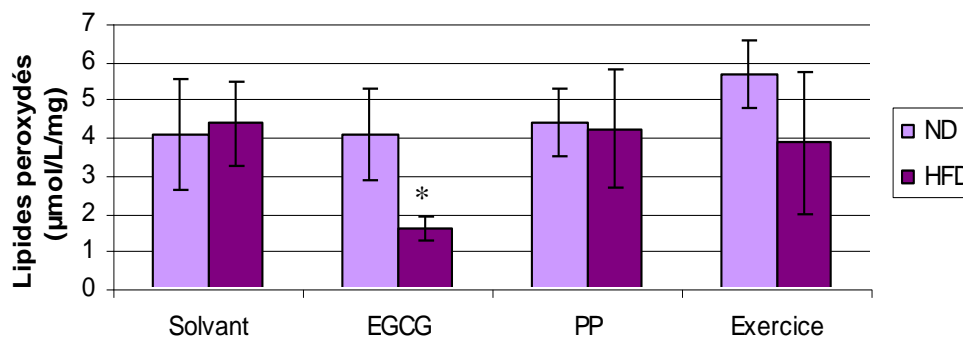
**Figure 100** : Taux de lipides peroxydés plasmatique en  $\mu\text{mol/L/mg}$  de protéines chez les rat ND et HFD après 2 mois de régime alimentaire, mesuré par la technique TBARS.

NS ; Triglycéridémie ND (n=4) versus triglycéridémie HFD (n=3), t-test.

Lorsque les rats sont soumis à trois mois de régime alimentaire, ceux recevant l'alimentation hypercalorique et le solvant ont un taux de lipides peroxydés ( $4,4 \pm 1,1 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines) similaire à celui des rats ND solvant ( $4,1 \pm 1,5 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines) ; (cf. figure 101). Les



traitements par l'EGCG et les PP pendant un mois ne modifient pas le taux de lipides peroxydés chez les animaux ND, car ceux-ci sont respectivement de  $4,6 \pm 1,2 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines et de  $4,4 \pm 0,9 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines, par rapport aux rats ND solvant ( $4,1 \pm 1,5 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines). En revanche, l'exercice semble augmenter le taux de lipides peroxydés à  $5,7 \pm 0,9 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines par rapport aux rats ND solvant. Chez le groupe de rats nourris avec l'alimentation HFD, les PP et l'exercice, le taux de peroxydation lipidique est similaire à celui du témoin HFD solvant ( $4,2 \pm 1,5 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines,  $3,9 \pm 1,9 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines et  $4,4 \pm 1,1 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines, respectivement). Seul l'EGCG diminue de façon significative ( $p < 0,05$ ) le taux de lipides peroxydés à  $1,6 \pm 0,3 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines.



**Figure 101** : Taux de lipides peroxydés plasmatique en  $\mu\text{mol/L/mg}$  de protéines chez les rat ND et HFD après 3 mois de régime alimentaire et 1 mois de traitement antioxydant ou d'exercice, mesuré par la technique TBARS.

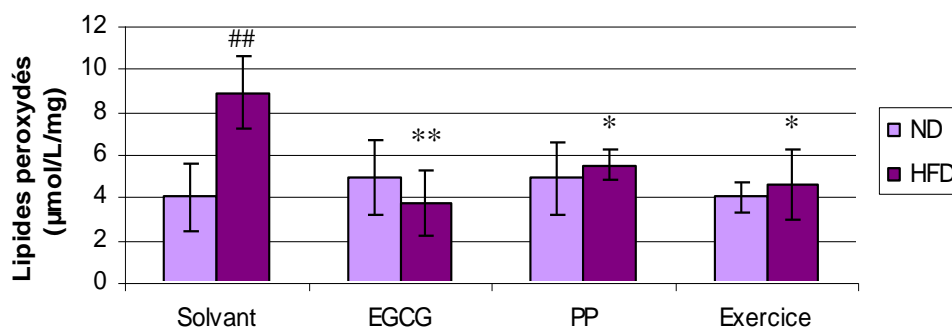
NS ; Lipides peroxydés ND solvant (n=4) versus lipides peroxydés HFD solvant (n=4), t-test.

NS ; Lipides peroxydés ND solvant (n=4) versus lipides peroxydés ND EGCG (n=5) / PP (n=4) / Exercice (n=4), t-test.

\* :  $p < 0,05$  ; Lipides peroxydés HFD solvant (n=4) versus lipides peroxydés HFD EGCG (n=3) / PP (n=4) /exercice (n=5), t-test.

Après 4 mois de régime hypercalorique, les rats présentent un taux de lipides peroxydés significativement augmenté ( $p < 0,01$ ) à  $8,9 \pm 1,7 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines par rapport aux rats ND solvant ( $4,0 \pm 1,6 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines) ; (cf. figure102). Les rats ND présentent un taux similaire de lipides peroxydés quel que soit le traitement utilisé pendant 2 mois (solvant :  $4,0 \pm 1,6 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines ; EGCG :  $4,9 \pm 1,8 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines ; PP :  $4,9 \pm 1,7 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines ; exercice :  $4,0 \pm 0,7 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines). En revanche, chez les animaux HFD, les trois traitements permettent de diminuer de façon significative le taux de lipides peroxydés par rapport aux rats HFD solvant ( $8,9 \pm 1,7 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines). En effet, le taux est de  $3,7 \pm 1,6 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines pour l'EGCG ( $p < 0,01$ ), de  $5,5 \pm 0,7 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines pour les PP ( $p < 0,05$ ) et de  $4,6 \pm 1,6 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines pour l'exercice ( $p < 0,05$ ).





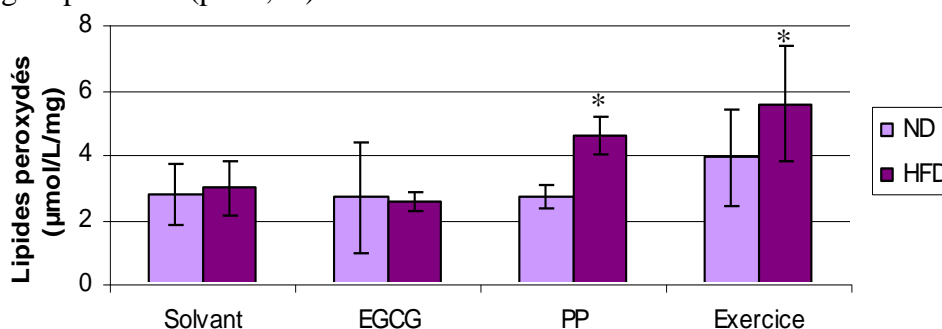
**Figure 102 : Taux de lipides peroxydés plasmatique en  $\mu\text{mol/L/mg}$  de protéines chez les rat ND et HFD après 4 mois de régime alimentaire et 2 mois de traitement antioxydant ou d'exercice, mesuré par la technique TBARS.**

## :  $p < 0,01$  ; Lipides peroxydés ND solvant versus lipides peroxydés HFD solvant, (n=4), t-test.

NS ; Lipides peroxydés ND solvant versus lipides peroxydés ND EGCG / PP / exercice, (n=4), t-test.

\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; Lipides peroxydés HFD solvant versus lipides peroxydés HFD EGCG / PP / exercice, (n=4), t-test.

Enfin, après 5 mois de régime alimentaire, il n'y a pas de différence de concentration en lipides peroxydés entre les rats ND solvant ( $2,8 \pm 0,9 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines) et HFD solvant ( $3,0 \pm 0,9 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines) ; (cf. figure 103). Chez les rats ND soumis pendant 3 mois aux traitements antioxydants ou à l'exercice physique, le taux de lipides oxydés obtenus est similaire pour les rats recevant l'EGCG ( $2,7 \pm 1,7 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines), les PP ( $2,7 \pm 0,4 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines) et l'exercice ( $3,9 \pm 1,5 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines) à celui des rats ND solvant ( $2,8 \pm 0,9 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines). Les rats HFD traités par l'EGCG ( $2,6 \pm 0,3 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines) ont également un taux de lipides peroxydés similaire à celui des rats HFD solvant. En revanche, les rats HFD traités par les PP ou faisant de l'exercice ont des taux de lipides peroxydés significativement augmentés, respectivement à  $4,6 \pm 0,6 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines et à  $5,6 \pm 1,8 \mu\text{mol/L/mg}$  de protéines ( $p < 0,05$ ).



**Figure 103 : Taux de lipides peroxydés plasmatique en  $\mu\text{mol/L/mg}$  de protéines chez les rat ND et HFD après 5 mois de régime alimentaire et 3 mois de traitement antioxydant ou d'exercice, mesuré par la technique TBARS.**

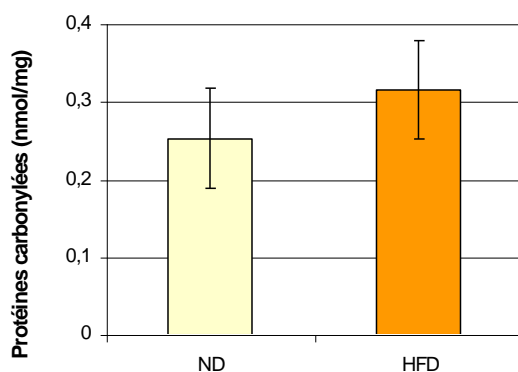
NS ; Lipides peroxydés ND solvant (n=5) versus lipides peroxydés HFD solvant, (n=4), t-test.

NS ; Lipides peroxydés ND solvant (n=5) versus lipides peroxydés ND EGCG (n=4) / PP (n=4) / exercice (n=5), t-test.

\* :  $p < 0,05$  ; Lipides peroxydés HFD solvant versus lipides peroxydés HFD EGCG / PP / exercice, (n=4), t-test.

## b) Effet des traitements sur la carbonylation des protéines

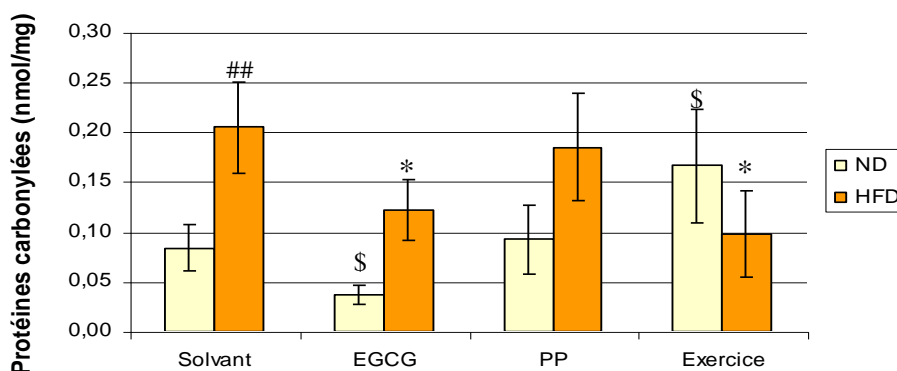
Le taux de protéines carbonylées, dans le plasma des rats avant l'introduction des régimes alimentaires, a été mesuré et les résultats indiquent une concentration plasmatique en protéines carbonylées de  $0,36 \pm 0,12$  nmol/mg de protéines. Après deux mois de régime alimentaire, les animaux recevant l'alimentation HFD présentent une concentration plasmatique en protéines carbonylées qui semble augmentée par rapport aux rats ND ( $0,32 \pm 0,06$  nmol/mg de protéines et  $0,25 \pm 0,06$  nmol/mg de protéines, respectivement) ; (cf. figure 104).



**Figure 104** : Taux de protéines carbonylées en nmol/mg de protéines totales, dans le plasma de rats soumis pendant 2 mois aux régimes ND ou HFD.

NS ; Protéines carbonylées ND versus protéines carbonylées HFD, (n=4), t-test.

Lorsque les animaux sont soumis durant trois mois au régime alimentaire, les rats HFD recevant le solvant présentent un taux de carbonylation des protéines augmenté de façon significative à  $0,205 \pm 0,045$  nmol/mg de protéines par rapport aux rats ND ( $0,084 \pm 0,024$  nmol/mg de protéines ;  $p < 0,05$ ) ; (cf. figure 105).



**Figure 105** : Taux de protéines carbonylées en nmol/mg de protéines totales, dans le plasma de rats soumis pendant 3 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 1 mois aux antioxydants ou à l'exercice.

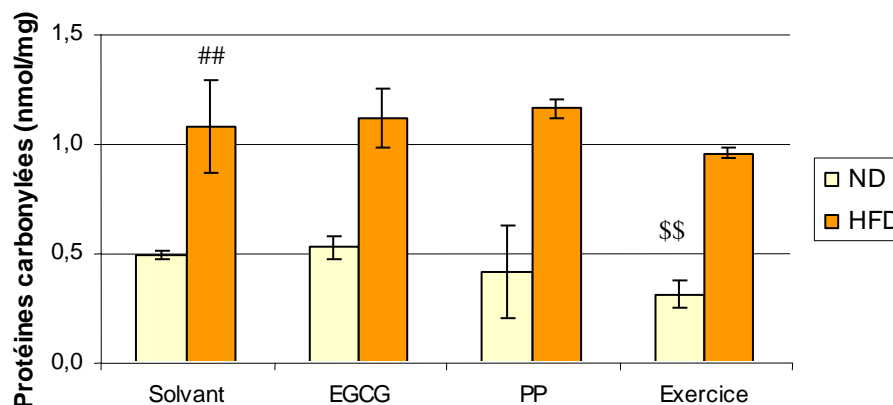
## :  $p < 0,01$  ; Protéines carbonylées ND (n=4) versus protéines carbonylées HFD (n=3), t-test.

\$ :  $p < 0,05$  ; Protéines carbonylées ND solvant (n=4) vs protéines carbonylées ND EGCG / PP / exercice (n=3), t-test.

\* :  $p < 0,05$  ; Protéines carbonylées HFD solvant vs protéines carbonylées HFD EGCG / PP / exercice, (n=3), t-test.

Chez les rats ND, un traitement par l'EGCG pendant un mois, induit une diminution significative ( $p < 0,05$ ) de la carbonylation des protéines à  $0,037 \pm 0,010$ nmol/mg de protéines par rapport aux rats ND solvant, tandis que les PP ne modifient pas ce taux ( $0,093 \pm 0,034$ nmol/mg de protéines). Enfin, la pratique d'une activité physique induit, quant à elle, une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de ce taux de protéines carbonylées à  $0,167 \pm 0,057$ nmol/mg de protéines. Dans le cas des rats HFD, ceux qui reçoivent les PP pendant un mois, ont un taux de protéines carbonylées qui reste similaire ( $0,185 \pm 0,054$ nmol/mg de protéines) à celui des rats HFD solvant. En revanche, ceux qui sont traités par l'EGCG ont une diminution significative ( $p < 0,05$ ) de leur taux à  $0,123 \pm 0,031$ nmol/mg de protéines tout comme les rats pratiquant une activité physique où le taux de protéines n'est plus que de  $0,098 \pm 0,044$ nmol/mg de protéines.

En ce qui concerne les rats nourris pendant 4 mois avec ces régimes, les rats HFD ayant reçu le solvant pendant 2 mois, présentent une augmentation significative ( $p < 0,01$ ) du taux de protéines carbonylées plasmatiques ( $1,08 \pm 0,21$ nmol/mg de protéines) par rapport aux rats ND solvant dont le taux n'est que de  $0,49 \pm 0,02$ nmol/mg de protéines (cf. figure 106).



**Figure 106** : Taux de protéines carbonylées en nmol/mg de protéines totales, dans le plasma de rats soumis pendant 4 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 2 mois aux antioxydants ou à l'exercice.

## :  $p < 0,01$  ; Protéines carbonylées ND versus protéines carbonylées HFD, (n=3), t-test.

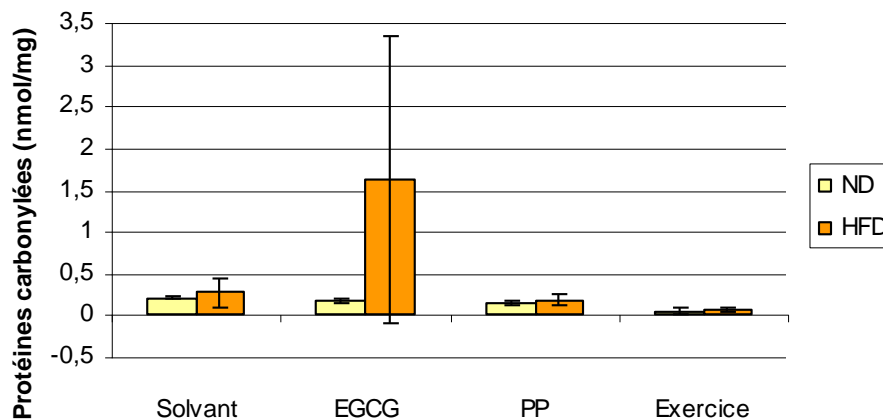
\$ :  $p < 0,05$  ; Protéines carbonylées ND solvant (n=3) versus protéines carbonylées ND EGCG (n=4) / PP (n=5) / exercice (n=3), t-test.

NS ; Protéines carbonylées HFD solvant versus protéines carbonylées HFD EGCG / PP / exercice, (n=3), t-test.

Les traitements des rats ND par les antioxydants EGCG ( $0,52 \pm 0,06$ nmol/mg de protéines) et PP ( $0,41 \pm 0,21$ nmol/mg de protéines) ne modifient pas le taux de protéines carbonylées par rapport aux taux des rats ND solvant. En revanche, l'exercice diminue de façon significative ( $P < 0,01$ ) ce taux ( $0,31 \pm 0,06$ nmol/mg de protéines) par rapport aux rats ND solvant. Concernant les animaux HFD, qu'ils soient traités par les antioxydants ou qu'ils fassent de l'exercice, ils ne présentent pas

de modifications du taux de protéines carbonylées par rapport aux rats HFD solvant (EGCG :  $1,12 \pm 0,13$ nmol/mg de protéines ; PP :  $1,16 \pm 0,04$ nmol/mg de protéines ; exercice :  $0,96 \pm 0,02$ nmol/mg de protéines).

A la fin de l'étude, lorsque les animaux ont été soumis à 5 mois de régime alimentaire, les rats HFD recevant le solvant présentent un taux de protéines carbonylées ( $0,27 \pm 0,18$ nmol/mg de protéines) similaire à celui des rats ND solvant ( $0,20 \pm 0,01$ nmol/mg de protéines) ; (cf. figure 107).



**Figure 107** : Taux de protéines carbonylées en nmol/mg de protéines totales, dans le plasma de rats soumis pendant 5 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 3 mois aux antioxydants ou à l'exercice.

NS ; Protéines carbonylées ND versus protéines carbonylées HFD, (n=3), t-test.

\$ :  $p < 0,05$  ; \$\$ :  $p < 0,01$  ; Protéines carbonylées ND solvant (n=3) versus protéines carbonylées ND EGCG (n=4) / PP (n=4) / exercice (n=3), t-test.

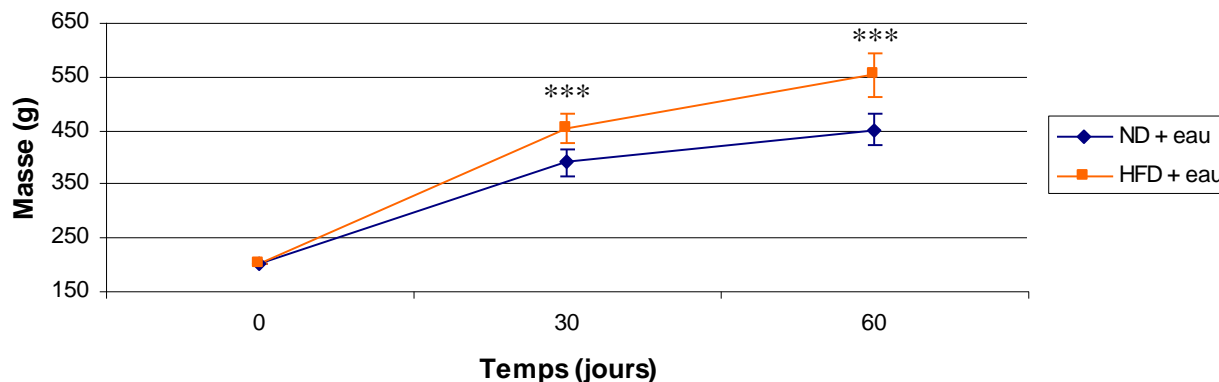
NS ; Protéines carbonylées HFD solvant (n=3) versus protéines carbonylées HFD EGCG (n=3) / PP (n=5) / exercice, (n=3), t-test.

Le traitement chez les rats ND par de l'EGCG ne modifie pas le taux de protéines carbonylées de ce groupe ( $0,16 \pm 0,03$ nmol/mg de protéines) par rapport aux rats ND solvant ( $0,20 \pm 0,01$ nmol/mg de protéines). En revanche, les PP et l'exercice permettent de diminuer de façon significative la quantité de protéines carbonylées par rapport aux rats ND solvant. En effet, les PP abaissent le taux de protéines carbonylées à  $0,14 \pm 0,03$ nmol/mg de protéines ( $p < 0,05$ ) et l'exercice à  $0,05 \pm 0,04$ nmol/mg de protéines ( $p < 0,01$ ). Dans le cas des rats HFD, un traitement par PP ou par l'exercice semble diminuer la quantité de protéines carbonylées (PP :  $0,18 \pm 0,06$ nmol/mg de protéines ; exercice :  $0,06 \pm 0,02$ nmol/mg de protéines) par rapport aux rats HFD solvant. Au contraire, le traitement des rats HFD par l'EGCG semble augmenter le taux de protéines carbonylées ( $1,62 \pm 1,72$ nmol/mg de protéines) par rapport aux rats HFD solvant.

## 2. Étude métabolique

### a) Masse des animaux

Les animaux des groupes ND et HFD ont été pesés après un et deux mois de régime alimentaire (cf. figure 108).



**Figure 108** : Graphique présentant la masse moyenne en grammes des rats nourris par l'alimentation ND ou HFD pendant deux mois.

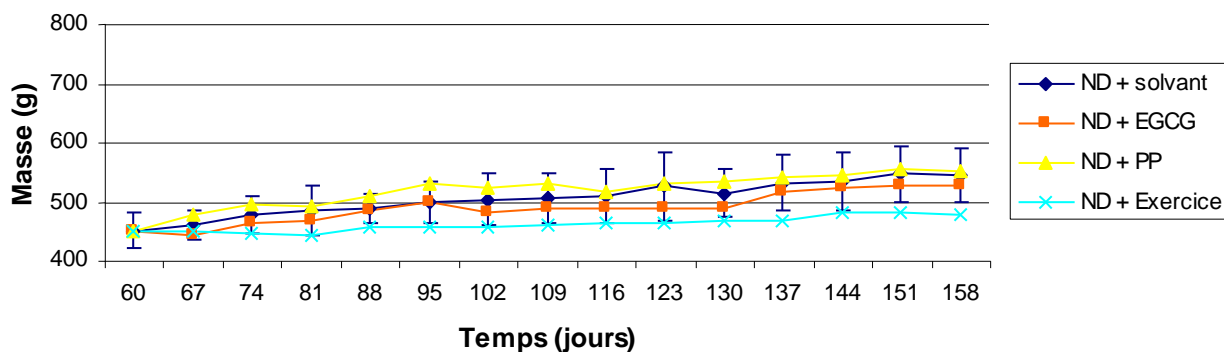
\*\*\* :  $p < 0,001$  ; Masse des animaux ND versus HFD de 0 à 120 jours, t-test.

(30 jours :  $n=59$  animaux ND et  $n=46$  animaux HFD ; 60 jours :  $n=68$  animaux ND et  $n=51$  animaux HFD).

Les résultats obtenus montrent qu'après un mois de régime HFD, on observe une augmentation de masse significative ( $p < 0,001$ ) par rapport aux rats nourris par l'alimentation ND. En effet, après un mois, les rats HFD pèsent  $452,2 \pm 27,0\text{g}$  tandis que les rats ND ne pèsent que  $389,1 \pm 26,1\text{g}$ . Cette différence de masse corporelle est maintenue entre les deux groupes, après 2 mois de régime, les rats HFD ayant toujours une masse corporelle significativement augmentée par rapport aux rats ND ( $552,6 \pm 40,7\text{g}$  versus  $450,2 \pm 30,0\text{g}$  ;  $p < 0,001$ ).

A partir de deux mois de régime, les traitements (solvant, EGCG, PP, exercice) sont mis en place dans les deux groupes (ND et HFD). La masse des animaux est suivie jusqu'à 158 jours (5 mois et 3 semaines).

Les rats ayant reçu l'alimentation ND ont une masse comprise entre  $450,2 \pm 30,0\text{g}$  au début de l'étude et  $543,7 \pm 47,1\text{g}$  à la fin de l'étude (cf. figure 109). Les rats traités par l'EGCG, présentent une courbe de masse similaire mais inférieure à celle des rats ND solvant, avec des masses comprises entre  $443,6 \pm 32,6\text{g}$  (début de l'étude) et  $527,5 \pm 28,2\text{g}$  (fin de l'étude). Au contraire, les rats ND + PP présentent une prise de poids supérieure à celle des ND solvant, avec des masses comprises entre  $477,2 \pm 37,1\text{g}$  à 60 jours et  $551,3 \pm 53,8\text{g}$  à 158 jours. Cette prise de masse n'est pas significative, exceptée au 95<sup>ème</sup> jour d'étude, où la masse des rats ND + PP est de  $530,2 \pm 43,6\text{g}$  ( $p < 0,05$ ) alors que celle des rats ND solvant n'est que de  $498,8 \pm 34,8\text{g}$  (cf. figure 110).



**Figure 109** : Graphique présentant la masse moyenne en grammes des rats nourris par l'alimentation normocalorique (ND) entre deux et 5 mois de traitement antioxydant ou d'exercice physique.

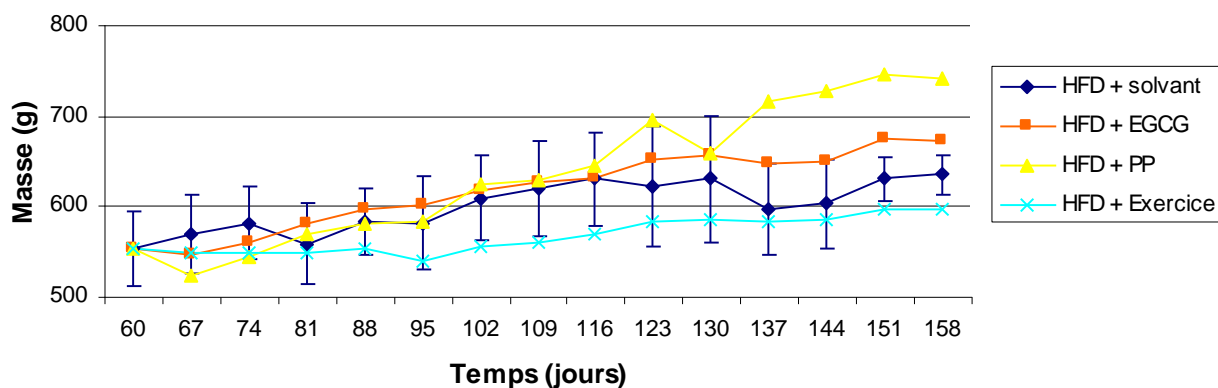
\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; Masse des animaux ND EGCG/PP/Exercice versus ND solvant de 120 à 218 jours, t-test.  
(Les nombres d'animaux utilisés pour les tests statistiques figurent dans le tableau, figure 110).

Lorsque les ND pratiquent une activité physique, la prise de masse au cours de l'étude est faible. En effet, les rats pèsent  $449,5 \pm 36,4g$  à 60 jours et  $476,2 \pm 55,8g$  après 158 jours. Cette différence de masse par rapport aux rats ND solvant devient significative à partir du 74<sup>ème</sup> jour d'étude ( $p < 0,05$ ) et se maintient jusqu'au 130<sup>ème</sup> jour ( $p < 0,05$ ). Au-delà, la perte de significativité est liée à la réduction du nombre d'animaux (cf. figure 110).

Temps (jours)	67	74	81	88	95	102	109	116	123	130	137	144	151	158
n ND (solvant)	13	14	15	13	14	9	9	9	10	9	5	5	3	3
n ND (EGCG)	14	13	14	15	15	9	9	9	9	9	4	4	4	4
n ND (PP)	14	15	14	14	14	9	10	9	9	9	4	4	4	4
n ND (Exercice)	14	13	14	15	15	10	10	10	10	10	5	5	5	5
EGCG vs solvant	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PP vs solvant	NS	NS	NS	NS	$p < 0,05$	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Exercice vs solvant	NS	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	NS	NS	NS	NS

**Figure 110** : Tableau présentant les résultats du t-test pour chacun des groupes ND versus ND solvant, avec le nombre n d'animaux de chacun des groupes, entre 67 et 158 jours d'étude.

Les rats nourris par l'alimentation hypercalorique HFD et recevant le solvant prennent du poids au cours de l'étude puisqu'ils pèsent  $552,7 \pm 40,6g$  au 60<sup>ème</sup> jour et  $634,0 \pm 22,5g$  au 158<sup>ème</sup> jour de l'étude (cf. figure 111).



**Figure 111** : Graphique présentant la masse moyenne en grammes des rats nourris par l'alimentation hypercalorique (HFD) entre deux et 5 mois de traitement antioxydant ou d'exercice physique.

\* :  $p < 0,05$  ; Masse des animaux HFD EGCG/PP/Exercice versus HFD solvant de 60 à 158 jours, t-test.

(Les nombres d'animaux utilisés pour les tests statistiques figurent dans le tableau ci-dessous).

Les rats HFD nourris avec de l'EGCG ont une prise de masse supérieure à celle des HFD solvant puisqu'ils ont une masse de  $545,2 \pm 42,7g$  et de  $672,6 \pm 49,8g$ , respectivement au début et à la fin de l'étude. Bien que la masse de ce groupe soit plus importante tout au long de l'étude, elle n'est cependant pas significative (cf. figure 112). En revanche, les rats recevant les PP de vin rouge dans l'eau boisson, présentent une semaine après traitement, une masse significative inférieure ( $522,0 \pm 52,1g$  ;  $p < 0,05$ ) à celle des rats HFD solvant ( $568,1 \pm 43,2g$ ). A partir du 123<sup>ème</sup> jour, ils prennent du poids de façon significative ( $p < 0,05$ ) par rapport aux rats HFD solvant (cf. figure 112). Cette significativité est retrouvée au 137<sup>ème</sup> et 144<sup>ème</sup> jour d'étude mais pas au 151<sup>ème</sup> et 158<sup>ème</sup> jour, dû au nombre réduit d'animaux à la fin de l'étude.

Temps (jours)	67	74	81	88	95	102	109	116	123	130	137	144	151	158
n HFD (solvant)	13	13	15	14	15	10	9	9	10	10	5	5	3	3
n HFD (EGCG)	14	13	14	15	10	10	10	9	7	10	5	5	5	5
n HFD (PP)	14	14	13	14	14	10	10	10	9	10	5	5	5	5
n HFD (Exercice)	14	14	12	15	10	9	9	8	10	10	5	4	4	4
EGCG vs solvant	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PP vs solvant	$p < 0,05$	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	$p < 0,05$	NS	$p < 0,05$	$p < 0,05$	NS	NS
Exercice vs solvant	NS	$p < 0,05$	NS	NS	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	NS	NS	NS	NS	NS	NS

**Figure 112** : Tableau présentant les résultats du t-test pour chacun des groupes HFD versus HFD solvant, avec le nombre n d'animaux de chacun des groupes, entre 67 et 158 jours d'étude.



Enfin, concernant les rats HFD pratiquant une activité physique, la masse se stabilise au cours de l'étude, puisqu'ils pèsent  $547,4 \pm 37,7\text{g}$  au début de l'étude et  $597,0 \pm 31,7\text{g}$  à la fin. La masse des animaux pratiquant un exercice est significativement diminuée par rapport aux animaux recevant le solvant, entre le 95<sup>ème</sup> et le 116<sup>ème</sup> jour de l'étude ( $p < 0,05$ ) ; (cf. figure 112).

Lorsque les masses des rats ND solvant et HFD solvant sont comparées au cours de l'étude, une augmentation significative de la masse des animaux HFD solvant est observée par rapport aux rats ND solvant. En effet, au début de l'étude (67<sup>ème</sup> jour), la masse des rats HFD est augmentée de façon significative ( $p < 0,001$ ) à  $568,1 \pm 43,2\text{g}$  alors que les rats ND solvant ne pèsent que  $459,4 \pm 24,4\text{g}$ . Cette significativité est maintenue jusqu'au 130<sup>ème</sup> jour d'étude, après, la réduction de significativité est liée à une réduction du nombre d'animaux, hormis au 158<sup>ème</sup> jour où la différence de masse entre les deux groupes est significative ( $p < 0,05$ ) ; (cf. figure 113).

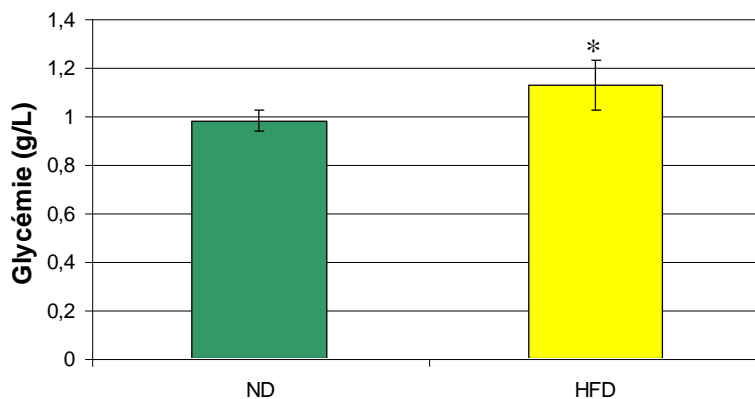
Temps (jours)	67	74	81	88	95	102	109	116	123	130	137	144	151	158
n (ND)	13	14	15	13	14	9	9	9	10	9	5	5	3	3
n (HFD)	13	13	15	14	15	10	9	9	10	10	5	5	3	3
ND vs HFD	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	NS	NS	NS	$p < 0,05$

**Figure 113** : Résultats du t-test entre les groupes ND solvant versus HFD solvant, avec le nombre n d'animaux de chacun des groupes, entre 67 et 158 jours d'étude.

### b) Glycémie plasmatique

Avant l'administration des régimes alimentaires ND ou HFD, la glycémie plasmatique des rats a été mesurée dès leur arrivée. Celle-ci est de  $1,02 \pm 0,08\text{g/L}$ .

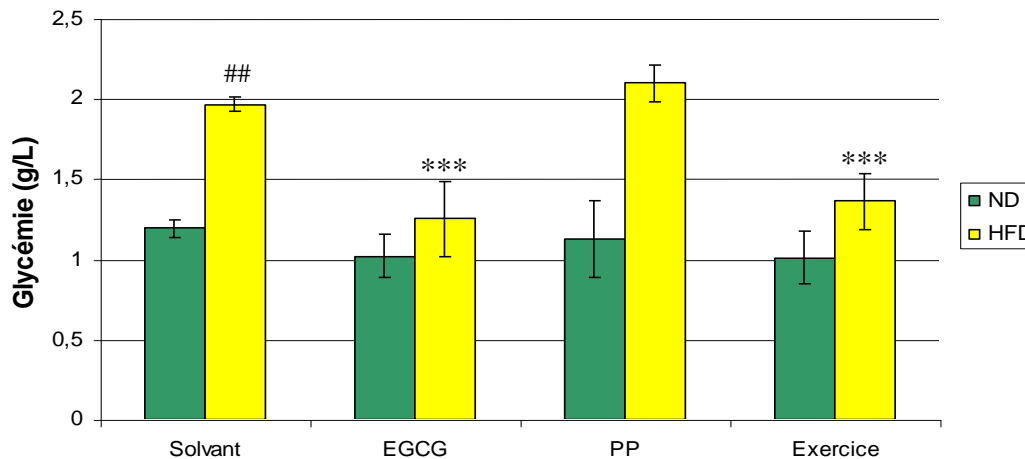
Lorsque les animaux reçoivent l'alimentation HFD pendant 2 mois, la glycémie de ces rats est augmentée significativement à  $1,13 \pm 0,1\text{g/L}$  ( $p < 0,05$ ) par rapport aux rats ND ( $0,98 \pm 0,05\text{g/L}$ ) ; (cf. figure 114).



**Figure 114** : Glycémie des rats en g/L après 2 mois de régime ND ou HFD.

\* :  $p < 0,05$  ; Glycémie ND versus glycémie HFD, (n=5), t-test.

Lorsque les rats sont soumis à un régime alimentaire pendant 4 mois (ND ou HFD), et reçoivent leur traitement pendant 2 mois, des différences dans la glycémie sont observés (cf. figure 115). En effet, les rats HFD solvant présentent une glycémie significativement augmentée à  $1,97 \pm 0,25$ g/L par rapport aux rats ND ( $1,19 \pm 0,24$ g/L ;  $p < 0,01$ ).



**Figure 115** : Glycémie plasmatique en g/L de rats soumis à un régime ND ou HFD pendant 4 mois, et pendant 2 mois aux antioxydant et à l'exercice.

## :  $p < 0,01$  ; Glycémie ND solvant versus glycémie HFD solvant, (n=5), t-test.

NS ; Glycémie ND solvant versus glycémie ND EGCG / PP / Exercice, (n=5), t-test.

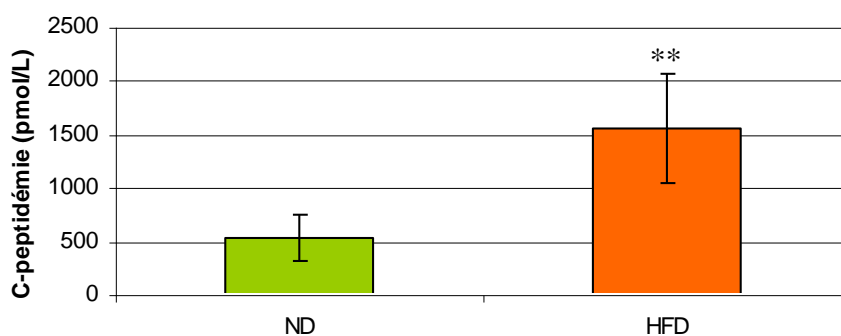
\*\*\* :  $p < 0,001$  ; Glycémie HFD solvant versus glycémie HFD EGCG / PP / exercice, (n=5), t-test.

Les rats nourris par l'alimentation ND quel que soit le traitement qu'ils reçoivent pendant 2 mois, ne présentent pas de modification de leur glycémie par rapport aux rats ND solvant (Solvant :  $1,19 \pm 0,24$ g/L ; EGCG :  $1,02 \pm 0,09$ g/L ; PP :  $1,13 \pm 0,18$ g/L et exercice :  $1,01 \pm 0,12$ g/L). En revanche, les animaux HFD traités par l'EGCG ou pratiquant une activité physique ont une glycémie qui est diminuée significativement ( $1,25 \pm 0,18$ g/L et  $1,36 \pm 0,07$ g/L, respectivement) par rapport aux rats HFD solvant ( $p < 0,001$ ). Le traitement par les PP n'induit pas de modification de la glycémie ( $2,10 \pm 0,61$ g/L) par rapport aux rats HFD solvant.

### c) C-peptidémie

Au début de l'étude, avant l'administration des régimes, la C-peptidémie moyenne des animaux est de  $446,5 \pm 60,8$ pmol/L.

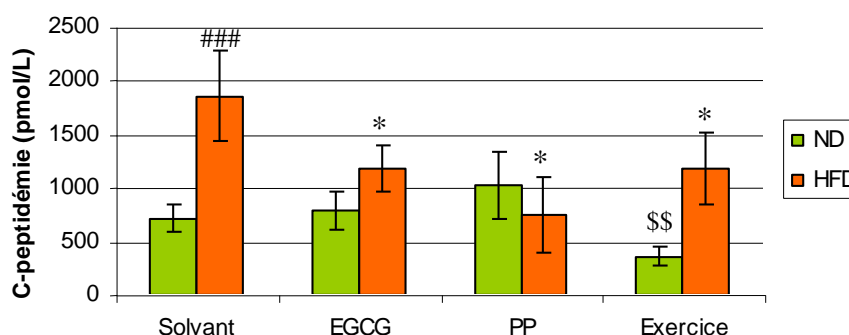
Lorsque les animaux sont soumis à un régime ND pendant 2 mois, la C-peptidémie est de  $532,2 \pm 207,9$ pmol/L. En revanche, ceux nourris par l'alimentation HFD, pendant la même durée, présentent une C-peptidémie augmentée de façon significative ( $p < 0,01$ ) à  $1551,9 \pm 511,7$ pmol/L par rapport aux rats ND (cf. figure 116).



**Figure 116 : Taux de C-peptide plasmatique en pmol/L chez les rats ND et HFD après 2 mois de régime alimentaire.**

\*\* :  $p < 0,01$  ; C-peptidémie ND (n=5) versus C-peptidémie HFD (n=4), t-test.

Après 3 mois de régime alimentaire, les animaux nourris par l'alimentation HFD ne recevant que le solvant, présentent une C-peptidémie augmentée de façon significative ( $1855,0 \pm 419,4$  pmol/L ;  $p < 0,001$ ) par rapport aux rats ND recevant également le solvant ( $711,5 \pm 128,1$  pmol/L) ; (cf. figure 117). Les rats nourris par l'alimentation ND, qu'ils soient traités par l'EGCG ou par les PP, ne présentent pas de différences significatives de la C-peptidémie (EGCG :  $787,5 \pm 71,3$  pmol/L ; PP :  $1027,0 \pm 317,2$  pmol/L) par rapport aux rats ND solvant ( $711,5 \pm 128,1$  pmol/L). En revanche, les rats ND pratiquant un exercice physique ont une C-peptidémie significativement diminuée à  $362,5 \pm 83,7$  pmol/L ( $p < 0,01$ ). Les traitements à l'EGCG, aux PP ou l'activité physique induisent, chez des rats HFD, une baisse significative de la C-peptidémie par rapport au rats HFD solvant. En effet, les rats HFD solvant ont une C-peptidémie de  $1855,0 \pm 419,4$  pmol/L, alors qu'elle n'est que de  $1183,8 \pm 210,4$  pmol/L ( $p < 0,05$ ) pour les rats traités par l'EGCG, de  $747,0 \pm 347,7$  pmol/L ( $p < 0,05$ ) pour ceux recevant les PP et que de  $1181,3 \pm 329,9$  pmol/L ( $p < 0,05$ ) pour les animaux pratiquant une activité physique (cf. figure 117).



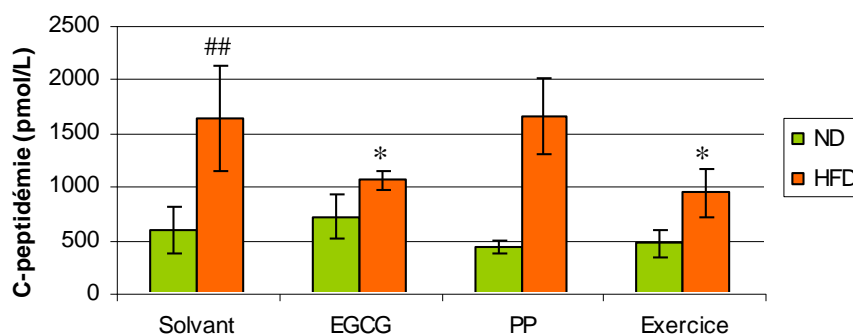
**Figure 117 : Taux de C-peptide plasmatique en pmol/L chez les rats soumis pendant 3 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 1 mois aux antioxydants ou à l'exercice.**

### :  $p < 0,001$  ; C-peptidémie ND solvant (n=5) versus C-peptidémie HFD solvant (n=5), t-test.

\$\$ :  $p < 0,01$  ; C-peptidémie ND solvant (n=5) versus C-peptidémie ND EGCG (n=5) / PP (n=5) / exercice (n=4), t-test.

\* :  $p < 0,05$  ; C-peptidémie HFD solvant (n=5) vs C-peptidémie HFD EGCG (n=3) / PP (n=3) / exercice (n=4), t-test.

Lorsque les rats sont soumis à 4 mois de régime HFD solvant, ils présentent une C-peptidémie augmentée de façon significative à  $1629,5 \pm 491,9$  pmol/L ( $p < 0,01$ ) par rapport aux rats ND solvant où la C-peptidémie n'est que de  $587,0 \pm 216,3$  pmol/L (cf. figure 118).



**Figure 118 :** Taux de C-peptide plasmatique en pmol/L chez les rats soumis pendant 4 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 2 mois aux antioxydants ou à l'exercice.

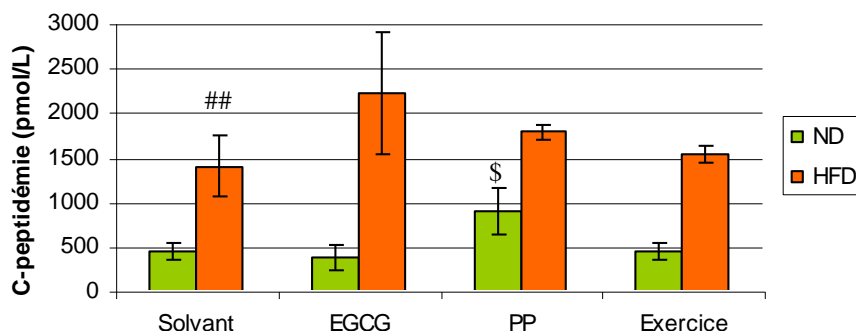
## :  $p < 0,01$  ; C-peptidémie ND solvant versus C-peptidémie HFD solvant, (n=4), t-test.

NS ; C-peptidémie ND solvant versus C-peptidémie ND EGCG / PP / exercice, (n=4), t-test.

\* :  $p < 0,05$  ; C-peptidémie HFD solvant (n=4) vs C-peptidémie HFD EGCG (n=5) /PP (n=5) / exercice (n=4), t-test.

Ces derniers, qu'ils reçoivent de l'EGCG, des PP ou qu'ils fassent de l'exercice pendant deux mois, ne présentent pas de différences significatives dans leur C-peptidémie (EGCG :  $713,7 \pm 210,19$  pmol/L ; PP :  $439,9 \pm 62,0$  pmol/L ; exercice :  $466,7 \pm 123,8$  pmol/L) par rapport aux rats ND solvant ( $466,7 \pm 123,8$  pmol/L). De plus, les PP administrés aux rats HFD ne modifient pas le taux de C-peptide plasmatique ( $1650,3 \pm 349,1$  pmol/L) contrairement à l'EGCG ( $1057,0 \pm 88,2$  pmol/L) et à l'exercice ( $937,4 \pm 231,2$  pmol/L) où la C-peptidémie est significativement diminuée ( $p < 0,05$ ) par rapport aux rats HFD solvant ( $1629,5 \pm 491,9$  pmol/L).

Après 5 mois de régime alimentaire, les rats HFD solvant présentent toujours une C-peptidémie augmentée de façon significative ( $1400,7 \pm 339,8$  pmol/L ;  $p < 0,01$ ) par rapport aux rats nourris par l'alimentation ND solvant ( $449,9 \pm 99,6$  pmol/L) ; (cf. figure 119). Le traitement par de l'EGCG ou la pratique d'une activité physique pendant trois mois chez les rats ND ne modifie pas leur C-peptidémie (EGCG :  $379,1 \pm 148,7$  pmol/L ; Exercice :  $439,2 \pm 95,6$  pmol/L) par rapport aux rats ND solvant ( $449,9 \pm 99,6$  pmol/L). En revanche, les PP induisent une augmentation significative de la C-peptidémie des rats ND ( $896,4 \pm 266,5$  pmol/L ;  $p < 0,05$ ) par rapport à ceux qui reçoivent le solvant. Enfin, chez les rats HFD, les traitements et la pratique d'une activité ne modifient plus le taux de C-peptidémie des animaux nourris par alimentation hypercalorique. En effet, les C-peptidémies obtenues sont de  $2225,4 \pm 683,6$  pmol/L pour les rats traités par l'EGCG, de  $1788,1 \pm 79,2$  pmol/L pour ceux traités par les PP et de  $1536,1 \pm 98,0$  pmol/L pour ceux faisant de l'exercice.



**Figure 119 : Taux de C-peptide plasmatique en pmol/L chez les rats soumis pendant 5 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 3 mois aux antioxydants ou à l'exercice.**

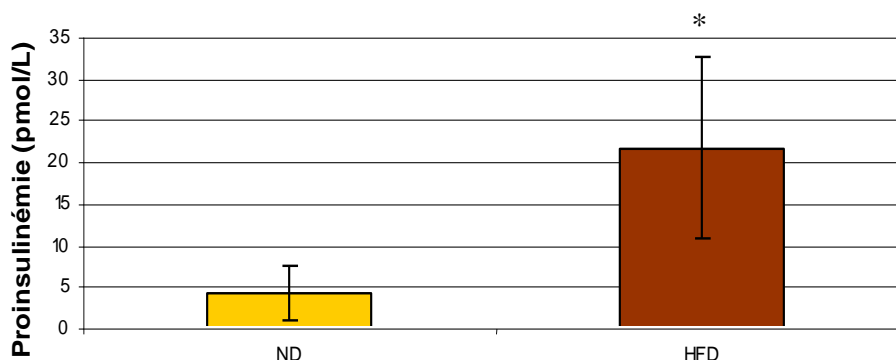
## :  $p < 0,01$  ; C-peptidémie ND solvant versus C-peptidémie HFD solvant, (n=4), t-test.

\$ :  $p < 0,05$  ; C-peptidémie ND solvant versus C-peptidémie ND EGCG / PP / Exercice, (n=4), t-test.

NS ; C-peptidémie HFD solvant (n=4) versus C-peptidémie HFD EGCG (n=4) /PP (n=3) /exercice (n=3), t-test.

#### d) Pro-insulinémie

La pro-insulinémie des animaux avant l'administration des traitements est de  $1,4 \pm 0,4$  pmol/L. Après administration des régimes normocalorique ou hypercalorique pendant deux mois, la pro-insulinémie des rats HFD est augmentée de façon significative ( $p < 0,05$ ) à  $21,6 \pm 10,9$  pmol/L par rapport aux rats ND solvant où le taux de pro-insuline n'est que de  $7,1 \pm 3,2$  pmol/L (cf. figure 120).

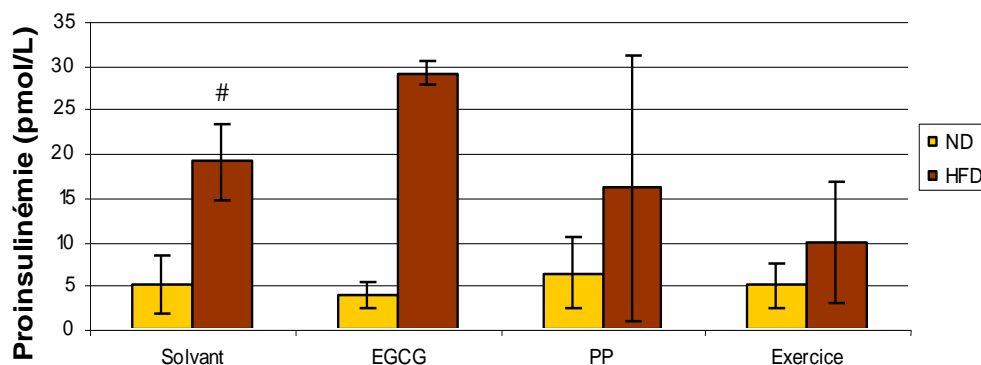


**Figure 120 : Taux de pro-insuline plasmatique en pmol/L chez les rats ND et HFD après 2 mois de régime alimentaire.**

\* :  $p < 0,05$  ; Pro-insulinémie ND versus pro-insulinémie HFD (n=4), t-test.

Après 3 mois de régime alimentaire, les rats HFD conservent cette augmentation de pro-insuline plasmatique par rapport aux rats ND (cf. figure 121). En effet, les rats HFD ont une pro-insulinémie augmentée significativement à  $19,1 \pm 4,4$  pmol/L ( $p < 0,05$ ) par rapport aux rats ND où la pro-insulinémie n'est que de  $5,1 \pm 3,3$  pmol/L. Chez les rats ND, les apports en EGCG, en PP ou par l'exercice pendant un mois ne modifient pas les taux de pro-insuline (EGCG :  $4,0 \pm 1,5$  pmol/L ; PP :  $6,4 \pm 4,1$  pmol/L ; exercice :  $5,0 \pm 2,6$  pmol/L). De plus, les rats HFD traités par l'EGCG semblent présenter une augmentation du taux de pro-insuline plasmatique à  $29,1 \pm 1,4$  pmol/L. Au

contraire, un traitement par les PP et l'exercice semble diminuer le taux de pro-insuline chez ces animaux (PP :  $16,1 \pm 15,1$  pmol/L ; exercice :  $9,9 \pm 6,8$  pmol/L).



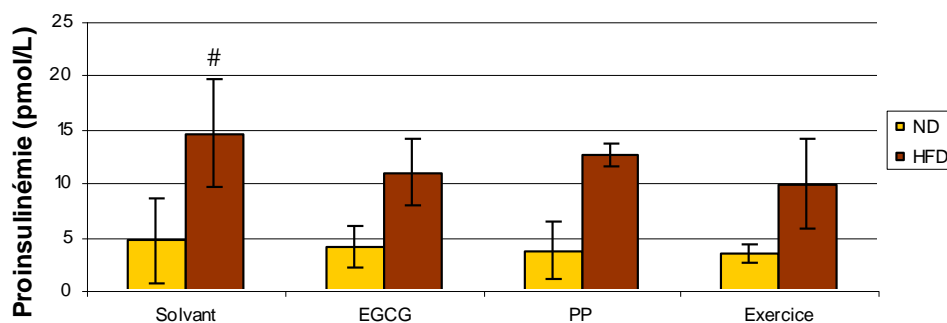
**Figure 121** : Taux de pro-insuline plasmatique en pmol/L chez les rats soumis pendant 3 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 1 mois aux antioxydants ou à l'exercice.

# :  $p < 0,05$  ; Pro-insulinémie ND solvant (n=5) versus pro-insulinémie HFD solvant (n=4), t-test.

NS ; Pro-insulinémie ND solvant (n=5) versus pro-insulinémie ND EGCG (n=5) / PP (n=5) / Exercice (n=4), t-test.

NS ; Pro-insulinémie HFD solvant (n=4) versus pro-insulinémie HFD EGCG (n=3) /PP (n=3) /exercice (n=5), t-test.

Après 4 mois de régime alimentaire, les rats soumis à l'alimentation HFD présentent une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) du taux de pro-insuline à  $14,6 \pm 5,1$  pmol/L alors qu'il n'est que de  $4,6 \pm 3,89$  pmol/L chez les rats ND (cf. figure 122). Chez le groupe de rats ND, ceux recevant l'EGCG, les PP et pratiquant l'exercice pendant deux mois, ne présentent pas d'évolution dans le taux de pro-insuline plasmatique (EGCG :  $4,0 \pm 2,0$  pmol/L ; PP :  $3,7 \pm 2,7$  pmol/L ; exercice  $3,4 \pm 0,8$  pmol/L) par rapport aux rats ND solvant ( $4,6 \pm 3,9$  pmol/L). Chez les rats HFD, les traitements par l'EGCG, les PP et l'exercice n'induisent pas de diminution significative du taux de pro-insuline (EGCG :  $11,0 \pm 3,1$  pmol/L ; PP :  $12,6 \pm 1,1$  pmol/L ; exercice :  $9,9 \pm 4,2$  pmol/L).



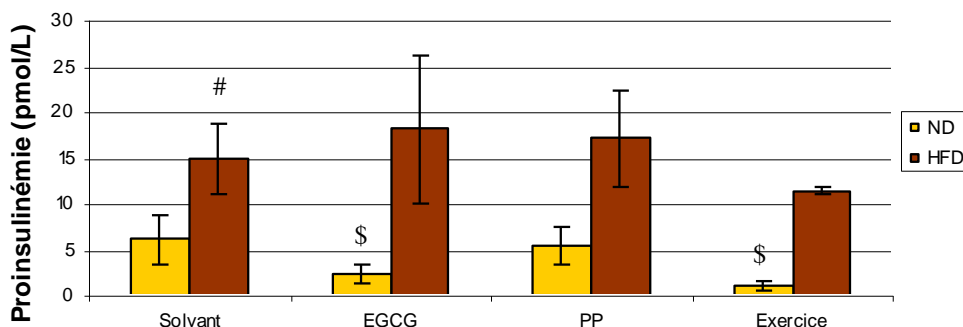
**Figure 122** : Taux de pro-insuline plasmatique en pmol/L chez les rats soumis pendant 4 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 2 mois aux antioxydants ou à l'exercice.

# :  $p < 0,05$  ; Pro-insulinémie ND solvant versus pro-insulinémie HFD solvant, (n=4), t-test.

NS ; Pro-insulinémie ND solvant versus pro-insulinémie ND EGCG / PP / Exercice, (n=4), t-test.

NS ; Pro-insulinémie HFD solvant (n=4) versus pro-insulinémie HFD EGCG (n=5) /PP (n=5) /exercice (n=4), t-test.

Lorsque les rats sont soumis à un régime hypercalorique pendant 5 mois, leur taux de pro-insuline plasmatique est augmenté de façon significative ( $p < 0,05$ ) à  $14,9 \pm 5,1$  pmol/L alors que celui des rats normocaloriques n'est que de  $6,0 \pm 2,8$  pmol/L (cf. figure 123).



**Figure 123 :** Taux de pro-insuline plasmatique en pmol/L chez les rats soumis pendant 5 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 3 mois aux antioxydants ou à l'exercice.

# :  $p < 0,05$  ; C-peptidémie ND solvant (n=3) versus C-peptidémie HFD solvant (n=4), t-test.

\$ :  $p < 0,05$  ; C-peptidémie ND solvant (n=3) versus C-peptidémie ND EGCG / PP / Exercice (n=3), t-test.

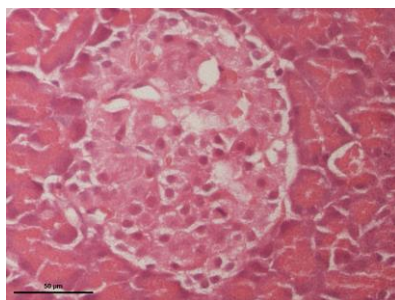
NS ; C-peptidémie HFD solvant (n=4) versus C-peptidémie HFD EGCG (n=4) /PP (n=3) /exercice (n=3), t-test.

Chez les rats nourris par l'alimentation ND, un traitement par de l'EGCG et l'exercice diminuent de façon significative ( $p < 0,05$ ) la pro-insulinémie plasmatique des animaux, respectivement à  $2,3 \pm 1,0$  pmol/L et à  $1,1 \pm 0,5$  pmol/L, tandis que les PP ne modifient ce taux ( $5,5 \pm 2,4$  pmol/L) par rapport aux animaux ND solvant. Enfin, chez les animaux HFD, la pratique d'une activité physique semble diminuer la pro-insulinémie ( $11,4 \pm 0,3$  pmol/L) par rapport aux rats HFD solvant ( $14,9 \pm 3,9$  pmol/L). L'EGCG et les PP semblent, au contraire, augmenter la pro-insulinémie ( $18,9 \pm 8,0$  pmol/L et  $17,1 \pm 5,3$  pmol/L, respectivement).

#### e) Étude histologique du pancréas

- Coloration à l'hématoxyline / éosine (HE)

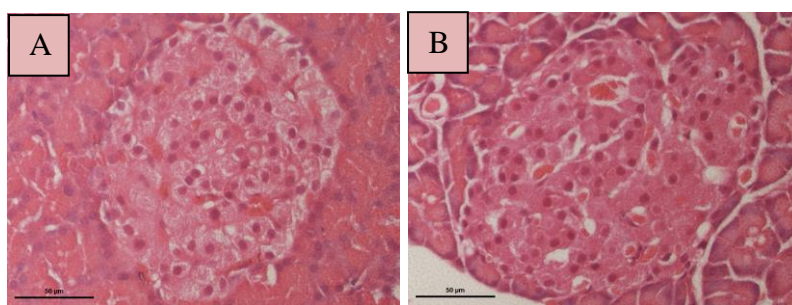
L'histologie des pancréas des rats de chaque condition et pour chacun des temps d'étude est étudiée par la coloration HE. Avant l'administration des régimes ND ou HFD, les îlots pancréatiques des rats présentent une forme ovoïde pour la plupart (cf. figure 124).



**Figure 124 :** Photographies d'îlots pancréatiques de rats avant l'administration des régimes.



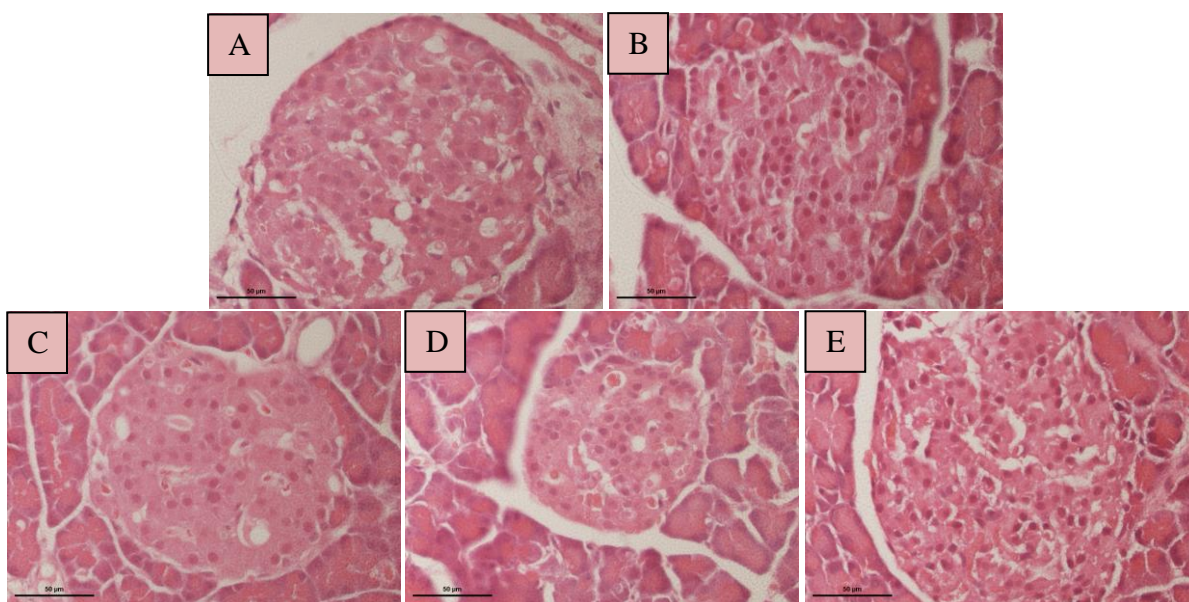
Après deux mois de régime ND ou HFD, aucune différence histologique notable n'est observée sur les îlots pancréatiques des rats des deux groupes d'animaux (cf. figure 125 A et B).



**Figure 125 : Photographies de coupes histologiques colorées à la HE de tissu pancréatique de rats soumis aux régimes pendant 2 mois.**

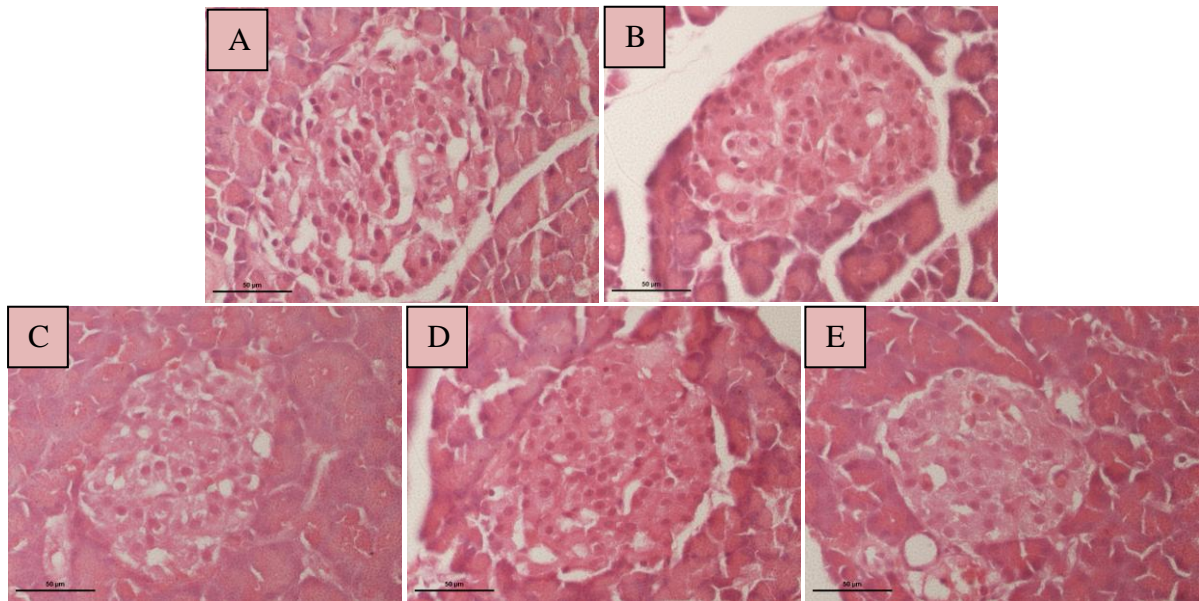
Les rats ont été nourris par alimentation ND (A) ou HFD (B) pendant deux mois.

De plus, que les animaux soient nourris à l'alimentation normocalorique ou hypercalorique pendant 3 mois (cf. figure 126), 4 mois (cf. figure 127) ou 5 mois (cf. figure 128), on n'observe pas de modification de l'aspect histologique des tissus pancréatiques en fonction des régimes, du temps de l'étude et de la supplémentation en antioxydants (EGCG ou PP) ou de la pratique de l'exercice physique. Les données concernant le régime ND supplémenté en antioxydants ou exercice ne sont pas présentées, car les résultats obtenus sont identiques aux animaux HFD témoins (solvant) avec ou sans exercice et antioxydant.



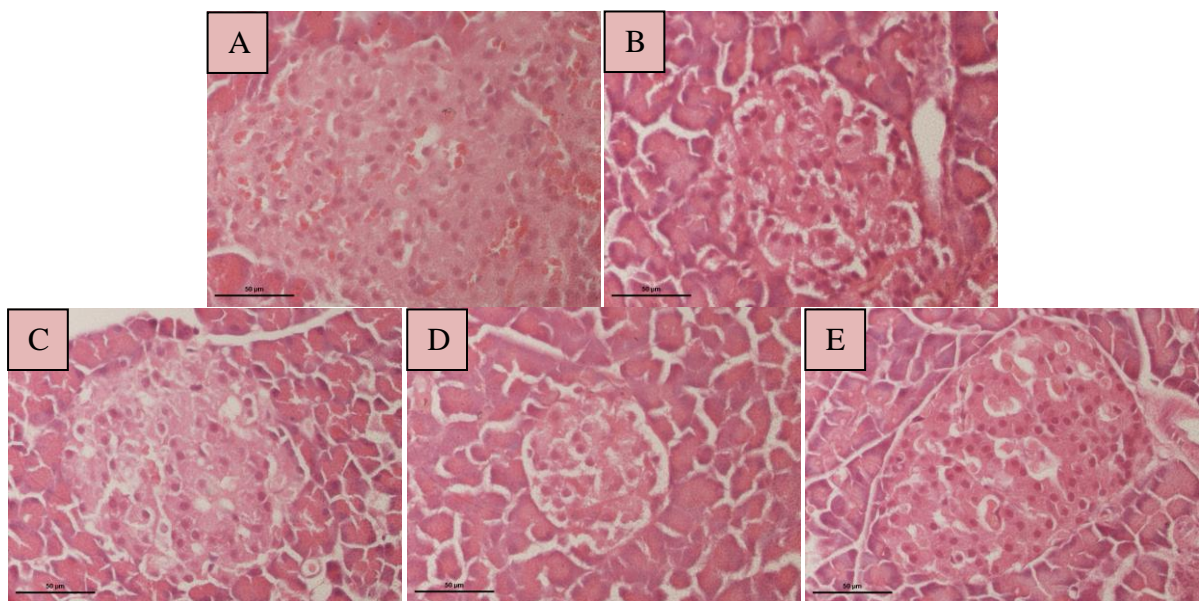
**Figure 126 : Photographies de coupes histologiques colorées à la HE de tissu pancréatique de rats soumis pendant 3 mois aux régimes et pendant 1 mois aux antioxydants ou à l'exercice.**

Les rats ont été nourris par alimentation ND (A) ou HFD (B) pendant trois mois. Les rats HFD ont bénéficié d'une supplémentation en EGCG à 50mg/kg/jour (C) ou en extrait de polyphénols de vin rouge à 50mg/kg/jour (D), ou ont pratiqué une activité physique (nage) pendant une heure de façon quotidienne (E).



**Figure 127 : Photographies de coupes histologiques colorées à la HE de tissu pancréatique de rats soumis pendant 4 mois aux régimes et pendant 2 mois aux antioxydants ou à l'exercice**

Les rats ont été nourris par alimentation ND (A) ou HFD (B) pendant quatre mois. Les rats HFD ont bénéficié d'une supplémentation en EGCG à 50mg/kg/jour (C) ou en extrait de polyphénols de vin rouge à 50mg/kg/jour (D), ou ont pratiqué une activité physique (nage) pendant une heure de façon quotidienne (E).



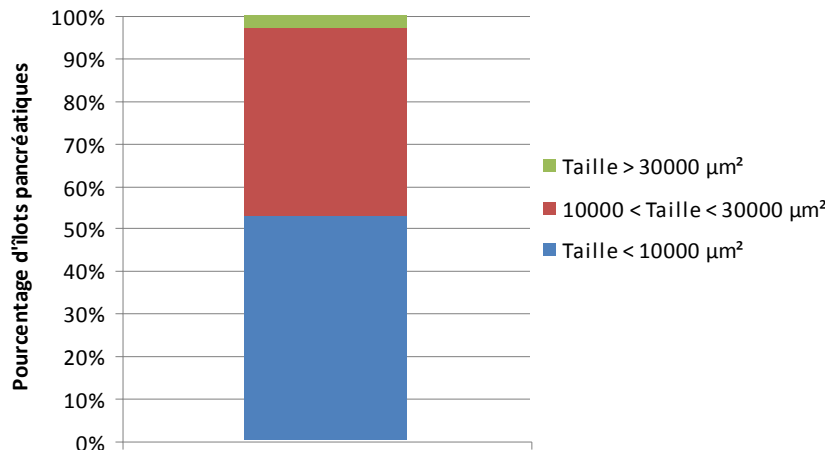
**Figure 128 : Photographies de coupes histologiques colorées à la HE de tissu pancréatique de rats soumis pendant 5 mois aux régimes et pendant 3 mois aux antioxydants ou à l'exercice**

Les rats ont été nourris par alimentation ND (A) ou HFD (B) pendant quatre mois. Les rats HFD ont bénéficié d'une supplémentation en EGCG à 50mg/kg/jour (C) ou en extrait de polyphénols de vin rouge à 50mg/kg/jour (D), ou ont pratiqué une activité physique (nage) pendant une heure de façon quotidienne (E).

- Mesure de la taille des îlots de Langerhans

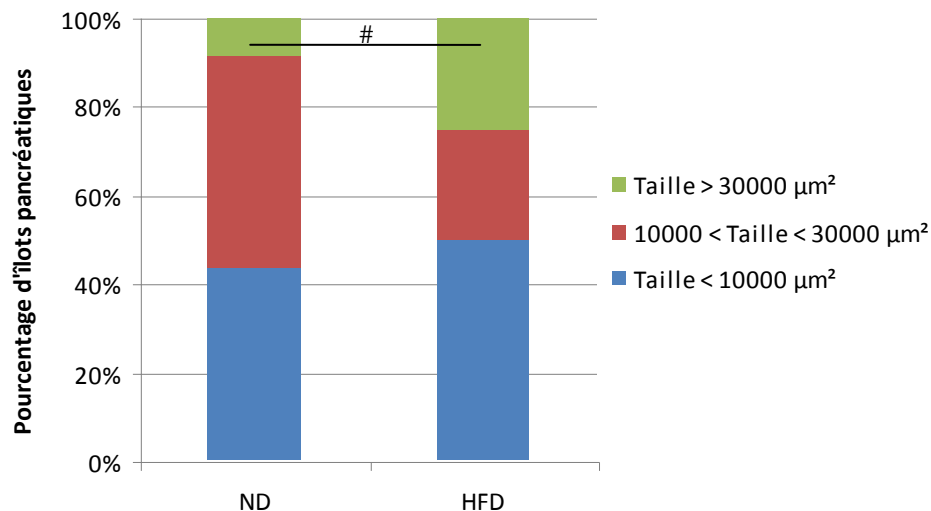
La taille des îlots pancréatiques a été mesurée d'après les coupes histologiques de pancréas colorées à la HE. La taille des îlots est définie par la mesure de leur surface en  $\mu\text{m}^2$  (cf. Matériels et Méthodes).

Les résultats montrent qu'avant l'introduction des régimes alimentaires, le nombre moyen de petits îlots est de  $51,3 \pm 2,2\%$  et celui des îlots de taille moyenne est de  $43,2 \pm 8,3\%$  (cf. figure 129). Le nombre de gros ne représente que  $2,8 \pm 4,8\%$ .



**Figure 129** : Pourcentage d'îlots en fonction de leur taille, avant l'administration des régimes (n=3)

Après deux mois de régime ND, le nombre de petits îlots observés dans les pancréas de ce groupe ( $43,7 \pm 15,5\%$ ) est similaire à celui des rats HFD ( $49,8 \pm 14,7\%$ ) ; (cf. figure 130). Le nombre d'îlots de taille moyenne semble être diminué chez les rats HFD ( $25,1 \pm 2,1\%$ ) par rapport à celui des rats ND ( $47,9 \pm 14,9\%$ ). Au niveau des gros îlots, une augmentation significative du nombre de gros îlots est observée chez les rats HFD ( $25,1 \pm 14,4\%$ ) par rapport aux rats ND ( $8,4 \pm 0,7\%$  ;  $p < 0,05$ ).

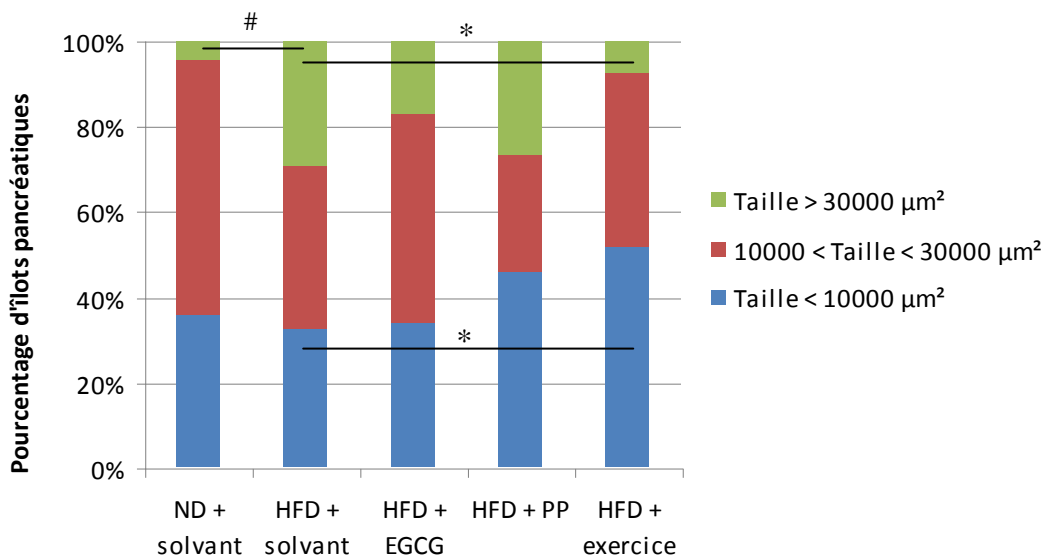


**Figure 130** : Pourcentage d'îlots en fonction de leur taille, après deux mois de régime ND ou HFD.

# :  $p < 0,05$  ; Pourcentage de gros îlots ND versus pourcentage de gros îlots HFD (n=3), t-test.



Après 3 mois de régime alimentaire, les rats HFD présentent une répartition des petits et des moyens îlots en fonction de leur taille ( $25,8 \pm 15,1\%$  et  $60,0 \pm 7,2\%$ , respectivement) qui n'est pas significativement modifiée par rapport à celle des rats ND ( $32,6 \pm 6,6\%$  et  $38,1 \pm 9,6\%$ , respectivement) ; (cf. figure 131). En revanche, les rats HFD ont une augmentation significative du nombre de leurs gros îlots ( $29,3 \pm 9,7\%$ ) par rapport aux rats ND ( $4,2 \pm 7,2\%$  ;  $p < 0,05$ ). Lorsque les rats ND reçoivent l'EGCG, les PP ou pratiquent une activité physique, aucune différence significative n'est observée dans la répartition des îlots en fonction de leur taille (résultats non montrés) par rapport aux rats ND solvant. Dans le groupe de rats HFD, que les rats soient traités par l'EGCG ou les PP, aucune différence significative n'est observée dans la répartition de la taille des îlots (petit :  $34,1 \pm 13,8\%$  ; moyen :  $49,0 \pm 15,2\%$  ; gros :  $16,9 \pm 8,0\%$  et petit :  $46,1 \pm 18,7\%$  ; moyen :  $27,2 \pm 11,8\%$  ; gros :  $26,7 \pm 8,8\%$ , respectivement) par rapport aux rats HFD solvant (petit :  $32,6 \pm 6,6\%$  ; moyen :  $38,1 \pm 9,6\%$  ; gros :  $29,3 \pm 9,7\%$ ). En revanche, l'exercice modifie significativement la répartition des petits et des gros îlots. En effet, le nombre de petits îlots chez les rats HFD pratiquant un exercice est augmenté à  $51,9 \pm 6,4\%$  contre  $32,6 \pm 6,6\%$  chez les rats HFD solvant ( $p < 0,05$ ). De même que le nombre de gros îlots est significativement diminué chez le premier groupe de rats ( $7,4 \pm 6,4\%$ ) par rapport au second groupe ( $29,3 \pm 9,7\%$ ). Aucune modification n'est observée pour le nombre d'îlots de taille moyenne entre ces deux groupes (HFD exercice :  $40,7 \pm 6,4\%$  et HFD solvant :  $38,1 \pm 9,6\%$ ).



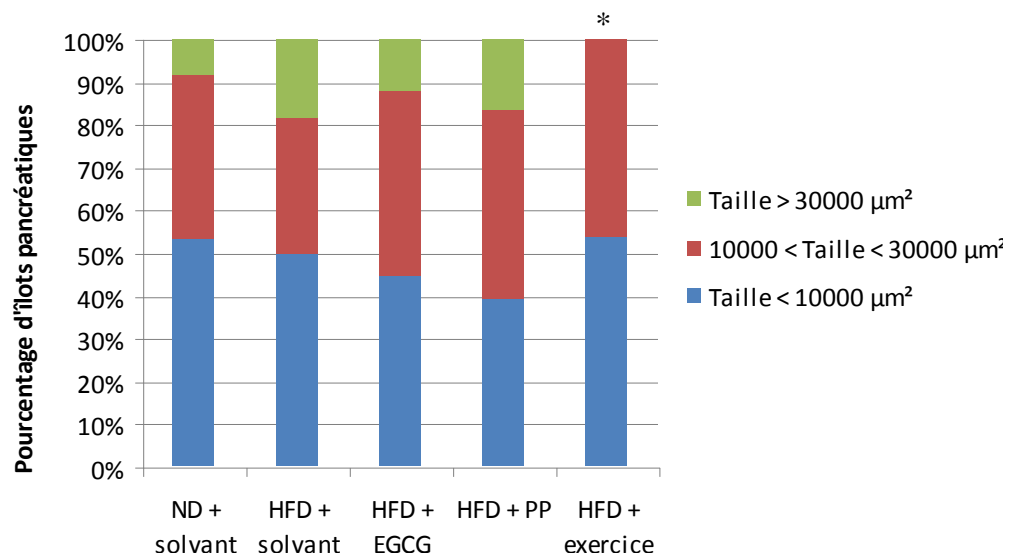
**Figure 131 : Pourcentage d'îlots en fonction de leur taille, après trois mois de régime ND ou HFD et un mois de traitement antioxydant ou d'activité physique.**

# :  $p < 0,05$  ; Pourcentage de gros îlots ND versus pourcentage de gros îlots HFD ( $n=3$ ), t-test.

\* :  $p < 0,05$  ; Pourcentage de gros îlots HFD solvant versus pourcentage de gros îlots HFD exercice ( $n=3$ ), t-test.

\* :  $p < 0,05$  ; Pourcentage de petits îlots HFD solvant versus pourcentage de petits îlots HFD exercice ( $n=3$ ), t-test.

Après 4 mois de régime, la répartition des îlots des rats HFD ne semble pas être modifiée significativement (petit :  $49,8 \pm 8,5\%$  ; moyen :  $31,8 \pm 15,8\%$  ; gros :  $18,4 \pm 7,3\%$ ) par rapport aux témoins ND solvant (petit :  $53,6 \pm 24,8\%$  ; moyen :  $38,2 \pm 18,1\%$  ; gros :  $8,1 \pm 8,3\%$ ) ; (cf. figure 132). Lorsque les rats ND sont traités par l'EGCG, les PP ou l'exercice, aucune différence significative n'est observée dans la répartition des îlots en fonction de leur taille (résultats non montrés) par rapport aux rats ND solvant. Chez les rats HFD, la supplémentation en antioxydant que ce soit en EGCG (petit :  $44,6 \pm 24,0\%$  ; moyen :  $43,3 \pm 20,3\%$  ; gros :  $12,0 \pm 12,5\%$ ) ou en PP (petit :  $39,4 \pm 24,8\%$  ; moyen :  $43,9 \pm 11,1\%$  ; gros :  $16,7 \pm 16,7\%$ ), ne modifie pas de façon significative la répartition des îlots par rapport au témoin HFD. En revanche, les animaux traités par l'exercice ne présentent une diminution significative ( $p < 0,05$ ) du nombre de gros îlots par rapport aux rats HFD solvant ( $18,4 \pm 7,3\%$ ). La proportion des petits et moyens îlots n'est pas modifiée significativement (petit :  $53,8 \pm 17,9\%$  ; moyen :  $46,2 \pm 17,9\%$ ).



**Figure 132 :** Pourcentage d'îlots en fonction de leur taille, après quatre mois de régimes ND ou HFD et deux mois de suppléments en antioxydants ou en exercice physique.

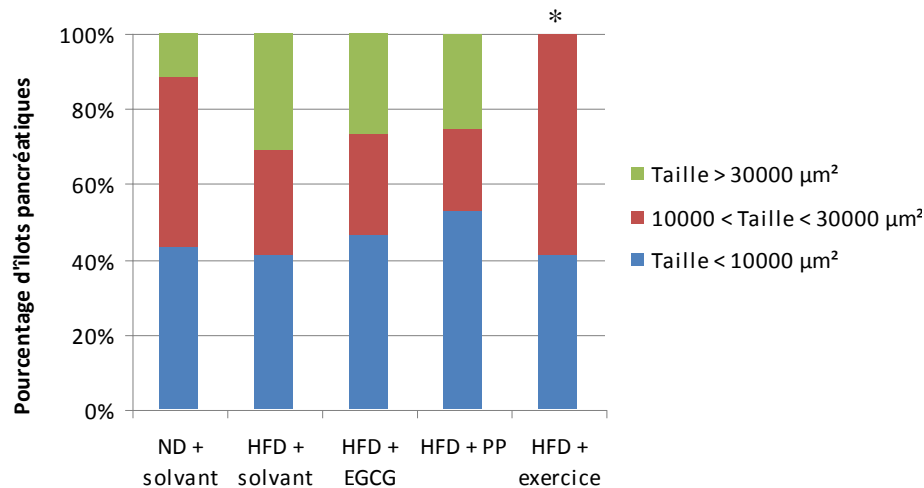
NS ; Pourcentage de gros îlots ND versus pourcentage de gros îlots HFD (n=3), t-test.

NS ; Pourcentage de gros îlots HFD solvant versus pourcentage de gros îlots HFD exercice (n=3), t-test.

\* :  $p < 0,05$  ; Pourcentage de petits îlots HFD solvant versus pourcentage de petits îlots HFD exercice (n=3), t-test.

Enfin, après 5 mois d'étude, les rats nourris par l'alimentation HFD ne présentent pas de modification significative de la répartition des îlots (petit :  $41,0 \pm 18,8\%$  ; moyen :  $27,9 \pm 23,2\%$  ; gros :  $18,4 \pm 7,3\%$ ) par rapport aux rats ND solvant (petit :  $43,0 \pm 11,4\%$  ; moyen :  $45,4 \pm 4,2\%$  ; gros :  $31,1 \pm 16,8\%$ ). Lorsque les rats ND reçoivent l'EGCG, les PP ou pratiquent une activité physique, aucune différence significative n'est observée dans la répartition des îlots en fonction de leur taille (résultats non montrés) par rapport aux rats ND solvant. Chez les rats HFD, l'apport des antioxydants, EGCG et PP, ne modifie pas la répartition des îlots en fonction de leur taille (petit :

48,5 ± 2,6% ; moyen : 28,0 ± 20,6% ; gros : 27,7 ± 16,6% et petit : 52,9 ± 27,4% ; moyen : 21,8 ± 10,0% ; gros : 25,3 ± 18,2%, respectivement). En revanche, l'exercice induit une modification significative de cette répartition, par diminution du nombre de gros îlots qui est de 0% chez les rats faisant de l'exercice contre 31,1 ± 16,8% chez ceux recevant le solvant. Cependant, aucune modification significative n'est observée pour les îlots de petite et de moyenne taille (39,4 ± 18,3% et 56,4 ± 14,3%, respectivement), (cf. figure 133).



**Figure 133** : Pourcentage d'îlots en fonction de leur taille, après cinq mois de régime ND ou HFD et trois mois de traitement antioxydant ou d'activité physique.

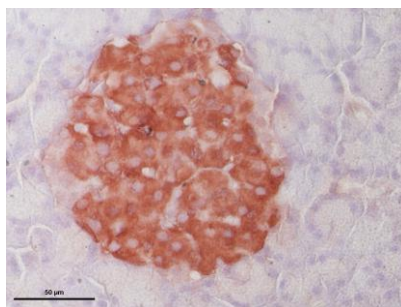
NS ; Pourcentage de gros îlots ND versus pourcentage de gros îlots HFD (n=3), t-test.

NS ; Pourcentage de gros îlots HFD solvant versus pourcentage de gros îlots HFD exercice (n=3), t-test.

\* : p < 0,05 ; Pourcentage de petits îlots HFD solvant versus pourcentage de petits îlots HFD exercice (n=3), t-test.

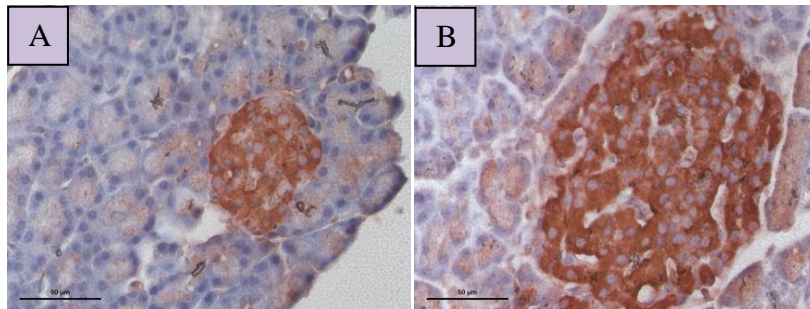
- Immuno-marquage du pancréas à l'insuline

L'immuno-marquage de l'insuline a été réalisé sur des coupes de pancréas d'animaux nourris par alimentation ND ou HFD pendant deux, trois, quatre et cinq mois, avec une supplémentation en EGCG ou en PP ou avec la pratique d'une activité physique. Avant l'administration des régimes, les rats présentent un marquage à l'insuline correct, mis en évidence par une coloration rouge (cf. figure 134).



**Figure 134** : Photographie d'immunohistologie d'une coupe de pancréas marquée à l'insuline, de rat avant l'administration des régimes.

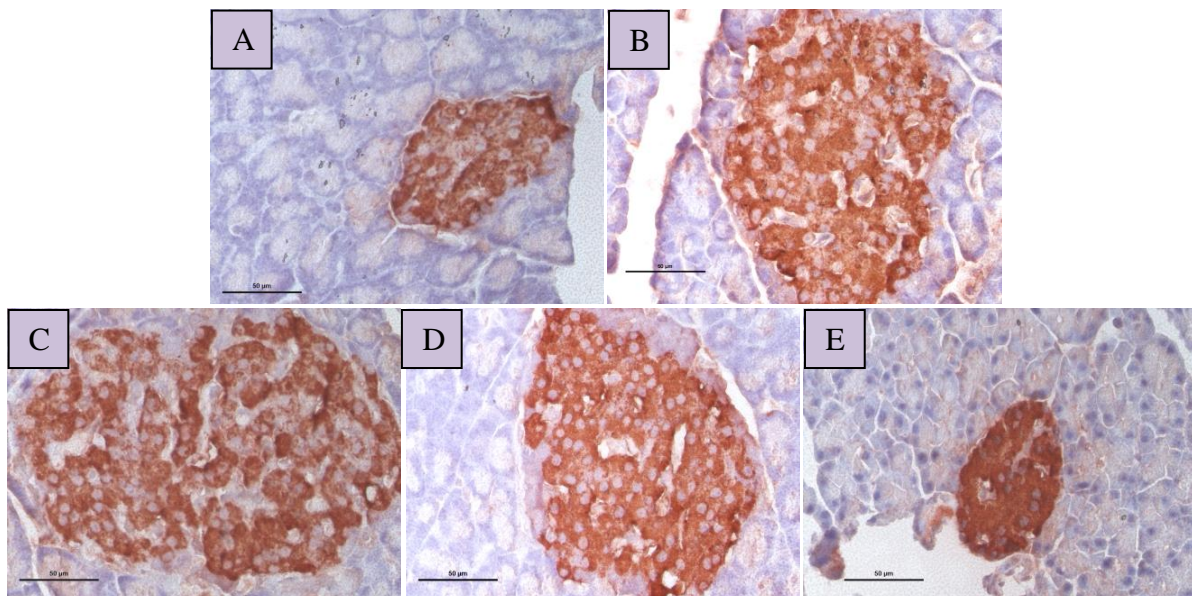
Les résultats obtenus montrent qu'après deux mois de régime HFD (cf. figure 135 B), on n'observe pas de différence de marquage à l'insuline dans les îlots par rapport aux pancréas d'animaux nourris par alimentation ND (cf. figure 135 A).



**Figure 135 : Photographies d'immunohistologie de coupes de pancréas marquées à l'insuline, de rats nourris par alimentation ND ou HFD pendant 2 mois.**

Les rats ont été nourris pendant deux mois par un régime ND (A) ou HFD (B) et les cellules produisant l'insuline apparaissent en rouge.

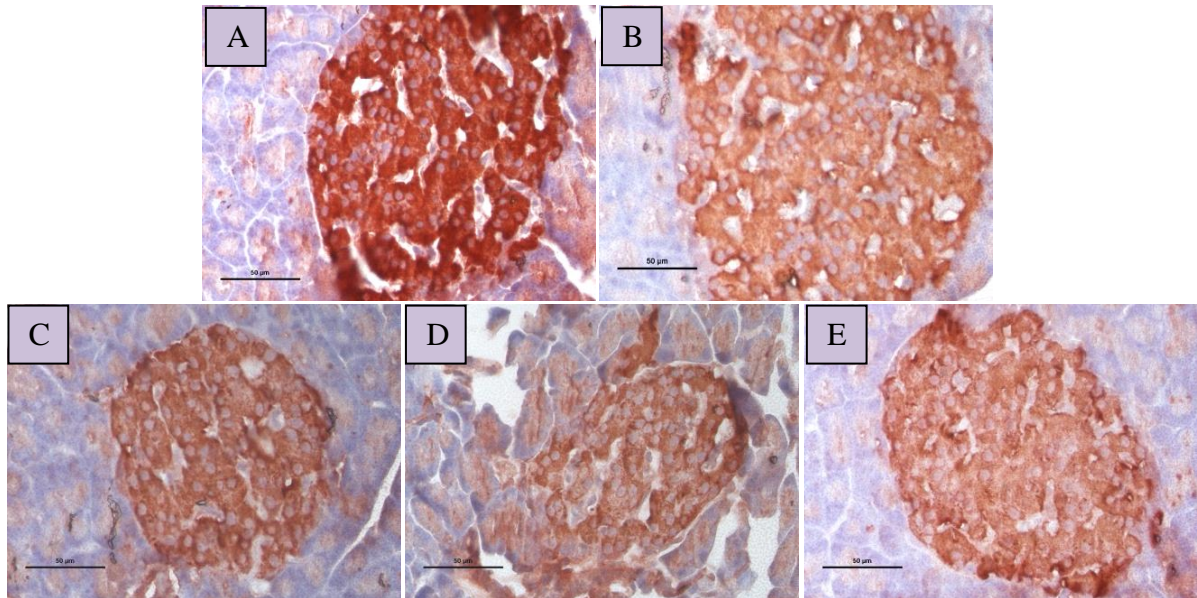
Des résultats similaires sont obtenus pour des animaux nourris par l'alimentation normocalorique ou hypercalorique après 3 mois (cf. figure 136), 4 mois (cf. figure 137) ou 5 mois (cf. figure 138), bénéficiant ou non d'une supplémentation en antioxydants ou pratiquant un exercice. En effet, aucune différence dans le marquage n'est observée entre les groupes d'animaux ND et HFD. Les résultats des coupes d'immuno-marquage à l'insuline des animaux ND aux différents mois avec les traitements antioxydants ou l'activité physique ne sont pas présentés car ils sont identiques au témoin ND.



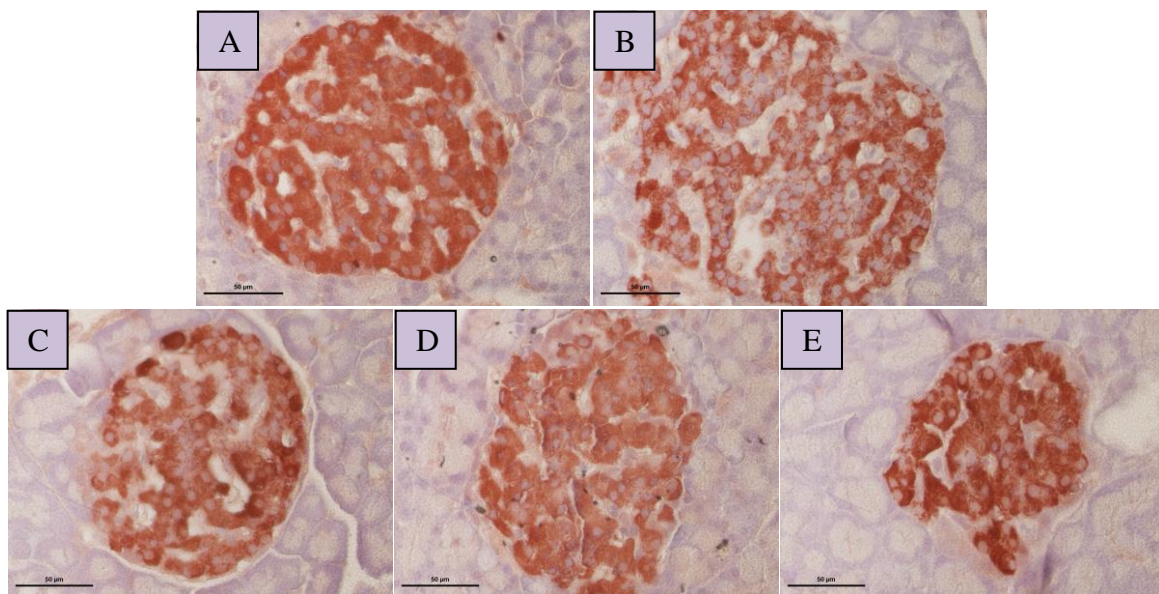
**Figure 136 : Photographies d'immunohistologie de coupes de pancréas marquées à l'insuline, de rats nourris par alimentation ND ou HFD pendant 3 mois et traités par des antioxydants ou l'exercice pendant un mois.**

Les rats ont été nourris pendant 3 mois par un régime ND (A) ou HFD (B). Les rats HFD ont reçu pendant un mois, de l'EGCG (C), des PP (D) et ont pratiqué une activité physique (E). Les cellules produisant l'insuline apparaissent en rouge.





**Figure 137 :** Photographies d'immunohistologie de coupes de pancréas marquées à l'insuline, de rats nourris par alimentation ND ou HFD pendant 4 mois et traités par des antioxydants ou l'exercice pendant 2 mois. Les rats ont été nourris pendant 4 mois par un régime ND (A) ou HFD (B). Les rats HFD ont reçu pendant 2 mois, de l'EGCG (C), des PP (D) et ont pratiqué une activité physique (E). Les cellules produisant l'insuline apparaissent en rouge.

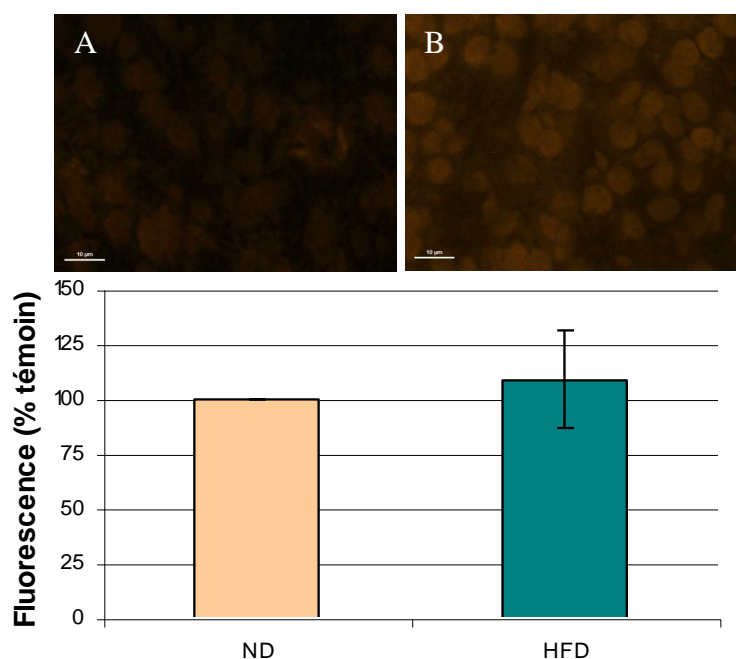


**Figure 138 :** Photographies d'immunohistologie de coupes de pancréas marquées à l'insuline, de rats nourris par alimentation ND ou HFD pendant 5 mois et traités par des antioxydants ou l'exercice pendant 3 mois. Les rats ont été nourris pendant 5 mois par un régime ND (A) ou HFD (B). Les rats HFD ont reçu pendant 3 mois, de l'EGCG (C), des PP (D) et ont pratiqué une activité physique (E). Les cellules produisant l'insuline apparaissent en rouge.

#### f) Marquage du pancréas à la DHE

Les coupes de pancréas des rats HFD et ND, supplémentés ou non en antioxydants ou pratiquant une activité physique ont été traitées à la dihydroéthidine.

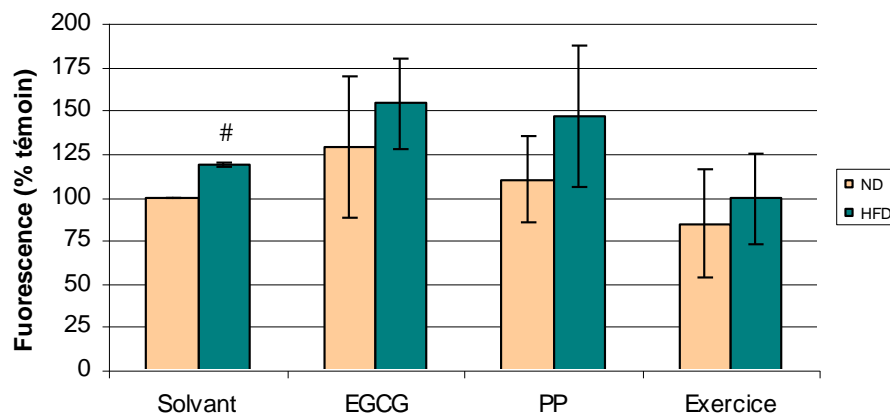
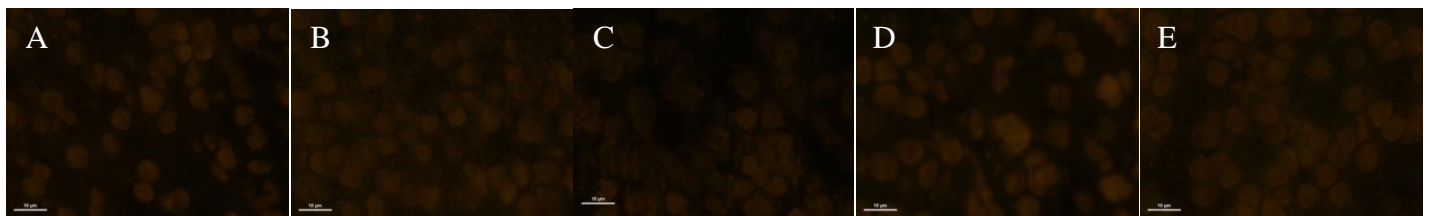
Des animaux nourris par le régime HFD pendant deux mois présentent un marquage à la DHE nucléaire similaire à celui des rats ND (HFD :  $109,21 \pm 21,86\%$  ; ND : 100%) lors de l'analyse de la fluorescence d'un échantillon égal à 3 (cf. figure 139). Cependant, l'analyse qualitative de la fluorescence montre une augmentation de fluorescence non significative entre les rats HFD (cf. figure 139 B) et les rats ND (cf. figure 139 A).



**Figure 139 :** Quantification de la sonde DHE en % sur des coupes de pancréas de rats ND (A) ou HFD (B), après 2 mois de régime alimentaire.

NS ; Fluorescence ND versus fluorescence HFD, (n=3), t-test.

Après 3 mois de régime alimentaire HFD, une augmentation significative de l'intensité de fluorescence de la DHE ( $118,42 \pm 1,77\%$  ;  $p < 0,05$ ) est observée par rapport aux rats nourris par l'alimentation ND (100%) ; (cf. figure 140). Cette augmentation n'est cependant pas observée sur les photographies du tissu des rats HFD (cf. figure 140 B) et des rats ND (cf. figure 140 A). L'apport des antioxydants et de l'exercice pendant un mois, sur les animaux soumis au régime ND pendant 3 mois, ne modifie pas l'intensité de fluorescence de la DHE (EGCG :  $128,30 \pm 40,88\%$  ; PP :  $110,13 \pm 25,14\%$  ; exercice :  $84,26 \pm 31,14\%$ ) par rapport aux animaux ND solvant (100%). Chez les rats HFD, aucune modification significative de la fluorescence n'est observée, que ce soit de façon qualitative ou quantitative, pour les rats traités par l'EGCG ( $153,52 \pm 26,09\%$  ; cf. figure 140 C), les PP ( $146,98 \pm 40,69\%$  ; cf. figure 140 D) ou par l'exercice (exercice :  $98,83 \pm 26,22\%$  ; cf. figure 140 E), par rapport aux rats HFD solvant ( $118,42 \pm 1,77\%$ ).



**Figure 140 : Quantification de la sonde DHE en % sur des coupes de pancréas de rats nourris par alimentation ND ou HFD pendant 3 mois et traités par les antioxydants ou l'exercice, pendant 1 mois.**

Rats ND (A), HFD (B), HFD + EGCG (C), HFD + PP (D) et HFD + Exercice (E).

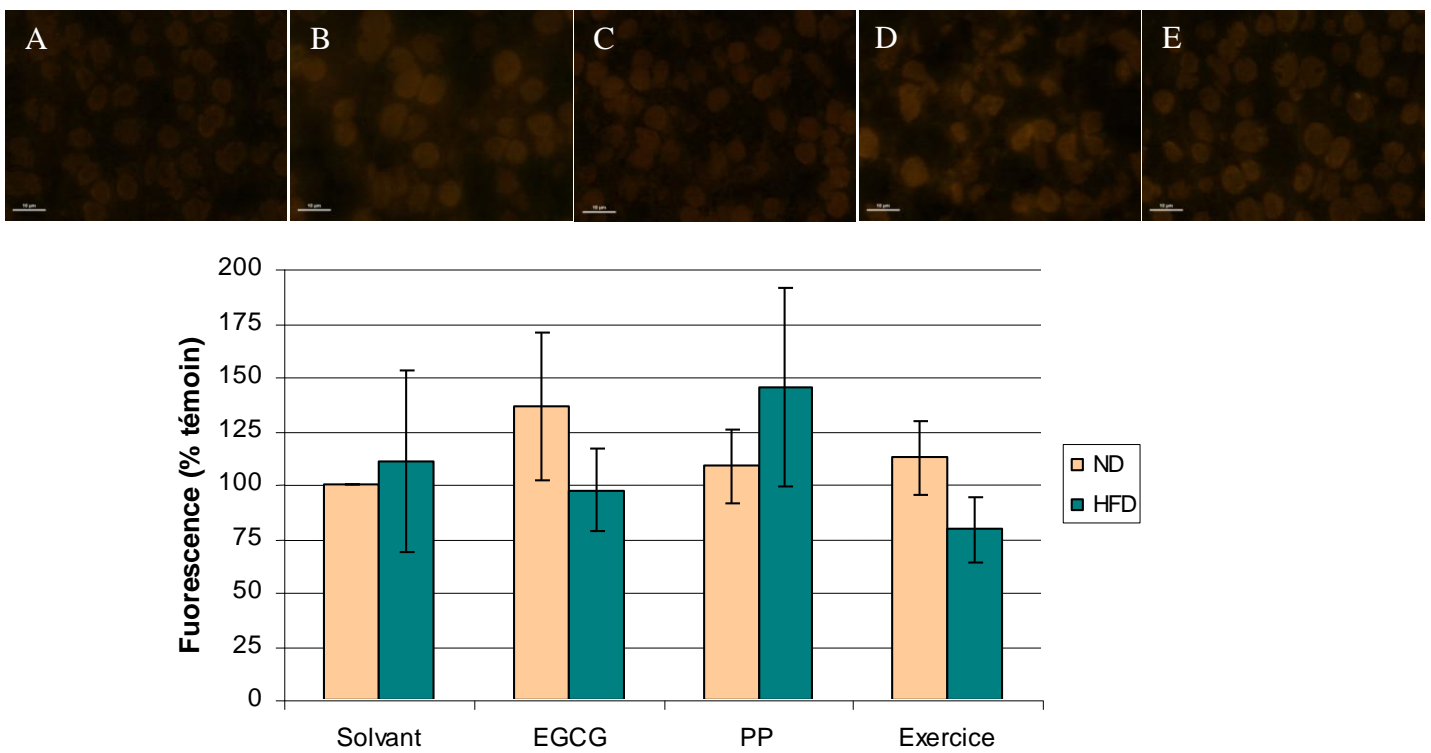
# :  $p < 0,05$  ; Fluorescence ND versus fluorescence HFD, (n=3), t-test.

NS ; Fluorescence ND solvant versus fluorescence ND EGCG / PP / exercice, (n=3), t-test.

NS ; Fluorescence HFD solvant versus fluorescence HFD EGCG / PP / exercice, (n=3), t-test.

Lorsque les animaux sont soumis à un régime HFD pendant 4 mois, l'intensité de fluorescence de la DHE obtenue est similaire à celle des animaux nourris par l'alimentation ND

(ND solvant : 100% ; HFD : 110,81 ± 42,15%) ; (cf. figure 141). Ces fluorescences quantifiées sont également comparables, d'un point de vue qualitatif, pour les rats HFD solvant (cf. figure 141 B) et les rats ND solvant (cf. figure 141 A). Que les rats reçoivent de l'EGCG, des PP ou qu'ils pratiquent une activité physique dans les deux groupes, on n'observe pas de modification de fluorescence dans le tissu pancréatique de ces animaux par rapport à leur témoin solvant (ND EGCG : 136,41 ± 34,14% ; ND PP : 108,59 ± 17,21% ; ND exercice : 112,35 ± 16,97% ; HFD EGCG : 97,49 ± 19,51% ; HFD PP : 145,29 ± 46,36% ; HFD exercice : 79,08 ± 15,02%). Ces résultats sont également confirmés d'un point de vue qualitatif, dans le groupe des rats HFD recevant le solvant (cf. figure 141 B), l'EGCG (cf. figure 141 C), les PP (cf. figure 141 D) ou pratiquant un exercice (cf. figure 141 E).



**Figure 141 : Quantification de la sonde DHE en % sur des coupes de pancréas de rats nourris par alimentation ND ou HFD pendant 4 mois et traités par les antioxydants ou l'exercice, pendant 2 mois.**

Rats ND (A), HFD (B), HFD + EGCG (C), HFD + PP (D) et HFD + Exercice (E).

NS ; Fluorescence ND versus fluorescence HFD, (n=3), t-test.

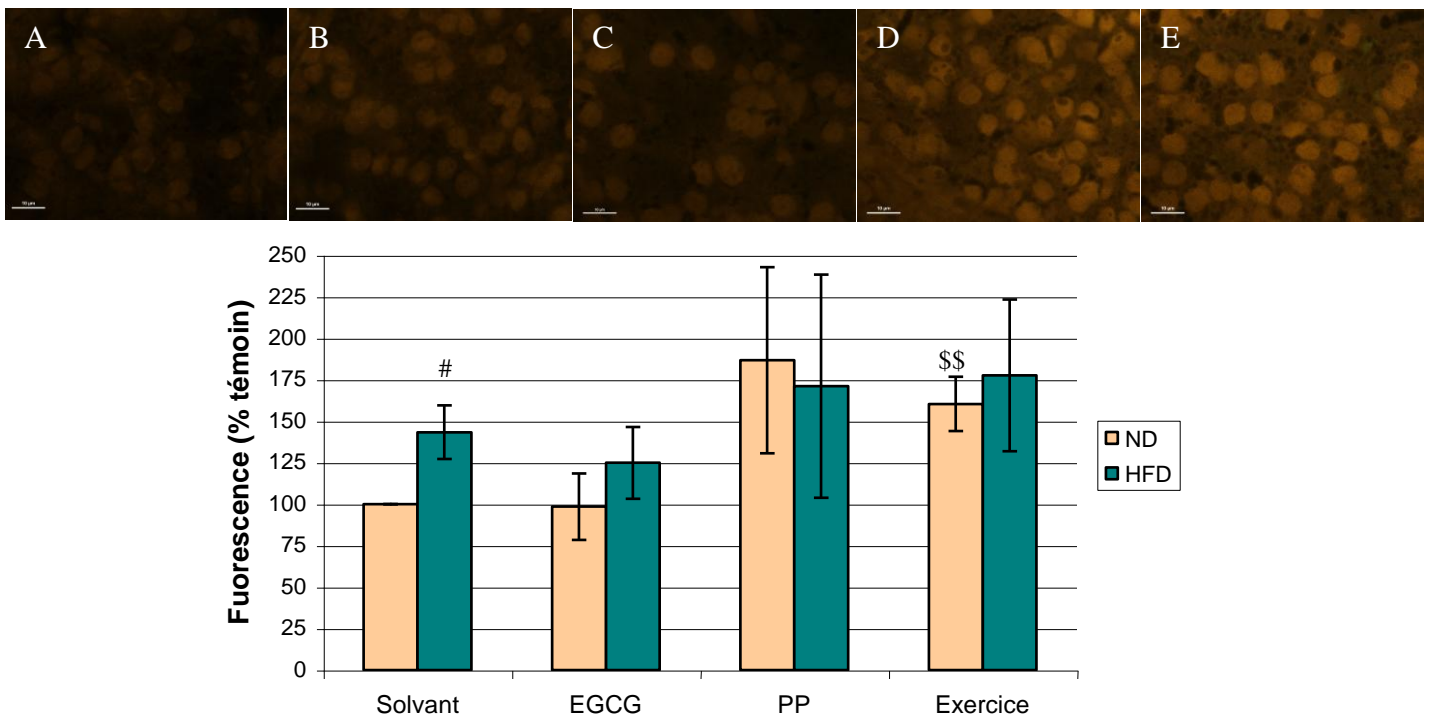
NS ; Fluorescence ND solvant versus fluorescence ND EGCG / PP / exercice, (n=3), t-test.

NS ; Fluorescence HFD solvant versus fluorescence HFD EGCG / PP / exercice, (n=3), t-test.

A la fin de l'étude, le tissu pancréatique présente une augmentation significative du marquage fluorescent à la DHE chez les rats HFD solvant (143,30 ± 16,16% ; p < 0,05) par rapport aux rats ND solvant (100%) ; (cf. figure 142). Cette différence n'est pas observée sur les photographies des tissus des rats ND (cf. figure 142 A) et HFD (cf. figure 142 B) Chez les rats ND, l'exercice induit



une augmentation significative de la fluorescence ( $160,42 \pm 16,38\%$  ;  $p < 0,01$ ) alors que le traitement par les antioxydants ne semble pas modifier de façon significative cette fluorescence (EGCG :  $98,52 \pm 20,07\%$  et PP :  $186,75 \pm 56,03\%$ ). Dans le cas des rats nourris par l'alimentation HFD, quel que soit le traitement utilisé, la fluorescence n'est pas modifiée de façon significative (EGCG :  $124,92 \pm 21,64\%$  ; PP :  $171,10 \pm 67,31\%$  ; exercice :  $177,67 \pm 45,69$ ) sur une analyse quantitative de trois échantillons, par rapport aux rats HFD solvant ( $143,30 \pm 16,16\%$ ). Cependant, les photographies présentées ci-dessous montrent que le traitement par les PP et l'exercice semblent induire une augmentation de la fluorescence (cf. figure 142 D et 142 E, respectivement) par rapport au solvant (cf. figure 142 B) et à l'EGCG (cf. figure 142 C).



**Figure 142 : Quantification de la sonde DHE en % sur des coupes de pancréas de rats nourris par alimentation ND ou HFD pendant 5 mois et traités par les antioxydants ou l'exercice, pendant 3 mois.**

Rats ND (A), HFD (B), HFD + EGCG (C), HFD + PP (D) et HFD + Exercice (E).

# :  $p < 0,05$  ; Fluorescence ND versus fluorescence HFD, ( $n=3$ ), t-test.

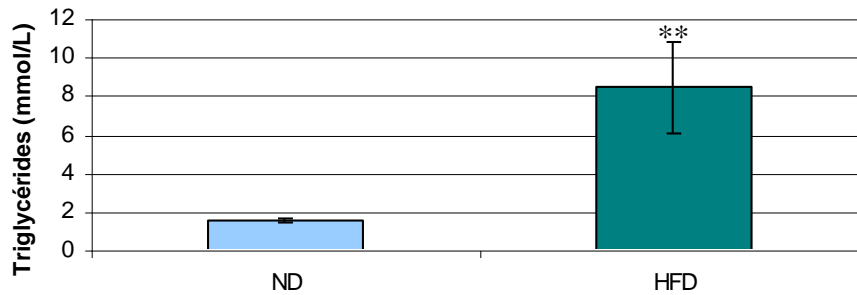
\$\$ :  $p < 0,01$  ; Fluorescence ND solvant versus fluorescence ND EGCG / PP / exercice, ( $n=3$ ), t-test.

NS ; Fluorescence HFD solvant versus fluorescence HFD EGCG / PP / exercice, ( $n=3$ ), t-test.

### g) Dosage des triglycérides

Avant l'administration des régimes alimentaires ND ou HFD chez les rats, le taux de triglycérides plasmatiques a été mesuré. Celui-ci était de  $0,94 \pm 0,06\text{mmol/L}$ .

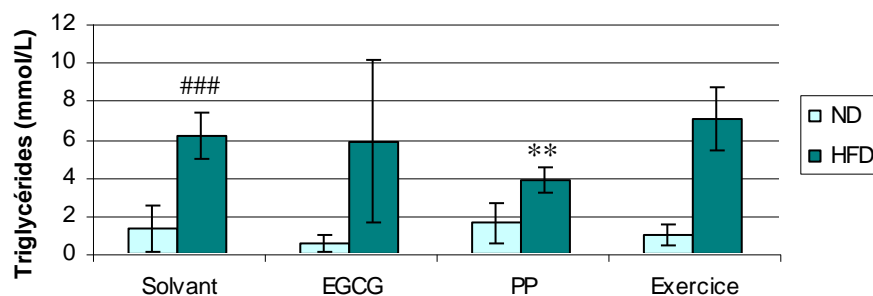
Puis après deux mois de régimes HFD, les rats présentent un taux de triglycérides plasmatiques significativement augmenté ( $p < 0,01$ ) à  $8,5 \pm 2,4\text{mmol/L}$  alors que celui des rats ND n'est que de  $1,6 \pm 0,1\text{mmol/L}$  (cf. figure 143).



**Figure 143 : Taux de triglycérides plasmatiques en mmol/L, chez des rats nourris par une alimentation ND et HFD pendant 2 mois.**

\*\* :  $p < 0,01$  ; Triglycéridémie ND (n=3) versus triglycéridémie HFD (n=4), t-test.

Après trois mois de régime HFD, les rats recevant le solvant présentent une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) de la triglycéridémie plasmatique ( $6,2 \pm 1,2\text{mmol/L}$ ) par rapport aux rats ND solvant ( $1,3 \pm 1,2\text{mmol/L}$ ) ; (cf. figure 144). Les traitements par l'EGCG, les PP et l'exercice pendant un mois ne modifient pas le taux de triglycérides chez les animaux nourris par l'alimentation ND (EGCG :  $0,5 \pm 0,4\text{mmol/L}$  ; PP :  $1,6 \pm 1,0\text{mmol/L}$  ; exercice :  $1,0 \pm 0,5\text{mmol/L}$ ) par rapport aux animaux témoins ND solvant. En revanche, seuls les PP induisent une diminution significative ( $p < 0,01$ ) du taux de triglycérides à  $3,9 \pm 0,7\text{mmol/L}$  chez les animaux HFD contrairement à l'EGCG ( $5,9 \pm 4,2\text{mmol/L}$ ) et à l'exercice ( $7,1 \pm 1,7\text{mmol/L}$ ).



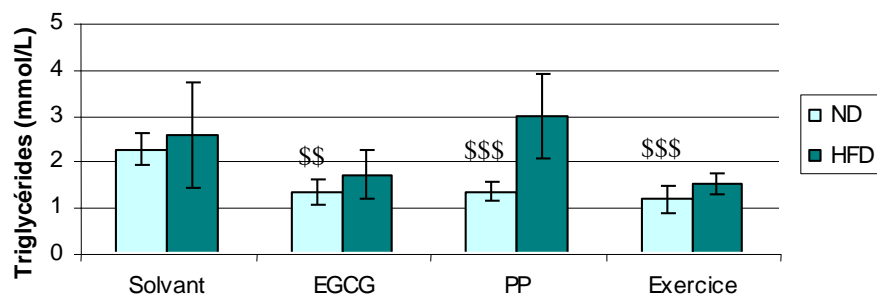
**Figure 144 : Taux de triglycérides plasmatiques en mmol/L, chez des rats soumis pendant 3 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 1 mois aux antioxydants ou à l'exercice.**

### :  $p < 0,001$  ; Triglycéridémie ND solvant (n=5) versus triglycéridémie HFD solvant (n=4), t-test.

NS ; Triglycéridémie ND solvant versus triglycéridémie ND EGCG / PP / Exercice, (n=5), t-test.

\*\* :  $p < 0,01$  ; Triglycéridémie HFD solvant (n=4) versus triglycéridémie HFD EGCG / PP /exercice (n=5), t-test.

Lorsque les rats sont soumis aux régimes pendant 4 mois, les résultats obtenus montrent que le taux de triglycérides n'est pas significativement différent entre les rats ND solvant ( $2,3 \pm 0,3\text{mmol/L}$ ) et les rats HFD solvant ( $2,6 \pm 1,2\text{mmol/L}$ ) ; (cf. figure 145).



**Figure 145** : Taux de triglycérides plasmatique en mmol/L, chez des rats soumis pendant 4 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 2 mois aux antioxydants ou à l'exercice.

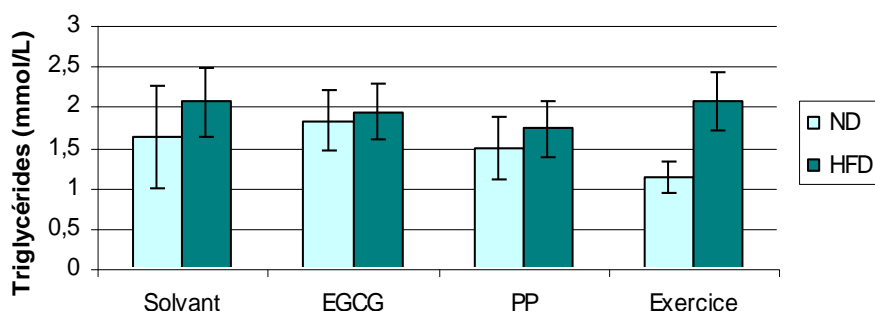
NS ; Triglycéridémie ND solvant (n=5) versus triglycéridémie HFD solvant (n=4), t-test.

\$\$ :  $p < 0,01$  ; \$\$\$ :  $p < 0,001$  ; Triglycéridémie ND solvant vs triglycéridémie ND EGCG / PP / Exercice, (n=5), t-test.

NS ; Triglycéridémie HFD solvant versus triglycéridémie HFD EGCG /PP /exercice, (n=4), t-test.

L'administration des antioxydants EGCG, PP et de l'exercice pendant deux mois, induisent une diminution significative du taux de triglycérides plasmatiques chez les animaux ND, respectivement à  $1,3 \pm 0,3$ mmol/L ( $p < 0,01$ ), à  $1,3 \pm 0,2$ mmol/L ( $p < 0,001$ ) et à  $1,2 \pm 0,3$ mmol/L ( $p < 0,001$ ) par rapport aux rats témoins ND solvant ( $2,3 \pm 0,3$ mmol/L). En revanche, chez les animaux HFD, seuls l'EGCG et l'exercice semblent diminuer le taux de triglycérides plasmatiques respectivement à  $1,7 \pm 0,5$ mmol/L et à  $1,5 \pm 0,2$ mmol/L par rapport aux témoins HFD solvant ( $2,6 \pm 1,2$ mmol/L). Enfin, les PP ne modifient pas le taux de triglycérides ( $3,0 \pm 0,9$ mmol/L) par rapport aux rats témoins HFD solvant.

Après 5 mois de régime alimentaire, aucune modification du taux de triglycérides plasmatique n'est observée entre les rats ND solvant ( $1,6 \pm 0,6$ mmol/L) et les rats HFD solvant ( $2,1 \pm 0,4$ mmol/L) ; (cf. figure 146).



**Figure 146** : Taux de triglycérides plasmatique en mmol/L, chez des rats soumis pendant 5 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 3 mois aux antioxydants ou à l'exercice.

NS ; Triglycéridémie ND solvant versus triglycéridémie HFD solvant, (n=5), t-test.

NS ; Triglycéridémie ND solvant versus triglycéridémie ND EGCG / PP / Exercice, (n=5), t-test.

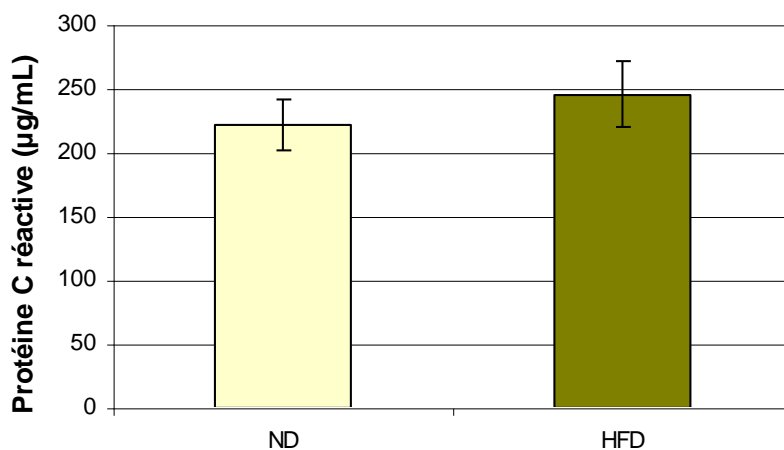
NS ; Triglycéridémie HFD solvant (n=4) versus triglycéridémie HFD EGCG / PP /exercice, (n=5), t-test.



De plus, les résultats obtenus chez les rats ND montrent que les traitements antioxydants et l'exercice ne diminuent pas significativement le taux de triglycérides (EGCG :  $1,8 \pm 0,4$ mmol/L ; PP :  $1,5 \pm 0,4$ mmol/L ; exercice :  $1,1 \pm 0,2$ mmol/L). Chez les rats HFD, les traitements et l'exercice ne modifient pas le taux de triglycérides (EGCG :  $1,9 \pm 0,3$ mmol/L ; PP :  $1,7 \pm 0,3$ mmol/L ; exercice  $2,1 \pm 0,3$ mmol/L) par rapport aux rats témoins HFD solvant ( $2,1 \pm 0,4$ mmol/L).

#### h) Dosage de la protéine C-réactive

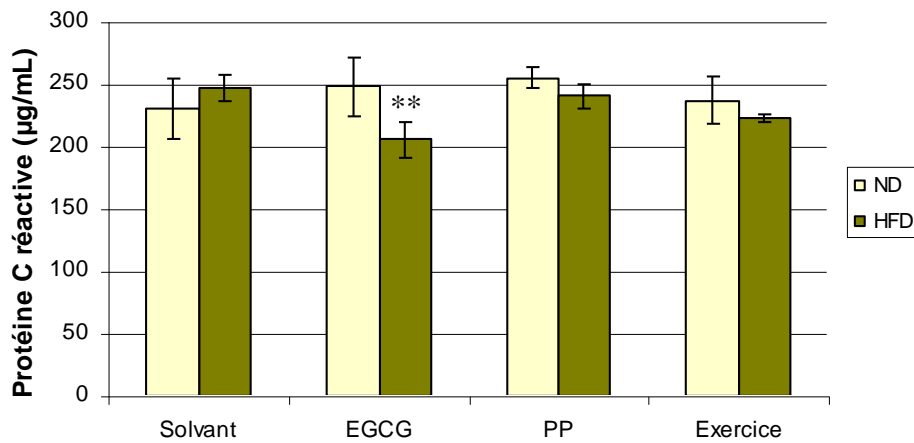
Avant l'administration des différents régimes, le taux de protéine C-réactive (CRP, « protein C-reactive ») chez les rats est de  $226,16 \pm 12,49$ mg/mL. Après deux mois de régime alimentaire, les animaux HFD présentent une CRP de  $245,77 \pm 26,44$ mg/mL qui n'est pas significativement augmentée par rapport aux animaux ND ( $221,55 \pm 20,47$ mg/mL) ; (cf. figure 147).



**Figure 147** : Taux de CRP plasmatique en µg/mL, de rats soumis à un régime ND ou HFD pendant 2 mois.

NS ; CRP des rats ND versus CRP des rats HFD, (n=3), t-test.

Lorsque les animaux sont nourris par l'alimentation HFD pendant 3 mois, les rats ne présentent pas d'augmentation significative de la CRP ( $247,36 \pm 10,67$ mg/mL) par rapport aux rats ND solvant ( $230,39 \pm 24,35$ mg/mL) ; (cf. figure 148). Les animaux ND, qu'ils reçoivent pendant un mois de l'EGCG, des PP ou qu'ils pratiquent un exercice physique, ne présentent pas de variations significatives du taux de CRP par rapport aux rats ND solvant ( $230,39 \pm 24,35$ mg/mL), qui est respectivement à  $247,98 \pm 23,42$ mg/mL, à  $254,85 \pm 8,41$ mg/mL et à  $236,77 \pm 19,34$ mg/mL. En revanche, chez les rats nourris par l'alimentation HFD, ceux recevant l'EGCG ont un taux moyen de CRP ( $205,83 \pm 14,53$ mg/mL) qui est significativement diminué ( $p < 0,01$ ) par rapport aux rats HFD solvant ( $247,36 \pm 10,67$ mg/mL). Les PP n'ont, quant à eux, pas d'effet significatif sur la CRP ( $240,86 \pm 9,87$ mg/mL) tandis que l'exercice semble diminuer le taux de CRP ( $222,86 \pm 2,47$ mg/mL).



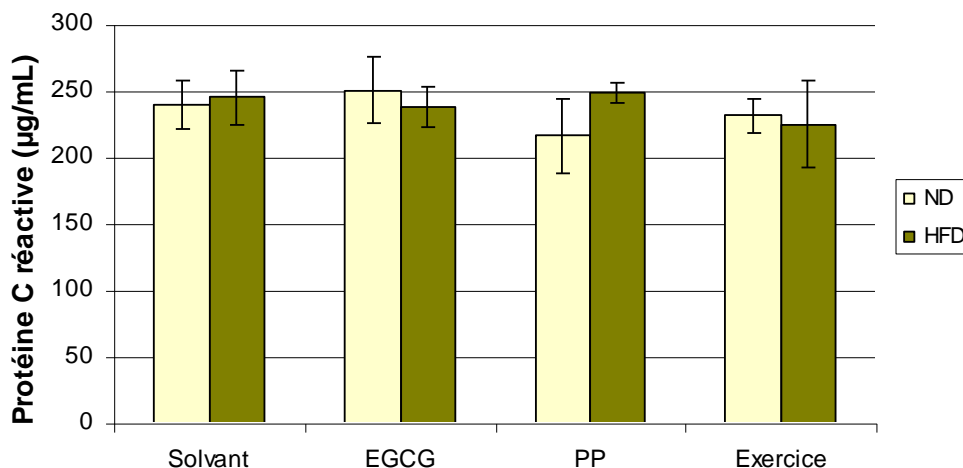
**Figure 148 : Taux de CRP plasmatique en µg/mL, de rats soumis pendant 3 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 1 mois aux antioxydants ou à l'exercice.**

NS ; CRP des rats ND solvant versus CRP des rats HFD solvant, (n=3), t-test.

NS ; CRP des rats ND solvant versus CRP des rats ND EGCG / PP / Exercice, (n=3), t-test.

\*\* : p < 0,01 ; CRP des rats HFD solvant versus CRP des rats HFD EGCG / PP /exercice, (n=3), t-test.

Après 4 mois de régime alimentaire, les rats HFD solvant ont une CRP de  $244,87 \pm 20,16$ mg/mL, qui est similaire à celle des rats nourris par l'alimentation ND et recevant le solvant ( $239,26 \pm 18,15$ mg/mL) ; (cf. figure 149). Chez les rats ND, un traitement par de l'EGCG, des PP ou l'activité physique, pendant 2 mois, n'induit pas de modification du taux de CRP chez ces animaux (EGCG :  $200,43 \pm 24,79$ mg/mL ; PP :  $216,11 \pm 27,69$ mg/mL ; exercice :  $231,45 \pm 13,19$ mg/mL). Aucune variation notable n'est également observée chez les animaux HFD qu'ils reçoivent de l'EGCG ( $237,34 \pm 15,12$ mg/mL), des PP ( $248,71 \pm 7,98$ mg/mL) ou qu'ils fassent de l'exercice ( $224,95 \pm 33,28$ mg/mL) par rapport aux rats HFD solvant.



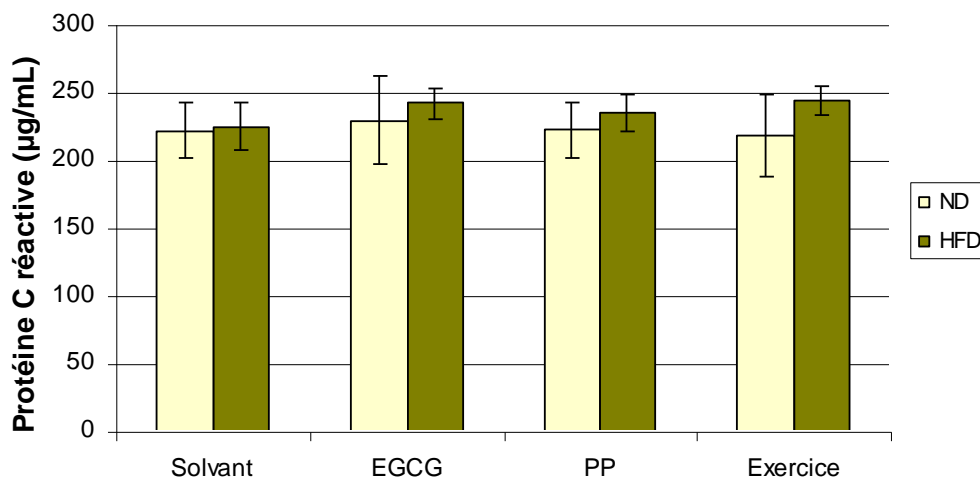
**Figure 149 : Taux de CRP plasmatique en µg/mL, de rats soumis pendant 4 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 2 mois aux antioxydants ou à l'exercice.**

NS ; CRP des rats ND solvant versus CRP des rats HFD solvant, (n=3), t-test.

NS ; CRP des rats ND solvant versus CRP des rats ND EGCG / PP / Exercice, (n=3), t-test.

NS ; CRP des rats HFD solvant versus CRP des rats HFD EGCG / PP /exercice, (n=3), t-test.

Lorsque les rats reçoivent l'alimentation HFD pendant 5 mois, et le solvant pendant 3 mois, leur taux moyen de CRP ( $224,95 \pm 17,64\text{mg/mL}$ ) n'est pas différent de celui des rats ND solvant ( $221,96 \pm 20,97\text{mg/mL}$ ) ; (cf. figure 150). Les animaux ND recevant l'EGCG, les PP ou faisant de l'exercice ne présentent pas non plus de modification de leur taux de CRP par rapport aux rats ND solvant qui est de  $221,96 \pm 20,97\text{mg/mL}$  (EGCG :  $229,45 \pm 32,14\text{mg/mL}$  ; PP :  $222,04 \pm 20,72\text{mg/mL}$  ; exercice :  $217,79 \pm 30,45\text{mg/mL}$ ). Le même constat est également fait chez les rats HFD (EGCG :  $241,88 \pm 11,78\text{mg/mL}$  ; PP :  $234,89 \pm 13,35\text{mg/mL}$  ; exercice :  $243,93 \pm 10,73\text{mg/mL}$ ) par rapport aux rats HFD solvant.



**Figure 150** : Taux de CRP plasmatique en  $\mu\text{g/mL}$ , de rats soumis pendant 5 mois aux régimes ND ou HFD et pendant 3 mois aux antioxydants ou à l'exercice.

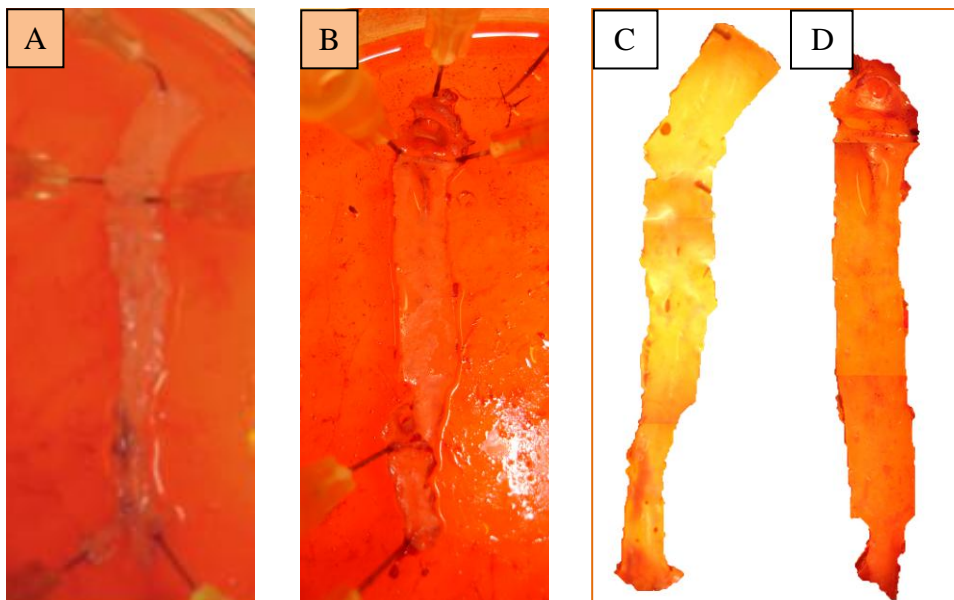
NS ; CRP des rats ND solvant versus CRP des rats HFD solvant, (n=3), t-test.

NS ; CRP des rats ND solvant versus CRP des rats ND EGCG / PP / Exercice, (n=3), t-test.

NS ; CRP des rats HFD solvant versus CRP des rats HFD EGCG / PP /exercice, (n=3), t-test.

### 3. [Complications cardiovasculaires : dépôt de plaques d'athérome dans l'aorte](#)

Après 2 mois de régime alimentaire ND ou HFD, nous avons voulu voir si des plaques de lipides se déposaient dans les vaisseaux de nos animaux, en particulier chez les rats HFD, par coloration des aortes au rouge Sudan IV. Les rats ND ne présentent pas de plaques d'athérome dans l'aorte, ce qui est caractérisé par l'absence de plaque rouge. Les animaux nourris par le régime HFD ne présentent pas non plus de plaques rouges (cf. figure 151).



**Figure 151** : Photographies d'aortes colorées au rouge Sudan IV, de rats nourris pendant 2 mois par les régimes ND ou HFD.

Les photographies ont été prises directement sur la boîte de Pétri gélosée (ND : A et HFD : B) ou sous loupe binoculaire (ND : C et HFD : D).

Après 5 mois de régime alimentaire, les rats soumis au régime HFD ne présentent pas de plaques rouges dans les aortes comme les rats ND (cf. figure 152). De plus, des résultats similaires sont observés pour les temps d'étude intermédiaires.

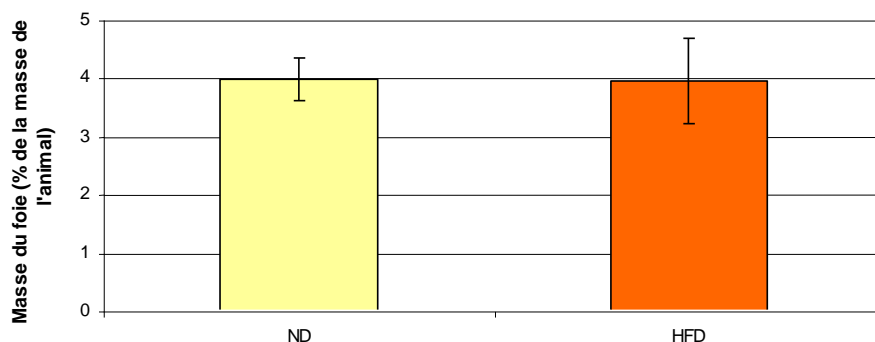


**Figure 152** : Photographies d'aortes colorées au rouge Sudan IV, de rats nourris pendant 5 mois par les régimes ND (gauche) ou HFD (droite).

#### 4. Complication hépatique

##### a) Étude de la masse des foies

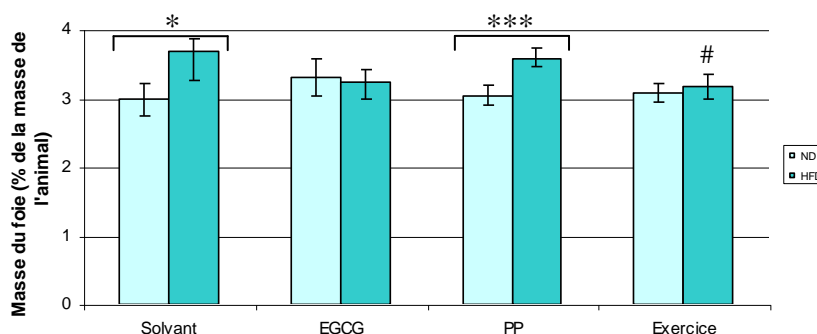
Après chaque sacrifice, les foies des rats ont été pesés et rapportés à la masse de l'animal. Les rats nourris par l'alimentation HFD pendant deux mois ont la même masse du foie ( $3,9 \pm 0,7\%$ ) que les rats nourris par l'alimentation ND ( $4,0 \pm 0,4\%$ ) ; (cf. figure 153).



**Figure 153** : Masse du foie total rapportée à la masse des rats soumis à un régime ND ou HFD pendant 2 mois.

NS ; % de masse du foie de rat ND (n=5) % de masse du foie de rat HFD (n=4), t-test.

En revanche, après trois mois de régime hypercalorique ou normocalorique, la masse de foie des rats HFD est augmentée de façon significative à  $3,7 \pm 0,4\%$  ( $p < 0,05$ ) par rapport au témoin ND dont la masse n'est que de  $3,0 \pm 0,2\%$  (cf. figure 154). Les antioxydants et l'activité physique n'ont pas d'incidence sur la masse du foie chez les animaux témoins ND. En revanche, les polyphénols augmentent de façon significative la masse du foie des animaux HFD ( $3,6 \pm 0,1\%$  ;  $p < 0,001$ ) par rapport aux animaux témoins ND + PP ( $3,0 \pm 0,1\%$ ). L'exercice quand à lui, diminue significativement la masse du foie des animaux HFD qui n'est plus que de  $3,2 \pm 0,2\%$  par rapport aux animaux HFD ne recevant que le solvant ( $3,7 \pm 0,4\%$ ).



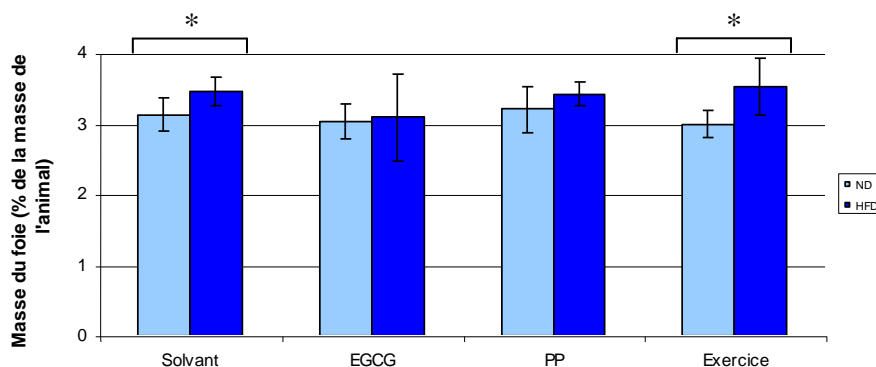
**Figure 154** : Masse du foie total rapportée à la masse des rats soumis à un régime ND ou HFD pendant 3 mois et à un traitement par des antioxydants ou la pratique d'un exercice physique pendant un mois.

\* :  $p < 0,05$  ; Masse du foie de rat ND solvant versus masse du foie de rat HFD solvant (n=5), t-test.

\*\*\* :  $p < 0,001$  ; Masse du foie de rat ND + PP versus masse du foie de rat HFD + PP (n=5), t-test.

# :  $p < 0,05$  ; Masse du foie de rat HFD solvant versus masse du foie de rat HFD + Exercice (n=5), t-test.

Lorsque les animaux sont soumis à 4 mois de régime alimentaire ND ou HFD, la masse du foie total mesurée lors du sacrifice est significativement augmentée chez les animaux HFD solvant ( $3,5 \pm 0,2\%$  ;  $p < 0,05$ ) alors qu'elle n'est que de  $3,1 \pm 0,2\%$  chez les animaux témoins ND solvant (cf. figure 155).



**Figure 155** : Masse du foie total rapportée à la masse des rats soumis à un régime ND ou HFD pendant 4 mois et à un traitement par des antioxydants ou la pratique d'un exercice physique pendant 2 mois.

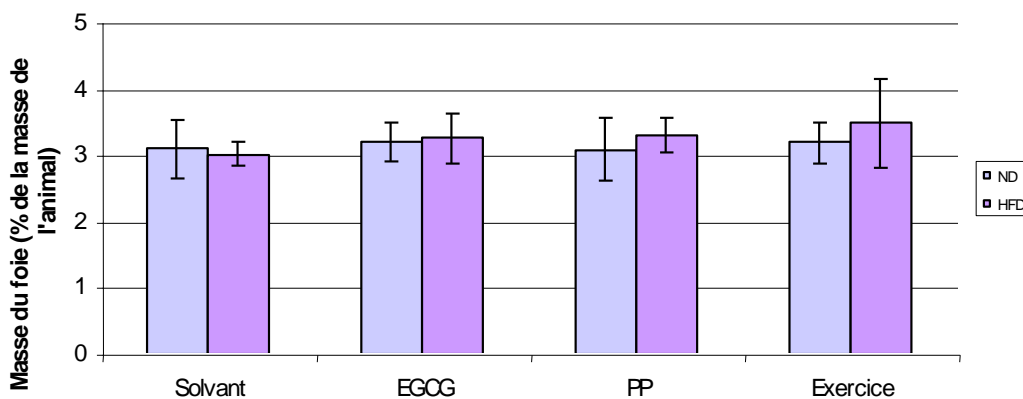
\* :  $p < 0,05$  ; Masse du foie de rat ND solvant versus masse du foie de rat HFD solvant ( $n=5$ ), t-test.

\* :  $p < 0,05$  ; Masse du foie de rat ND + Exercice versus masse du foie de rat HFD + exercice ( $n=5$ ), t-test.

NS ; Masse du foie de rat HFD solvant versus masse du foie de rat HFD EGCG / PP / exercice ( $n=5$ ), t-test.

Les antioxydants utilisés ne modifient pas la masse du foie des animaux ND solvant et HFD solvant, mais une augmentation significative de la masse du foie des rats soumis au régime hypercalorique et à l'exercice est observée ( $3,5 \pm 0,4\%$  ;  $p < 0,05$ ) par rapport aux rats ND soumis à ce même exercice ( $3,0 \pm 0,2\%$ ).

A la fin de l'étude, les animaux ne présentent pas de modification de leur masse du foie qu'ils soient soumis à un régime ND ou HFD, en présence ou non d'antioxydants, pratiquant ou non une activité physique (cf. figure 156). En effet, celle-ci représente environ 3% de la masse totale de chaque rat.



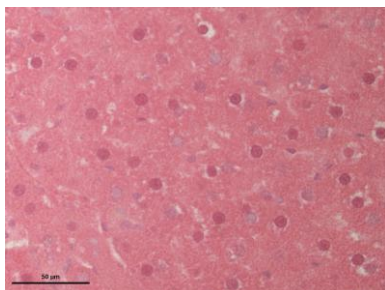
**Figure 156** : Masse du foie total rapportée à la masse des rats soumis à un régime ND ou HFD pendant 5 mois et à un traitement par des antioxydants ou la pratique d'un exercice physique pendant 3 mois.

NS ; ( $n=5$ ), t-test.

## b) Étude histologique par la coloration Hématoxyline / Éosine

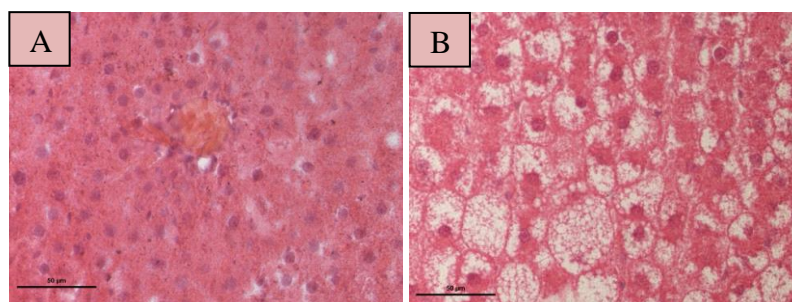
L'étude histologique du foie a été réalisée par la coloration HE et la stéatose est évaluée par le système de score défini par Kleiner *et al.* (2005).

Au début de l'étude, avant l'administration des régimes alimentaires, les hépatocytes des rats ne présentent pas de gouttelettes de lipides (cf. figure 157). Le score de stéatose est de 0.



**Figure 157** : Photographies de coupes histologiques du foie de rats avant l'administration des régimes.

Les animaux suivant le régime ND pendant deux mois ne présentent pas de stéatose (cf. figure 158 A) contrairement aux animaux nourris par le régime HFD (cf. figure 158 B). Cette stéatose représente entre 33 et 66% du tissu ce qui correspond à un score de 2.



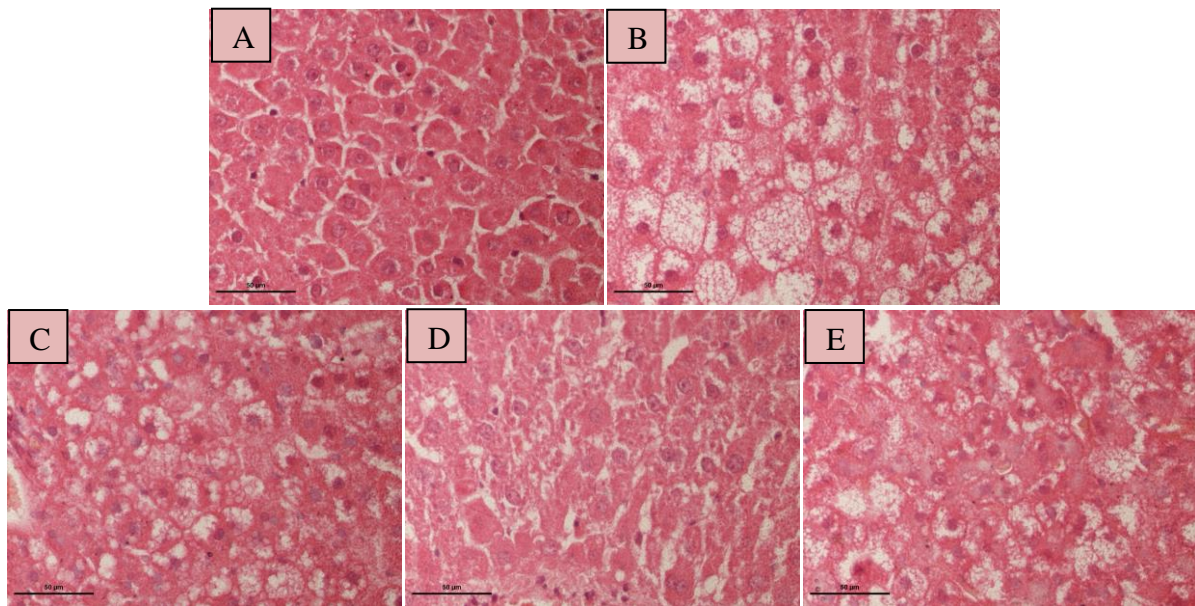
**Figure 158** : Photographies de coupes histologiques de foie de rats colorées à la HE soumis aux régimes ND ou HFD pendant 2 mois.

Les rats ont été nourris par alimentation ND (A) ou HFD (B) pendant deux mois.

Après 3 mois de régime alimentaire ND, les animaux ne présentent pas de stéatose hépatique (cf. figure 159 A), de même que les animaux ND recevant soit l'EGCG, soit les polyphénols de vin rouge, ou pratiquant une activité physique quotidienne (résultats non montrés) pendant un mois. Cependant, les animaux recevant l'alimentation HFD montrent des gonflements des hépatocytes, donc de la stéatose sur plus de 2/3 de la lame soit un score de stéatose de 3 (cf. figure 159 B). Le traitement par de l'EGCG pendant un mois chez les animaux HFD ne modifie pas l'aspect histologique du tissu hépatique, les hépatocytes sont gonflés et présentent des vacuoles de lipides.



Le résultat est similaire à ce qui a été obtenu pour le tissu hépatique de rats soumis au régime HFD témoin (solvant), le score pour cette coupe étant de 3 (cf. figure 159 C).



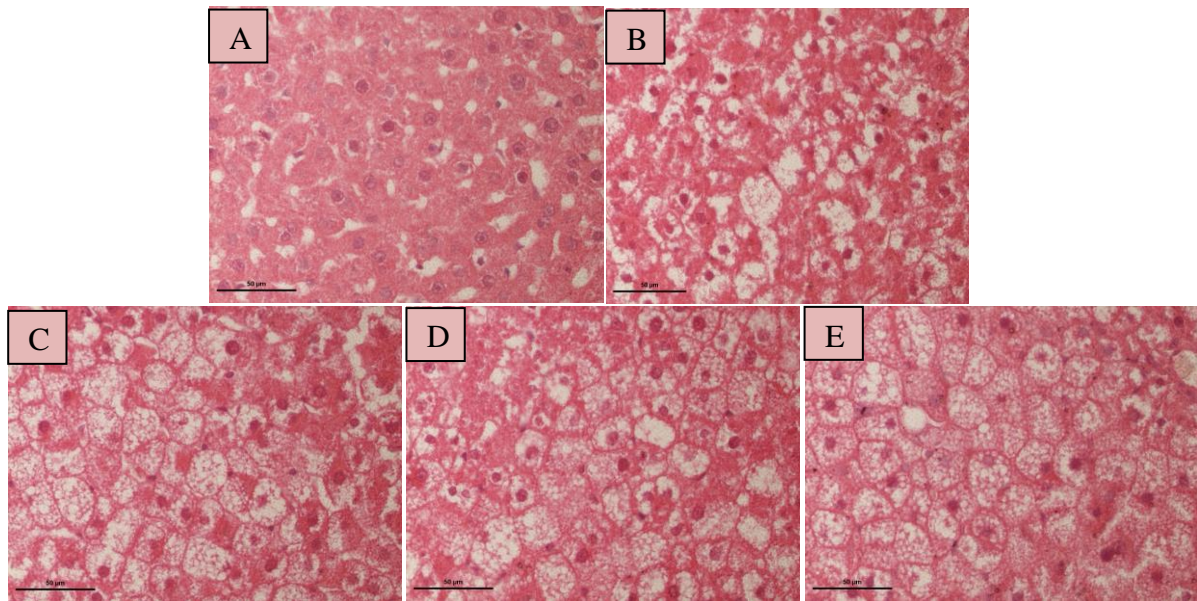
**Figure 159** : Photographies de coupes de foie de rats colorées à la HE et nourris par alimentation ND ou HFD pendant 3 mois et ayant reçu des antioxydants ou pratiquant une activité physique pendant un mois.

Les rats ont été nourris pendant 3 mois au régime ND (A) ou HFD (B), et ces derniers ont reçu pendant un mois, de l'EGCG (C), des PP (D) ou ont pratiqué un exercice (E).

Lorsque les animaux reçoivent des polyphénols de vin rouge pendant un mois en plus de l'alimentation HFD, le tissu présente de rares gonflements d'hépatocytes, la stéatose est présente mais dans une proportion comprise entre 5 et 33% (score 1); (cf. figure 159 D). Un résultat similaire est obtenu pour les animaux pratiquant une activité physique avec un régime HFD, la stéatose est fortement réduite (entre 5 et 33%) et correspond à un score de 1 (cf. figure 159 F).

Lorsque les animaux sont soumis à 4 mois de régime ND, la stéatose est absente (score 0) et les hépatocytes sont d'un point de vue histologique normaux (cf. figure 160 A). En revanche, lorsqu'ils sont nourris par l'alimentation HFD, plus de 66% de stéatose est présente dans le tissu hépatique, ce qui correspond à un score de 3 (cf. figure 160 B). Les animaux ND recevant les antioxydants ou faisant de l'exercice pendant 2 mois, ne présentent pas de modifications du tissu hépatique par rapport aux rats témoins ND solvant (résultats non montrés). Lorsque ce sont les rats HFD qui reçoivent les antioxydants ou qui pratiquent l'exercice physique, aucune différence n'est observée dans le tissu hépatique par rapport à celui des rats HFD témoins solvant (cf. figure 160 B). Les hépatocytes apparaissent gonflés avec des vacuoles de lipides que ce soit en présence d'EGCG

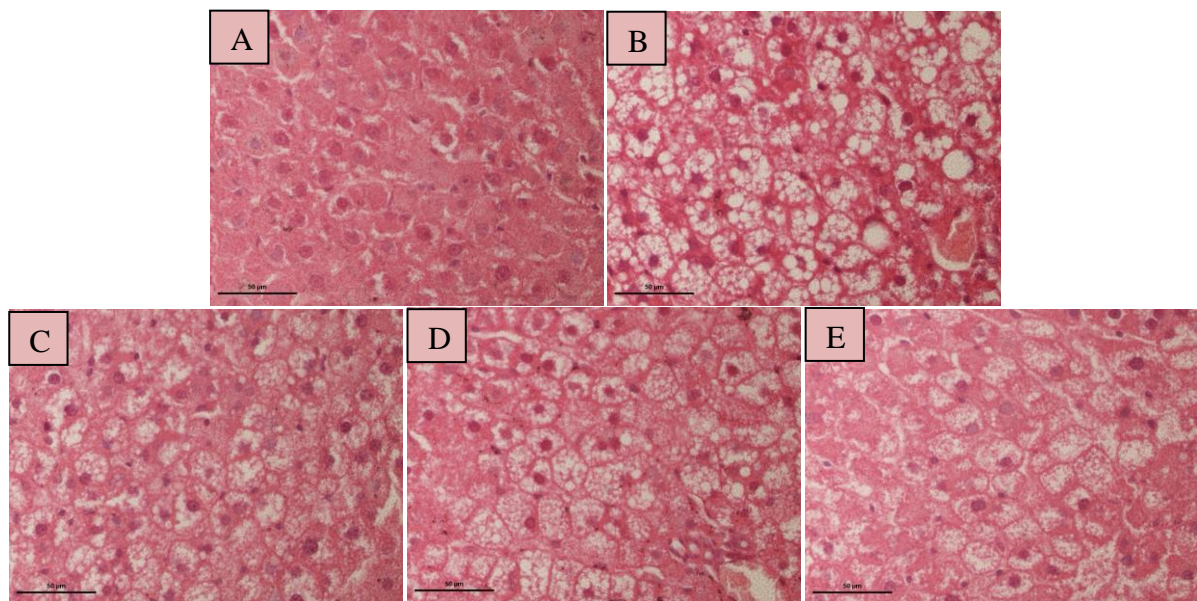
(cf. figure 160 C), de PP (cf. figure 160 D) ou d'exercice (cf. figure 160 E). Pour ces trois conditions, le score de stéatose est de 3.



**Figure 160** : Photographies de coupes de foie de rats colorées à la HE et nourris par alimentation ND ou HFD pendant 4 mois et ayant reçu des antioxydants ou pratiquant une activité physique pendant 2 mois.

Les rats ont été nourris pendant 4 mois au régime ND (A) ou HFD (B), et ces derniers ont reçu pendant 2 mois, de l'EGCG (C), des PP (D) ou ont pratiqué un exercice (E).

Lorsque les animaux sont soumis à 5 mois de régime ND, aucune stéatose n'est visible pour les animaux de ce groupe (cf. figure 161 A).



**Figure 161** : Photographies de coupes de foie de rats colorées à la HE et nourris par alimentation ND ou HFD pendant 5 mois et ayant reçu des antioxydants ou pratiquant une activité physique pendant 3 mois.

Les rats ont été nourris pendant 5 mois au régime ND (A) ou HFD (B), et ces derniers ont reçu pendant 3 mois, de l'EGCG (C), des PP (D) ou ont pratiqué un exercice (E).

Des résultats similaires sont observés pour les animaux ND traités par l'EGCG, les PP ou pratiquant une activité physique par rapport aux rats ND solvant (résultats non montrés). Cependant, lorsque les animaux sont soumis au régime HFD, la stéatose est présente à plus de 66% sur la lame (cf. figure 161 B). Les différents traitements (EGCG et PP) ainsi que l'exercice, n'ont aucun effet sur le développement de la stéatose (cf. figure 161 C, D et E) par rapport aux rats HFD solvant ; le score de stéatose pour ces trois conditions est de 3.

Récapitulatifs des scores de stéatose obtenus au cours de l'étude :

Au cours de l'étude, les rats ND ne développent pas de stéatose, au contraire des rats HFD, dont le score de stéatose est de 2, après 2 mois de régime hypercalorique (cf. figure 162). Cette stéatose évolue et devient diffuse sur tout le tissu hépatique après 3 mois de régime, pour atteindre un score de 3.

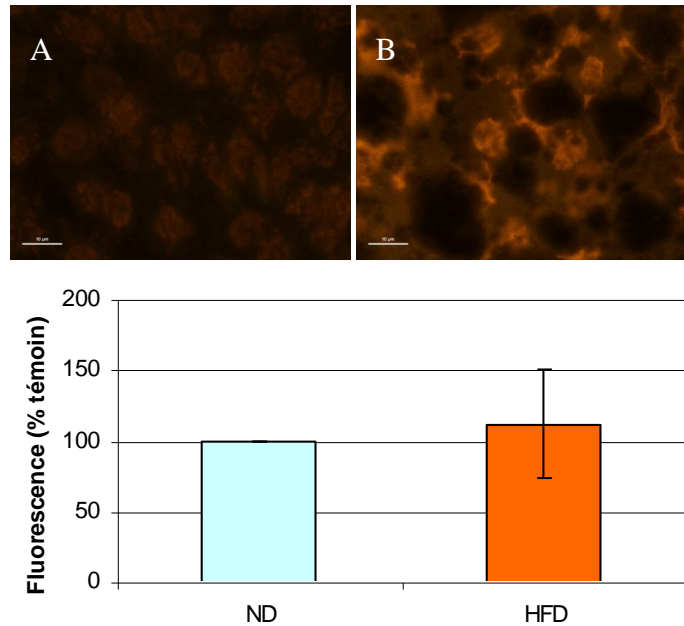
<b>Temps du régime alimentaire</b>	<b>0 mois</b>	<b>2 mois</b>	<b>3 mois</b>	<b>4 mois</b>	<b>5 mois</b>
<b>Temps Antioxydants / exercice</b>	<b>/</b>	<b>/</b>	<b>1 mois</b>	<b>2 mois</b>	<b>3 mois</b>
<b>ND + eau / solvant</b>	0	0	0	0	0
<b>ND + EGCG</b>	/	/	0	0	0
<b>ND + PP</b>	/	/	0	0	0
<b>ND + Exercice</b>	/	/	0	0	0
<b>HFD + eau / solvant</b>	/	2	3	3	3
<b>HFD + EGCG</b>	/	/	3	3	3
<b>HFD + PP</b>	/	/	1	3	3
<b>HFD + Exercice</b>	/	/	1	3	3

**Figure 162 : Scores de stéatose hépatique obtenus chez les rats au cours de l'étude.**



c) Marquage du foie à la DHE

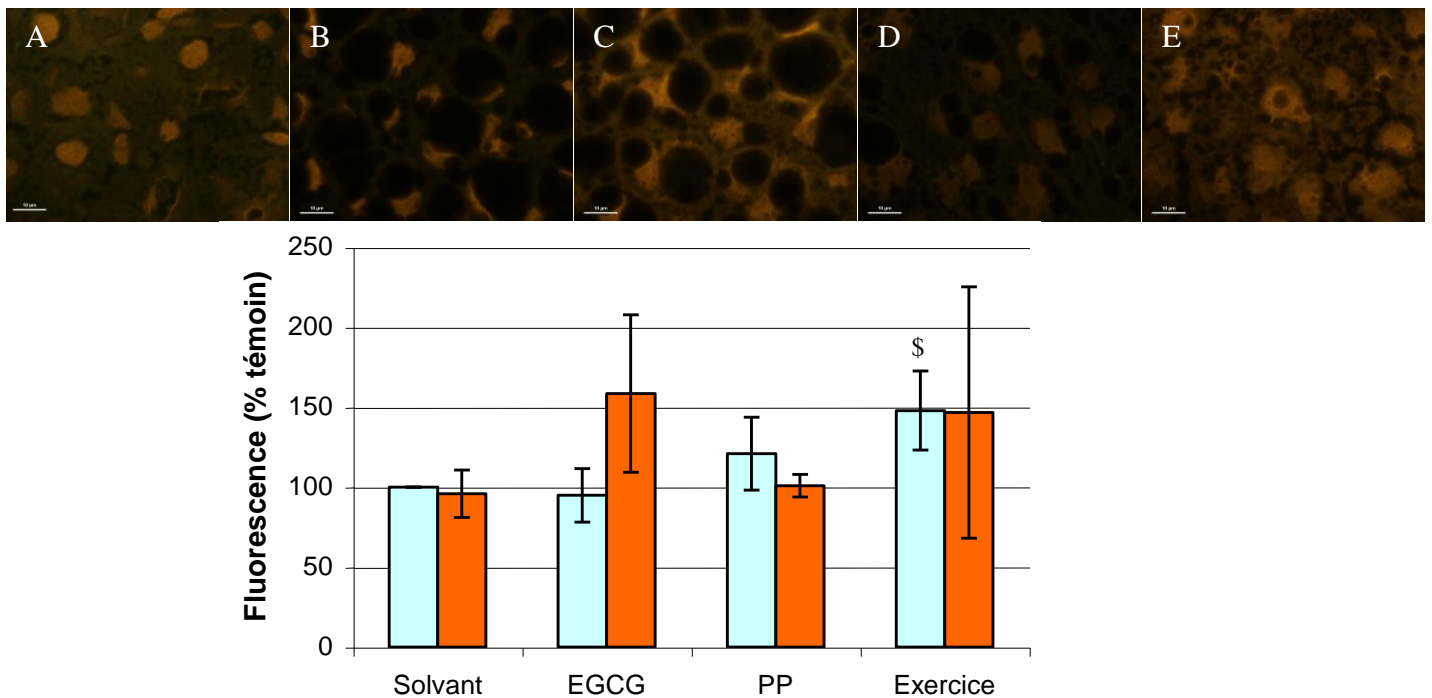
L'évaluation du stress oxydant dans le foie a été réalisée par la sonde DHE. Les résultats montrent que les rats soumis au régime HFD pendant 2 mois, présentent une fluorescence rougeâtre des noyaux à la DHE ( $111,50 \pm 38,48\%$ ) similaire à celle des rats ND (100%) ; (cf. figure 163). Des différences visuelles existent entre les marquages du pancréas des rats HFD (cf. figure 163 B) et des rats ND (cf. figure 163 A). Cependant, ces différences ne sont pas significatives lors de l'analyse de fluorescence sur un nombre d'échantillon égal à 3.



**Figure 163** : Quantification de la sonde DHE en % sur des coupes de foie de rats nourris par alimentation ND (A) ou HFD (B) pendant 2 mois.

NS ; Fluorescence ND versus fluorescence HFD, (n=3), t-test.

Lorsque les animaux reçoivent pendant 3 mois l'alimentation HFD, l'intensité de fluorescence de la DHE ( $95,89 \pm 14,80\%$ ) est similaire à celle des rats ND solvant (100%) ; (cf. figure 164). Le traitement des animaux ND par les antioxydants ne modifie pas de façon significative la fluorescence (EGCG :  $94,98 \pm 16,77\%$  ; PP :  $121,06 \pm 22,74\%$ ) par rapport aux rats ND solvant. En revanche, l'exercice induit une augmentation significative de la fluorescence ( $147,99 \pm 24,70\%$  ;  $p < 0,05$ ) par rapport au rats ND solvant. Dans le groupe de rats nourris par l'alimentation HFD, quel que soit le traitement administré, l'analyse de la fluorescence des hépatocytes de ces animaux ne donne pas de résultats significativement différents de ceux obtenus pour les rats HFD solvant (EGCG :  $158,61 \pm 49,27\%$  ; PP :  $100,87 \pm 7,04\%$  ; exercice :  $146,78 \pm 78,53\%$ ). D'un point de vue qualitatif, les PP semblent diminuer la fluorescence (cf. figure 164 D) par rapport aux rats HFD solvant (cf. figure 164 B). L'EGCG et l'exercice semblent au contraire augmenter la fluorescence du tissu (cf. figure 164 C et E, respectivement).



**Figure 164 :** Quantification de la sonde DHE en % sur des coupes de foie de rats nourris par alimentation ND ou HFD pendant 3 mois et traités par les antioxydants ou l'exercice, pendant 1 mois.

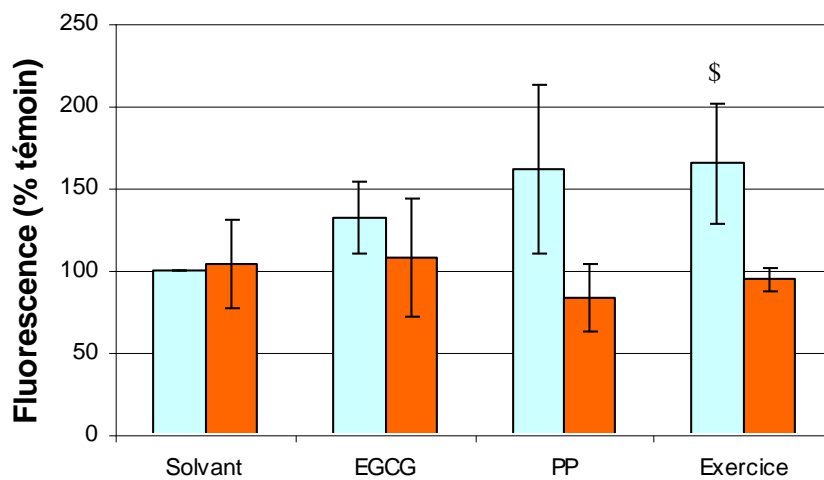
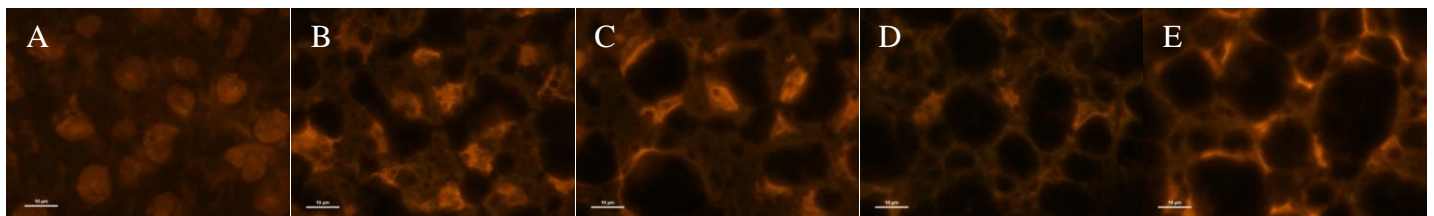
Rats ND (A), HFD (B), HFD + EGCG (C), HFD + PP (D) et HFD + Exercice (E).

NS ; Fluorescence ND versus fluorescence HFD, (n=3), t-test.

\$ :  $p < 0,05$  ; Fluorescence ND solvant versus fluorescence ND EGCG / PP / exercice, (n=3), t-test.

NS ; Fluorescence HFD solvant versus fluorescence HFD EGCG / PP / exercice, (n=3), t-test.

Après 4 mois de régime HFD, l'intensité de fluorescence de la DHE ( $103,43 \pm 26,92\%$ ) est similaire à celle des rats ND (100%) ; (cf. figure 165, 165 B et A, respectivement). Dans le groupe des rats ND, l'exercice physique induit une augmentation significative de la fluorescence ( $165,24 \pm 36,59\%$ ) par rapport aux rats ND solvant alors que les antioxydants ne modifient pas de façon significative cette fluorescence (EGCG :  $132,08 \pm 22,15\%$  ; PP :  $161,93 \pm 51,04\%$ ). Chez les rats HFD, aucun des traitements utilisés ne semble modifier la fluorescence observée dans le tissu hépatique (EGCG :  $107,69 \pm 35,74\%$  ; PP :  $83,18 \pm 20,64\%$  ; exercice :  $94,28 \pm 7,08\%$ ) par rapport aux rats HFD solvant ( $103,43 \pm 26,92\%$ ). En revanche, d'un point de vue qualitatif, les photographies semblent montrer une diminution de la fluorescence du tissu en présence de PP (cf. figure 165 D) contrairement au traitement par l'EGCG (cf. figure 165 C) et par l'exercice (cf. figure 165 E).



**Figure 165** : Quantification de la sonde DHE en % sur des coupes de foie de rats nourris par alimentation ND ou HFD pendant 4 mois et traités par les antioxydants ou l'exercice, pendant 2 mois.

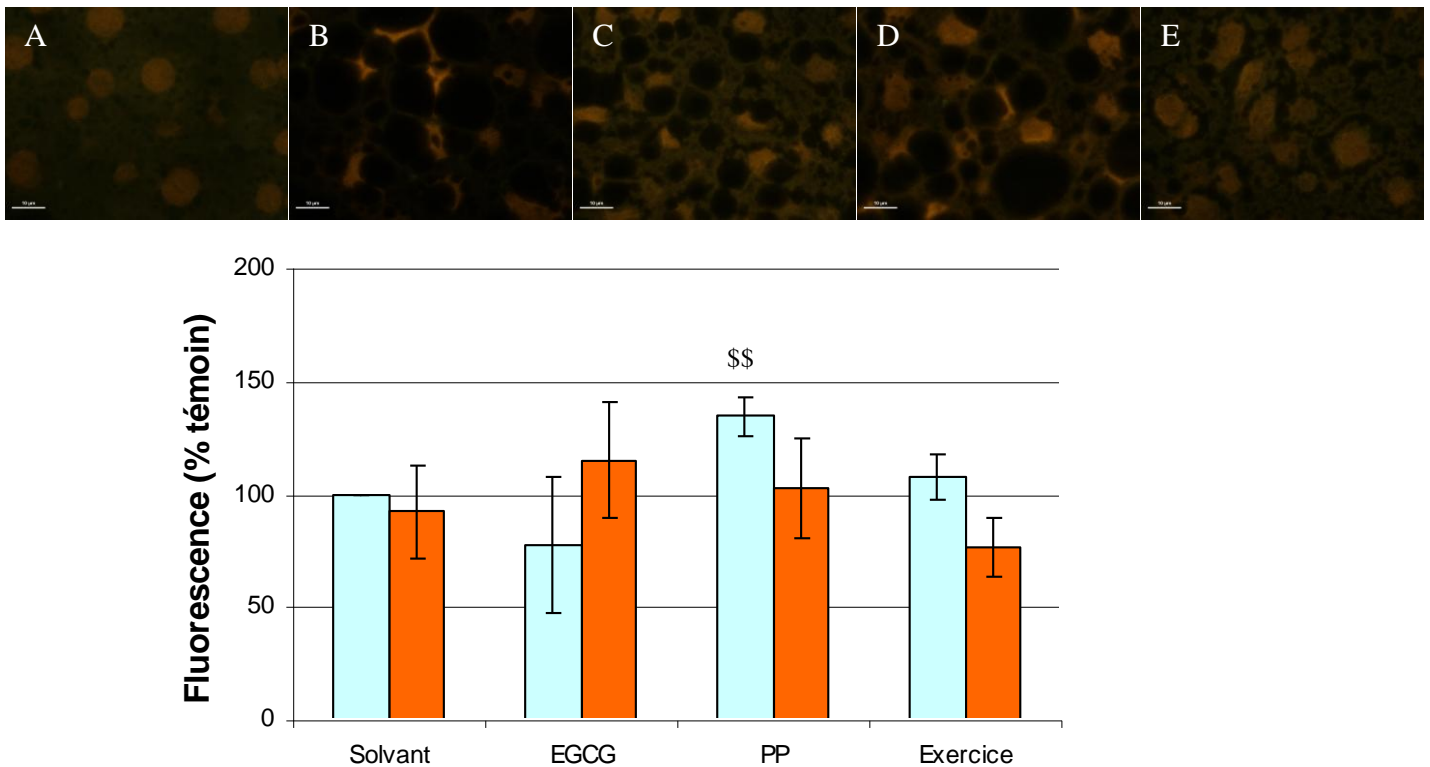
Rats ND (A), HFD (B), HFD + EGCG (C), HFD + PP (D) et HFD + Exercice (E).

NS ; Fluorescence ND versus fluorescence HFD, (n=3), t-test.

\$ :  $p < 0,05$  ; Fluorescence ND solvant versus fluorescence ND EGCG / PP / exercice, (n=3), t-test.

NS ; Fluorescence HFD solvant versus fluorescence HFD EGCG / PP / exercice, (n=3), t-test.

A la fin de l'étude, après 5 mois de régime HFD, les rats ne présentent pas de modification significative de la fluorescence due à la DHE dans les hépatocytes ( $92,12 \pm 20,33\%$ ) par rapport aux rats ND ( $100\%$ ) ; (cf. figure 166). De plus, dans le groupe ND, le traitement par les PP augmente significativement la fluorescence ( $134,21 \pm 8,83\%$ ) par rapport aux rats ND solvant. L'exercice et l'EGCG n'ont pas d'effet sur celle-ci. Enfin, chez les rats HFD, aucun traitement n'induit de modification de fluorescence des hépatocytes des rats de ces groupes (EGCG :  $115,06 \pm 25,23\%$  ; PP :  $102,61 \pm 21,87\%$  ; exercice :  $76,87 \pm 12,86$ ) par rapport au solvant ( $92,12 \pm 20,33\%$ ). Ces données sont en accord avec ce qui a été observé d'un point de vue qualitatif : que les rats HFD reçoivent le solvant (cf. figure 166 B), l'EGCG (cf. figure 166 C), les PP (cf. figure 166 D) ou pratiquent une activité (cf. figure 166 E), la fluorescence ne semble pas modifiée.



**Figure 166** : Quantification de la sonde DHE en % sur des coupes de foie de rats nourris par alimentation ND ou HFD pendant 5 mois et traités par les antioxydants ou l'exercice, pendant 3 mois.

NS ; Fluorescence ND versus fluorescence HFD, (n=3), t-test.

\$\$ :  $p < 0,01$  ; Fluorescence ND solvant versus fluorescence ND EGCG / PP / exercice, (n=3), t-test.

NS ; Fluorescence HFD solvant versus fluorescence HFD EGCG / PP / exercice, (n=3), t-test.



## Discussion *in vitro*

Les résultats de viabilité des cellules RINm5F obtenus en présence de trois molécules chimiques différentes et mesurés par la technique du Cell Titer, ont permis d'établir trois modèles distincts de stress oxydant sur les cellules  $\beta$  de rat. Ainsi, que l'apport de molécules oxydantes soit direct comme avec le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  ou l'anion superoxyde généré par le couple enzyme – substrat hypoxanthine / xanthine oxydase, ou que la génération d'entité oxydante au niveau mitochondrial soit induite par l'ajout d'un composé comme la streptozotocine (antibiotique et anticancéreux), des pertes de viabilité importantes ont été mises en évidence sur les cellules RINm5F à des concentrations et des temps d'incubation différents.

Ainsi, le premier modèle de stress oxydant a été défini par l'ajout de  $40\mu\text{mol/L}$  de peroxyde d'hydrogène pendant 30 minutes sur les cellules  $\beta$  pancréatiques de rat RINm5F. Sur un autre modèle de cellules  $\beta$  de rat (INS-1), Lee *et al.* (2008) ont utilisé une dose plus forte, soit  $200\mu\text{mol/L}$  de peroxyde d'hydrogène pendant deux heures pour obtenir une mort cellulaire similaire à ce que nous avons obtenu. De même que Kimoto *et al.* (2003) ont induit une perte de viabilité de cellules  $\beta$  de souris (MIN-6) de 30% environ, en incubant les cellules pendant six heures avec  $150\mu\text{mol/L}$  alors que Rasilainen *et al.* (2002) ont obtenu des résultats similaires aux nôtres pour des doses de 50 et  $100\mu\text{mol/L}$  de peroxyde d'hydrogène pendant une heure. Ces données semblent souligner l'extrême sensibilité des RINm5F au peroxyde d'hydrogène pour des doses et des temps d'incubation variables. Le second modèle de stress oxydant est défini par  $25\text{mmol/L}$  de STZ, pendant deux heures. Les données de la littérature ont montré que sur les RINm5F, d'autres conditions de stress avec des doses plus faibles (5 et  $10\text{mmol/L}$ ) sur des temps plus long (24 heures), induisaient une perte de viabilité similaire à ce que nous avons obtenus (Latha *et al.*, 2004 ; Kang *et al.*, 2007). Enfin, le troisième modèle de stress oxydant mis en place est induit par  $0,25\text{mmol/L}$  d'HX couplée à  $10\text{mU/mL}$  de XO, pendant une heure. Moriscot *et al.* (2003) ont utilisé des concentrations similaires en HX et XO pour induire un stress oxydant sur les cellules INS-1. Ces résultats sont également en accord avec ceux obtenus par Tiedge *et al.* (1998).

Par ailleurs, cinq antioxydants, extraits ou molécules synthétiques, ont été choisis afin d'étudier leur effet sur les cellules RINm5F. Le choix des molécules antioxydantes s'est porté sur : un extrait de polyphénols de vin rouge de Corbières (AOC), l'épigallocatechine gallate, composé majeur du thé vert, le resvératrol *trans* et son stéréoisomère *cis*, et la procyanidine B2. A faible concentration, les cinq antioxydants ont un effet positif sur la prolifération des cellules et/ou

sur l'activité mitochondriale des cellules RINm5F. En effet, une augmentation de la viabilité des cellules a été observée pour les PP jusqu'à 200µg/mL et pour le Rt et le Rc jusqu'à 200µmol/L. Kristl *et al.* (2009) ont montré qu'avec de faibles concentrations en resvératrol, les capacités antioxydantes de cellules HEK293 étaient améliorées. En effet, au-delà de ces concentrations, une perte de viabilité significative a été observée pouvant aller jusqu'à 80% de perte des cellules. A ces fortes doses, les molécules sont devenues pro-oxydantes, ce qui souligne le postulat que tout antioxydant ou molécule peut devenir pro-oxydant ou toxique si les doses utilisées sont trop importantes. Ainsi, des études ont montré que certaines vitamines antioxydantes ou des polyphénols pouvaient avoir des effets pro-oxydants. Chedea *et al.* (2010) ont souligné l'effet pro-oxydant d'un extrait de pépin de raisin en fonction de la dose et de la durée de l'étude. D'autre part, Frankel *et al.*, (1997) ont démontré que de fortes concentrations en extrait de thé vert induisaient une pro-oxydation. Enfin, les résultats de Barbehenn *et al.* (2005) sur le tractus digestif de certains insectes, montrent qu'en présence de métaux de transition non absorbés et de hautes concentrations en phénols ingérés, des effets pro-oxydants sont induits. Cependant, pour la procyanidine B2 et l'EGCG du thé vert, aucune perte de viabilité n'a été démontrée dans notre étude. Pourtant, Suh *et al.* (2010) ont montré que des concentrations en EGCG comprises entre 5 et 100µmol/L (2,3µg/mL et 45,8µg/mL) induisaient une perte de viabilité sur une lignée de cellules β de hamster (HIT-T15). Yin *et al.* (2009) ont également montré l'effet pro-oxydant toxique de l'EGCG sur des cellules neuronales après douze heures d'incubation de la molécule à 100µmol/L. De même pour la procyanidine B2 qui est utilisée à des doses beaucoup plus faibles que celles utilisées dans notre étude. En effet, Cho *et al.* (2009) ont montré que la procyanidine B2 à faible concentration protégeait de l'apoptose et du stress oxydant induit par le 4-HNE (4-Hydroxynonanal), un lipide peroxydé, sur des cellules nerveuses PC12. Il semblerait que les RINm5F soient tolérantes ou résistantes à ces deux molécules, même à fortes concentrations, contrairement aux autres lignées citées.

Après avoir déterminé les gammes de concentration en antioxydants à utiliser, l'étude du pouvoir antioxydant des molécules a été réalisée sur les RINm5F. L'étude des cinq molécules antioxydantes sur les trois modèles de stress établis a démontré d'une part, l'effet préventif majeur de l'extrait de polyphénols de vin rouge et de l'extrait de thé vert (EGCG) sur la viabilité des cellules RINm5F ; et d'autre part, un effet moindre des trois autres antioxydants testés : le resvératrol *cis* et *trans* et la procyanidine B2. Les extraits de polyphénols utilisés contiennent déjà du resvératrol (*cis* et *trans*) et de la procyanidine, mais c'est la diversité et la richesse du mélange qui montre des effets plus importants sur les cellules. Ces données sont en accord avec la littérature car, dans l'athérosclérose, Khan *et al.* (2002) ont montré qu'un extrait de polyphénols de vin rouge

pouvait réduire le développement de cette pathologie de façon plus importante que les autres antioxydants du vin rouge testés seuls (anthocyanines, catéchines, resvératrol et quercétine). De plus, en 2000, Tedesco *et al.* ont montré qu'un extrait de vin rouge vieilli en fût de chêne avait un effet protecteur plus important que le resvératrol et la quercétine, lorsque des globules rouges étaient soumis à un stress oxydant par le peroxyde d'hydrogène. Cela souligne le fait que les différents éléments d'un extrait peuvent produire des effets qui ne sont pas nécessairement des propriétés des composants seuls et que les différentes classes de polyphénols ou molécules d'une même classe peuvent agir en synergie pour exercer un effet plus important. Cependant, dans le cas de l'extrait de thé vert, le contraire est observé. En effet, l'extrait utilisé est pur et contient l'EGCG, qui a démontré des effets majeurs voire supérieurs à ceux de l'extrait de PP. Dans ce cas-ci, l'effet bénéfique observé est uniquement du à l'EGCG. Tinahones *et al.* (2008) ont observé des modifications des fonctions vasculaires et une diminution de l'oxydation du sérum, chez des femmes ayant consommé un extrait de thé vert contenant 72% d'EGCG et 5-10% de caféine. Dans cette étude, il a été établi que l'effet observé était uniquement du à l'EGCG. Le rôle important des catéchines seules et en particuliers de l'EGCG a également été souligné par Coyle *et al.* (2008). Dans leur étude, aucun effet protecteur d'un extrait de thé vert n'a été observé sur une lignée cellulaire de la vessie stressée par le peroxyde d'hydrogène, contrairement aux catéchines seules et notamment l'EGCG. Ces données soulignent la complexité de molécules et d'actions, qui peut exister dans un extrait : tantôt l'extrait total a plus d'effets que les molécules isolées de l'extrait, tantôt, une molécule est biologiquement plus efficace que l'extrait total.

Dès lors, pour la poursuite de l'étude, nous avons choisi de ne garder que les deux extraits au fonctionnement, semble-t-il, opposé : les extraits de PP de vin rouge Corbières et l'EGCG du thé vert.

La prévention de la perte de viabilité observée avec les antioxydants en présence des molécules induisant un stress a été déterminée par le test de viabilité au Cell Titer. Celui-ci reposant sur la mesure de l'activité de l'enzyme déshydrogénase mitochondriale, nous avons voulu confirmer les résultats de viabilité par mesure de l'apoptose des cellules RINm5F en présence de molécules induisant un stress et/ou des antioxydants. La mesure de l'apoptose est basée sur l'externalisation des phosphatidylsérine et la fixation de l'annexineV couplée à un fluorophore (PE). Cela devait permettre de mettre en évidence de l'apoptose en présence de stress, et une diminution de celle-ci en présence des antioxydants. Les résultats obtenus sur les différents modèles de stress mis en place ne sont pas ceux attendus, car nous n'avons pas pu mettre en évidence de l'apoptose, quelques soient les conditions. Dès lors, nous nous sommes intéressés à une autre technique pour mettre en évidence l'apoptose des cellules. Celle-ci repose sur la mise en évidence d'un processus apoptotique

à l'aide de l'activation des caspases pro-apoptotiques initiatrices que sont les caspases 8 et 9, au contraire des caspases effectrices que sont les caspases 3 et 7. La caspase 8 est normalement activée par liaison d'un ligand au récepteur de la cellule  $\beta$  (voie extrinsèque). Cette caspase active par la suite la caspase 3 effectrice de l'apoptose. En revanche, la caspase 9 est recrutée et activée par un complexe, l'apoptosome, lui-même induit par un stress cytotoxique (voie intrinsèque). Son activation déclenche également l'activation de la caspase 3. Dans le cadre de l'étude, nous nous sommes donc intéressés aux deux caspases (8 et 9). Les résultats préliminaires indiquent que le peroxyde d'hydrogène augmente le clivage de la caspase 8 et particulièrement de la 9. La présence des antioxydants semble réduire le clivage des 2 caspases, ce qui souligne une diminution de l'apoptose en présence des antioxydants EGCG et PP. En accord avec ces résultats, Zuo *et al.* (2009) ont induit un stress oxydant sur des cellules HeLa par du peroxyde d'hydrogène et ont observé une augmentation du clivage de la caspase 9. D'autre part, Yao *et al.* (2008) ont observé une diminution du clivage de la caspase 9 induit par le peroxyde d'hydrogène après traitement des cellules du cristallin humain par de l'EGCG.

Ces résultats montrent que l'intérêt devra tout particulièrement se porter sur cette caspase 9, car c'est la voie privilégiée pour induire l'apoptose par des stress cyto-chimiques exogènes. Tous ces résultats d'intérêt doivent être confirmés par des expérimentations supplémentaires.

Ayant constaté un effet sur la viabilité ou l'activité mitochondriale des antioxydants sur les cellules RINm5F en présence de molécules induisant un stress oxydant, nous avons ensuite quantifié ce stress à l'aide d'un marqueur DCFH-DA. Celui-ci est réduit en un composé fluorescent en présence de peroxyde d'hydrogène intracellulaire. En présence d' $H_2O_2$ , de STZ ou d'HX-XO, les cellules RINm5F produisent une plus grande quantité de peroxyde d'hydrogène intracellulaire. Lorsqu'elles sont soumises à une pré-incubation par les PP, des différences de réponses apparaissent en fonction du modèle de stress. Ainsi, lors d'un stress induit par le peroxyde d'hydrogène, la présence des PP augmente la production du peroxyde d'hydrogène intracellulaire tandis que dans le modèle de stress induit par la STZ, ils ne modifient pas cette production. En revanche, dans le cas du modèle de stress induit par HX-XO, la quantité d' $H_2O_2$  produite est diminuée en présence des PP et du stress. Cela souligne qu'en fonction de l'entité chimique générée par le stress sur les cellules RINm5F, la production d' $H_2O_2$  intracellulaire est différente. L'hypothèse émise est que les PP joueraient un rôle de scavenger des entités oxydantes et particulièrement de l'anion superoxyde exogène généré par le couple HX-XO, ce qui empêcherait d'augmenter la production d' $H_2O_2$  intracellulaire due au stress. Cano *et al.* (2002) ont montré que différents polyphénols exercent une activité de scavenger vis-à-vis des anions superoxydes, ce qui a été confirmé par Roussis *et al.*, qui ont démontré qu'un extrait total de vin rouge grec (Xinomavro)

avait une capacité « scavenger » importante pour le radical hydroxyle et l'anion superoxyde. En ce qui concerne l'EGCG, quel que soit le modèle de stress mis en place, elle permet de diminuer la production intracellulaire d' $H_2O_2$  due au stress. Ramadass *et al.* (2003) ont également montré que l'EGCG et la quercétine (polyphénols du vin rouge) sont capables de prévenir l'augmentation de la production intracellulaire d' $H_2O_2$ , induite soit par du peroxyde d'hydrogène, soit par du polychlorobiphényles sur des cellules endothéliales. Cependant, Yang *et al.*, 2000 ont démontré que l'EGCG est une source de peroxyde d'hydrogène intracellulaire dans les cellules de l'épithélium bronchique. Cette diminution de la production d' $H_2O_2$  intracellulaire observée dans notre étude pourrait être liée à l'effet scavenger de l'EGCG pour le peroxyde d'hydrogène (Tian *et al.*, 2007) et plus particulièrement des catéchines du thé vert sur l'anion superoxyde (Nakagawa and Yokozawa (2002).

Sachant que les molécules induisent un stress et que les antioxydants modulent à la fois la viabilité cellulaire et l'apoptose, l'étude s'est poursuivie sur l'analyse des défenses antioxydantes des cellules RINm5F face au stress oxydant. Dans un premier temps, l'expression des gènes du stress oxydant a été étudiée par PCR arrays, que ce soit des gènes impliqués dans les défenses antioxydantes, le métabolisme des ROS ou dans les transporteurs de l'oxygène. Les résultats ont montré des différences d'expression de nombreux gènes dont notamment ceux des enzymes antioxydantes catalase et superoxyde dismutase. En effet, en présence d'HX et de XO, l'expression génique de la catalase est fortement augmentée alors qu'en présence de PP, cette expression est fortement diminuée. Dans le cas des enzymes superoxyde dismutase, les trois formes (soluble, mitochondriale et extracellulaire) sont toutes sous-exprimées en présence d'un stress oxydant et l'apport d'antioxydant comme les PP permet d'augmenter leur expression. A notre connaissance, ce screening des gènes du stress oxydant par PCR array, sur les RINm5F, est le premier réalisé dans ce modèle.

Dans un second temps, nous nous sommes focalisés sur l'étude de l'expression protéique de deux enzymes antioxydantes CAT et SOD à Mn, car cette dernière est présente dans la mitochondrie qui est une source de ROS. Sur les trois modèles de stress oxydant, l'expression des deux enzymes est très différente. L'expression de la CAT est globalement augmentée en présence des stress excepté pour celui induit par le peroxyde d'hydrogène ; alors que celle de la SOD n'est pas modifiée dans le cas des stress au peroxyde d'hydrogène et de l'hypoxanthine/xanthine oxydase ; elle est diminuée dans le cas d'un stress induit par la STZ. Ces données sont confirmées par Kang *et al.* (2009). Par contre, on a pu observer qu'un traitement par les PP n'a un effet que sur le modèle de stress par le peroxyde d'hydrogène où l'expression de la CAT est restaurée tandis que

celle de la SOD est diminuée. Dans les deux autres conditions de stress, les PP n'ont en revanche pas d'effet, alors que l'EGCG augmente l'expression des deux enzymes (cf. figure 167).

Stress	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			STZ			HX - XO		
	-	PP	EGCG	-	PP	EGCG	-	PP	EGCG
CAT	↘	↗	→	↗	→	↗	↗	→	↗
SOD	→	↘	→	↘	→	↗	→	→	↗

**Figure 167** : Tableau récapitulatif de l'expression des enzymes CAT et SOD (Mn) dans les trois conditions et/ou en présence d'antioxydants.

L'expression de la CAT et de la SOD en présence des antioxydants est comparée au témoin stress.

↘ : diminution de l'expression ; → : pas de modification de l'expression ; ↗ : augmentation de l'expression.

L'analyse de ces données suggère que sous l'effet d'un stress, la cellule devrait palier ce stress en augmentant ses défenses or dans le cas d'un stress par le peroxyde d'hydrogène, la CAT est au contraire diminuée et dans le cas d'un stress par l'HX-XO générant des anions superoxydes, l'expression de la SOD n'est pas modifiée. Cela renforce le fait que les cellules RINm5F sont incapables de se défendre contre le stress oxydant généré et que l'apport d'antioxydants permet de les protéger en augmentant les défenses. En effet, il a été clairement mis en évidence dans l'étude que les PP, dans le cas d'un stress oxydant par le peroxyde d'hydrogène, augmentent l'activité de la CAT mais pas celle de la SOD. Dans le cas d'un stress par l'HX-XO, l'EGCG améliore l'expression de la SOD, ce qui est confirmé par Murakami *et al.* (2002), mais aussi celle de la CAT pour pallier à la génération d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> due à la dismutation de l'anion superoxyde par la SOD. Le même profil d'expression est obtenu avec l'EGCG dans un stress induit par la STZ.

Les cellules RINm5F présentant un stress oxydant améliorent leur viabilité, leur défense antioxydante et diminuent la production de radicaux intracellulaires, en présence d'antioxydants. Dans cette dernière partie, nous nous sommes attachés à regarder l'impact des stress oxydants générés sur les macromolécules biologiques des cellules. Ainsi, dans un premier temps, la peroxydation des lipides a été mesurée. Les résultats montrent que dans les trois modèles de stress, on observe une augmentation de la peroxydation lipidique, confirmée par Latha *et al.* (STZ). La peroxydation est totalement abolie, en présence de PP et d'EGCG dans le modèle de stress induit par le peroxyde d'hydrogène. Par contre, lors d'un stress induit par la STZ, aucun effet des antioxydants n'est mis en évidence et lors d'un stress induit par l'HX-XO, seule l'EGCG prévient la peroxydation des lipides. La technique de mesure de la peroxydation lipidique s'est basée sur la

formation d'un adduit entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et le MDA. Cependant, cette technique est assez controversée puisque de nombreuses revues soulignent l'hétérogénéité des résultats obtenus, s'appuyant sur le fait que le MDA n'est pas le seul composé à réagir en milieu acide et chaud avec le TBA (Gutteridge *et al.*, 1974). C'est pourquoi certains préfèrent parler de « Substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique » ou TBARS (Lefèvre *et al.*, 1998).

C'est pour cette raison que nous avons mis en place un second test permettant de mesurer l'impact du stress oxydant : la mesure des protéines carbonylées. Les résultats obtenus ne sont absolument pas interprétables ce qui remet en cause ce test. Cette quantification a été difficile à mettre en place/ nous avons dans un premier temps utilisé une autre méthode pour quantifier cette carbonylation, l'OxyBlot<sup>TM</sup>. Celle-ci reposait sur la réaction des protéines carbonylées avec le DNPH (comme le kit utilisé dans notre étude) puis sur l'analyse de la quantité de ces protéines par Western Blot. Les résultats étaient également ininterprétables. Cette approche d'étude du stress oxydant n'est sans doute pas une bonne méthode pour quantifier les protéines carbonylées. Ainsi, il serait nécessaire de trouver des techniques plus spécifiques pour mettre en évidence les modifications protéiques induites par le stress oxydant.

Les techniques mises en point au cours de l'étude *in vitro* ont permis de faire un véritable screening de molécules antioxydantes et de voir l'effet des molécules sélectionnées dans la prévention de l'apoptose et de la production d'entités oxydantes mais aussi de regarder comment elles modulent l'expression des gènes et des protéines impliquées dans la défense antioxydante. Enfin, cette étude a permis d'apprécier l'impact des antioxydants sur les conséquences biologiques du stress oxydant développé chez les cellules RINm5F. Ce travail a permis de développer un véritable outil de screening moléculaire qui pourrait s'appliquer à la recherche d'autres molécules antioxydantes afin d'identifier un composé qui pourrait avoir un meilleur effet que l'EGCG ou les PP du vin rouge. Pour notre étude, nous avons sélectionné deux molécules qui ont un intérêt biologique de par les résultats obtenus. Il est maintenant nécessaire de corroborer les résultats obtenus *in vitro*, en testant ces deux antioxydants d'intérêt sur un modèle de rat diabétique présentant un stress oxydant. Cette étude a fait l'objet de la seconde partie de ma thèse.



## Discussion *in vivo*

La discussion sera divisée en deux parties : une première partie sur la mise en place du modèle diabétique et une deuxième sur l'effet des antioxydants proprement dits sur ce modèle de rat. Plus particulièrement, cette seconde partie détaillera les conséquences des traitements, d'une part sur le stress oxydant, d'autre part sur le retentissement métabolique, et enfin sur les complications hépatiques.



### *Mise en place du modèle de rat diabétique de type 2*

Le modèle de rat diabétique qui a été développé au laboratoire pour tester les antioxydants, est basé sur l'administration *ad libitum* d'une alimentation hypercalorique High Fat Diet (HFD), pendant sept mois. Les résultats de la mise en place de ce modèle montrent que les animaux nourris par le régime HFD prennent du poids de façon constante tout au long de l'étude, traduisant d'une obésité par rapport aux rats témoins Normal Diet (ND). De plus, ces animaux présentent un hyperinsulinisme marqué dès deux mois de régime alimentaire, qui est lié à l'augmentation du nombre de gros îlots présents dans le tissu pancréatique. Ces données sont en accord avec la littérature car Raffaella *et al.* (2008) a identifié chez des rats mâles Wistar adultes nourris pendant 7 semaines par de l'alimentation HFD, la présence d'une obésité, associée à une insulino-résistance. De plus, les rats HFD présentent une hyperglycémie qui apparaît de manière progressive.

D'autre part, une des conséquences de ce régime alimentaire est le développement d'une stéatose hépatique non alcoolique (NASH), qui est présente sur plus de 66% du tissu. Cette NASH, de type microvésiculaire, est associée à une accumulation de lipides et plus particulièrement de triglycérides dans le cytoplasme des hépatocytes, et est réversible tant qu'elle ne présente pas de phénomène inflammatoire. Bien qu'il existe d'autres techniques pour induire un diabète de type 2 chez le rat (injection de streptozotocine après régime HFD, Zhang *et al.* (2003)), Lieber *et al.* (2004) ont également mis au point un modèle de rat développant une stéatose hépatique par l'administration d'une alimentation hypercalorique à des rats Sprague-Dawley. Ces animaux présentaient également une insulino-résistance.

Pour résumer, après deux mois de régime alimentaire HFD, les rats deviennent obèses, insulino-résistants et développent une stéatose hépatique non alcoolique (cf. figure 168). Un modèle similaire a été décrit par Shen *et al.* (2007). Leurs rats Sprague Dawley alimentés pendant 10 semaines par une alimentation HFD, deviennent obèses et présentent des troubles lipidiques. Ils ont

également remarqué que des marqueurs du stress oxydant comme les enzymes antioxydantes SOD et glutathion peroxydase étaient fortement diminuées dans le plasma, concluant que le modèle développé par administration d'une alimentation HFD induit un stress oxydant. Ainsi, dans le cas de notre étude, nos rats intolérants au glucose qui deviennent diabétiques, devraient représenter un bon modèle de stress oxydant. C'est sur ce modèle ainsi établi que l'effet des antioxydants EGCG et PP est testé, ainsi que l'effet d'une activité physique quotidienne.

<b>Régimes</b>	<b>ND</b> 	<b>HFD</b> 
Hyperglycémie		X
Hyperinsulinisme = insulino-résistance		X
Obésité		X
Stéatose hépatique		X
Stress oxydant		X

**Figure 168** : Récapitulatif des caractéristiques d'un modèle de rat diabétique de type 2, présentant un stress oxydant et une stéatose hépatique, développé au laboratoire.

*Effets sur le stress oxydant*

Dans une première phase, les effets du régime, des antioxydants et de l'exercice ont été testés sur le développement du stress oxydant. Les résultats de la mesure des lipides peroxydés et des protéines carbonylées montrent, d'une part, que les animaux dès leur arrivée, ont un taux de lipides peroxydés élevé qui diminue après 2 mois de régime ND. Cependant, la quantité de lipides oxydés et de protéines carbonylées augmente légèrement pendant la durée de l'étude. Il semblerait que ces observations soient en accord avec la littérature car Hashimoto *et al.* (2001) ont montré une augmentation des lipides oxydés plus importante chez des rats âgés de 20 et 100 semaines par rapport à des rats de 3 semaines. Notre étude étant menée sur 5 mois, les rats ND pourraient présenter une augmentation des lipides oxydés en raison de l'âge des animaux.

Concernant les rats recevant l'alimentation **HFD**, ceux-ci développent un stress oxydant progressif jusqu'à 4 mois de régime alimentaire. En effet, le taux de lipides peroxydés et de protéines carbonylées présent dans le plasma est croissant du 2<sup>ème</sup> au 4<sup>ème</sup> mois d'étude et est bien plus élevé que pour les animaux ND (cf. figure 169 A). Des résultats similaires ont été observés par Cederberg *et al.* (2001) sur un autre modèle de rats diabétiques (rats Sprague Dawley ayant reçu une injection de STZ).

En revanche, au delà de ces temps d'étude, les animaux HFD semblent revenir à des taux de protéines carbonylées et de lipides peroxydés proches de ceux des animaux ND. Il y aurait une diminution de ces marqueurs au cours du temps chez les animaux HFD. A notre connaissance aucune donnée de la littérature ne reporte une telle observation sur ce modèle animal. L'administration d'**EGCG** à 50mg/kg/jour, pendant un mois, aux animaux HFD, diminue le stress oxydant par diminution du taux de lipides peroxydés et de protéines carbonylées. Des résultats similaires et dose-dépendants ont été observés sur la diminution de la peroxydation lipidique par Yamabe *et al.* (2006) mais sur un autre modèle de rats diabétiques. Les rats recevaient de l'EGCG pendant 50 jours à des doses comprises entre 25 et 100 mg/kg/jour. L'EGCG aurait donc un effet préventif sur ce paramètre après un mois d'administration. Cet effet sur les lipides peroxydés est maintenu après deux mois d'administration de l'antioxydant. Cependant, à partir de 3 mois, plus aucun effet n'est observé par rapport au animaux HFD solvant. Cela peut s'expliquer par le fait que les animaux HFD solvant présentent eux-mêmes une diminution du stress oxydant, sans doute due à l'effet du solvant.

En ce qui concerne les **PP**, à 50mg/kg/jour, ils n'ont un effet positif que sur les lipides peroxydés à 2 mois de traitement. Ces données sont en accord avec le modèle de stress oxydant développé par

Canali *et al.* (2000) par déplétion intestinale en zinc induit chez des rats, où les PP à des doses de 30 à 60mg/jour semblent également diminuer les lipides peroxydés.

Les animaux HFD faisant de l'**exercice** voient leurs marqueurs du stress oxydant se réduire par diminution d'une part des protéines carbonylées après un mois de traitement et d'autre part, par diminution de la quantité de lipides oxydés à 2 mois de traitement. Ces données sont en accord avec Gul *et al.* (2002) qui ont observé une diminution de la peroxydation lipidique chez des rats rendus diabétiques par injection de STZ et faisant de l'exercice. Cependant dans notre étude, aucun effet positif à plus long terme n'a été mis en évidence. En effet, il semblerait que les PP et l'exercice augmentent le stress oxydant chez les animaux HFD par augmentation des lipides peroxydés après 3 mois d'administration ou de pratique de l'activité (cf. figure 169 B). Des résultats identiques sur l'homme suggèreraient que l'exercice augmente les lipides peroxydés chez des patients diabétiques (Laaksonen *et al.*, 1996).

En résumé, il semblerait qu'aux doses utilisées, les antioxydants et l'exercice réduisent les marqueurs du stress oxydant de façon précoce et à court terme. L'effet est d'autant plus marqué pour l'EGCG qui diminue les deux marqueurs de façon concomitante, tandis que l'exercice semble avoir un effet également sur les deux marqueurs mais à des temps différés. Enfin, les PP ne semblent réduire qu'un seul marqueur à un temps donné avant de devenir potentiellement pro-oxydants. Cet effet opposé est également retrouvé après 3 mois de traitement par l'EGCG ou l'exercice (cf. figure 169 B).

A	Groupe HFD comparé au groupe ND			
Temps (mois) de régime	2	3	4	5
↗ lipides oxydés			✗	
↗ protéines carbonylées		✗	✗	

B	HFD + EGCG			HFD + PP			HFD + Exercice		
Régime HFD (mois)	3	4	5	3	4	5	3	4	5
Antioxydants / exercice (mois)	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Lipides oxydés	↘	↘	→	→	↘	↗	→	↘	↗
Protéines carbonylées	↘	→	↗	→	→	→	↘	→	→

**Figure 169** : Récapitulatif de l'effet du régime sur l'apparition du stress oxydant chez le rat (A) et les effets des antioxydants et de l'exercice sur le modèle de rat HFD (B).

Les flèches descendantes en vert indiquent une diminution significative du paramètre étudié, une flèche horizontale, une absence de modification significative du paramètre, et une flèche rouge montante, une augmentation significative du paramètre étudié.

### Effets sur le retentissement métabolique

Cette diminution du stress oxydant, observée à court terme, a des retentissements sur le diabète des animaux ainsi que sur une des complications associées au diabète, la stéatose hépatique. Tout d'abord, les animaux recevant le régime **HFD** développent une obésité par une prise de poids massive et continue au cours de l'étude. Cette augmentation de la masse corporelle est associée à une augmentation de la glycémie, un hyperinsulinisme et une augmentation du taux de pro-insuline plasmatique (cf. figure 170 A). Milagro *et al.* (2006) ont également montré que des rats Wistar nourris par alimentation HFD pendant 2 mois, prenaient du poids, augmentaient leur glycémie et leur insuliniémie. L'instauration d'une insulino-résistance a également été montrée par Kern *et al.* (1990) suite à 4 semaines de régime HFD chez des rats Sprague Dawley.

Le traitement des animaux HFD par de l'**EGCG** n'induit pas de modification significative dans la prise de masse des rats (cf. figure 170 B) comme l'a montré Janle *et al.* (2005) sur des rats diabétiques ZDF avec des doses d'EGCG comprises entre 50 et 125mg/kg. Cependant, cette molécule permet de diminuer l'hyperinsulinisme et la glycémie après 1 et 2 mois d'administration et semblerait abaisser le taux de pro-insuline. Yamabe *et al.* (2006) ont également montré l'effet protecteur de l'EGCG sur la glycémie de rats diabétiques et Bose *et al.* (2008) ont reporté une atténuation de l'insulino-résistance grâce au traitement de souris diabétiques (induites par alimentation HFD) par l'EGCG incluse dans l'alimentation à raison de 3,2g/kg.

Les **PP**, quant à eux, n'ont d'effet qu'à 1 mois sur l'hyperinsulinisme et ils ne limitent pas la prise de masse des rats HFD au cours de l'étude (cf. figure 170 B). Des données similaires ont été obtenues par Agouni *et al.* (2009) qui n'a pas observé d'effet des PP sur la prise de masse de rats obèses.

Enfin, la pratique d'une **activité physique** permet de diminuer la masse corporelle des rats sains (ND) mais aussi celle des rats développant un diabète de type 2. Cet effet est associé à une réduction de l'hyperinsulinisme, de la glycémie et de l'hyper-pro-insuliniémie. L'activité physique a également montré une réduction de l'insulino-résistance de façon transitoire chez des animaux diabétiques HFD (Kern *et al.*, 1990). Cependant, après 3 mois d'exercice physique, son effet bénéfique n'est plus observé ce qui tend à montrer qu'une activité physique sans mise en place d'un régime alimentaire approprié n'a qu'un effet limité sur le contrôle métabolique des animaux diabétiques (cf. figure 170 B).

Les résultats obtenus lors de l'étude histologique du pancréas montrent que les rats **HFD** présentent un nombre de gros îlots (supérieurs à 30 000µm<sup>2</sup>) élevé par rapport aux rats sains (cf. figure 170 A). L'administration des **antioxydants** n'a pas d'effet sur le nombre de gros îlots au contraire de **l'exercice physique**, qui permet de réduire ce nombre. L'hyperplasie des îlots induite par l'alimentation HFD semble réversible lorsque les animaux pratiquent une activité physique. La seule étude qui est en contradiction avec ces données est celle de Park *et al.*, (2007) où ils ont montré que l'exercice, chez des rats diabétiques par injection de STZ et faible supplémentation HFD, augmentait la masse de cellules β. Cependant la méthode d'induction du diabète est différente entre les deux modèles, ce qui pourrait expliquer les résultats opposés obtenus. De plus, le marquage à l'insuline des îlots ne permet pas de mettre en évidence un hyperinsulinisme de façon qualitative, chez les rats HFD. Par conséquent, il est difficile de voir un quelconque effet des antioxydants ou de l'exercice sur ce paramètre.

La mesure du stress oxydant dans le tissu pancréatique révèle une augmentation de la production de ROS intracellulaires après 3 et 5 mois de régime HFD par rapport aux rats ND. Cependant, aucune modification notable de cette production de ROS intracellulaires n'est observée, quel que soit le traitement utilisé (EGCG, PP, exercice).

De plus, comme le modèle animal développe une obésité, le taux de triglycérides plasmatiques a été mesuré et les résultats montrent que le modèle de rat **HFD** développe une hypertriglycéridémie au cours de l'étude (cf. figure 170 A). Cette augmentation des triglycérides est diminuée lorsque que les rats sont traités par des **PP** à une dose de 50mg/kg/jour pendant un mois (cf. figure 170 B). Lorsque des doses plus faibles en EGCG sont utilisées, l'effet est retardé. En effet, Agouni *et al.* (2009) ont montré que chez des rats ZDF présentant un taux élevé en triglycérides, un extrait de polyphénols de vin rouge (Provinols<sup>TM</sup>) à 20mg/kg/jour réduisait ce taux après 8 semaines de traitement. Il semblerait que l'effet observé soit dépendant du temps de traitement et de la dose administrée.

En revanche, les rats traités par l'**EGCG** à 50mg/kg/jour ne présentent pas de diminution de la quantité de triglycérides plasmatiques. Ceci est en contradiction avec Roghani et Baluchnejadmojarad (2010) qui ont montré qu'une dose plus faible en EGCG (25mg/kg/jour) sur un modèle de rat rendu diabétique par injection de STZ permettait de réduire cette quantité de triglycérides.

L'**exercice** pratiqué chez les rats HFD ne permet pas quant à lui, de diminuer la quantité de triglycérides plasmatiques (cf. figure 170 B).

Enfin, des auteurs rapportent que des rats pouvaient développer une athérosclérose des vaisseaux par simple alimentation HFD (Kaschina *et al.*, 2004). En effet, Vacek et Machova (1979) ont montré que des rats Wistar développaient une athérosclérose après 5 à 6 mois de régime HFD, par coloration de sections d'aorte au rouge Sudan. Dans notre modèle d'étude, aucune plaque d'athérome n'a pu être mise en évidence dans les aortes des rats HFD quel que soit le temps de l'étude. Cela peut s'expliquer par le fait que nos animaux ont été étudiés sur une durée inférieure ou égale à 5 mois.

Enfin, nous avons voulu voir si notre modèle de rat diabétique présentant un stress oxydant, développait un processus inflammatoire aigu, au travers de la mesure de la protéine C-réactive (CRP). Les résultats montrent que les rats **HFD** ne présentent pas de CRP augmentée par rapport aux rats ND, au cours de l'étude (cf. figure 170 A). De même, les antioxydants et l'exercice n'ont pas d'effet sur la mesure de ce paramètre, excepté après un mois de traitement par l'**EGCG** chez les rats HFD, où le taux de CRP est diminué (cf. figure 170 B). Ce résultat semble être en accord avec ceux de Lu *et al.* (2010) qui ont démontré une baisse de la CRP chez des animaux diabétiques traités par des flavonoïdes.

En résumé, l'exercice semblerait être le traitement ayant le plus d'effets au niveau métabolique chez les rats présentant un hyperinsulinisme et un stress oxydant. Le second traitement présentant également des effets protecteurs et visibles, mais en proportion plus faible, est l'**EGCG** administrée à une dose de 50mg/kg/jour. Enfin, il semblerait que les PP à la même dose que l'**EGCG** aient un effet moindre et transitoire comparés à l'exercice et à l'**EGCG**. Ainsi, des doses plus fortes en antioxydants administrées sur des temps plus long pourraient améliorer les différents paramètres étudiés et une combinaison de l'exercice avec un traitement antioxydant pourrait également avoir des effets plus importants que les traitements pris séparément.



A	Groupe HFD comparé au groupe ND			
Temps (mois) de régime	2	3	4	5
↗ masse	×	×	×	×
↗ glycémie	×	ND	×	ND
↗ C-peptide	×	×	×	×
↗ pro-insulinémie	×	×	×	×
↗ taille des gros îlots	×	×		
↗ ROS intracellulaires		×		×
↗ triglycérides	×	×		
↗ CRP				

B	HFD + EGCG			HFD + PP			HFD + Exercice		
Régime HFD (mois)	3	4	5	3	4	5	3	4	5
Antioxydants / exercice (mois)	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Masse	→	→	→	→	↗	→	↘	↘	→
Glycémie	ND	↘	ND	ND	→	ND	ND	↘	ND
C-peptide	↘	↘	→	↘	→	→	↘	↘	→
Pro-insulinémie	→	→	→	→	→	→	→	→	→
Taille des gros îlots	→	→	→	→	→	→	↘	↘	↘
ROS intracellulaires	→	→	→	→	→	→	→	→	→
Triglycérides	→	→	→	↘	→	→	→	→	→
CRP	↘	→	→	→	→	→	→	→	→

**Figure 170** : Récapitulatif de l'effet du régime sur les complications métaboliques chez le rat (A) et les effets des antioxydants et de l'exercice sur le modèle de rat HFD (B).

(A) Les croix indiquent une augmentation significative du paramètre étudié. (B) Les flèches descendantes en vert indiquent une diminution significative du paramètre étudié, une flèche horizontale, une absence de modification significative du paramètre, et une flèche rouge montante, une augmentation significative du paramètre. (ND, non déterminé).

### Effets sur les complications hépatiques

La mise en place du modèle d'étude a montré que les rats développaient une stéatose hépatique au cours de temps. Nous nous sommes donc intéressés à ce paramètre, chez nos animaux diabétiques de type 2, présentant un stress oxydant.

Les résultats indiquent que les rats nourris par l'alimentation **HFD** présentent une masse de foie total plus élevée après 3 et 4 mois de régime, par rapport aux rats nourris par l'alimentation ND. Celle-ci est accompagnée par la mise en place d'une stéatose hépatique microvésiculaire dès 2 mois de régime HFD, qui évolue puis reste constante au cours de l'étude (cf. figure 171 A). Le développement d'une stéatose hépatique a également été mis en évidence chez des rats Sprague Dawley nourris par une alimentation HFD pendant 6 semaines (Kuzu *et al.*, 2008).

Notre étude a démontré que l'**exercice** et les **PP** ont un effet bénéfique sur le développement de la stéatose hépatique. En effet, après un mois de traitement, l'apparition de la stéatose est retardée et l'histologie du tissu est quasiment similaire à celle des rats témoins (cf. figure 171 B). Les résultats obtenus avec les PP et l'exercice confirment les données obtenues respectivement par Feillet-Coudray *et al.* (2009) et par Rector *et al.* (2008). Ils n'ont cependant qu'un effet précoce dans cette étude. L'**EGCG** quant à elle, à la dose utilisée (50mg/kg/jour), ne permet pas de retarder le développement de la stéatose. Des résultats contradictoires ont été obtenus par Kuzu *et al.* (2008), qui ont montré un effet protecteur de l'EGCG à plus forte dose (1g/L) pendant 6 semaines sur le développement de la stéatose. Des doses supérieures en EGCG pourraient retarder l'apparition de la stéatose.

L'analyse du stress oxydant dans le tissu hépatique n'a montré aucun effet du régime HFD par rapport aux rats témoins. Aucun effet des antioxydants et de l'exercice, n'a également été mis en évidence (cf. figure 171 A et B).

Pour résumé, seuls l'exercice et les PP semblent retarder les effets d'un régime alimentaire HFD sur le développement de la stéatose hépatique. Cela reste transitoire et aucun effet à plus long terme n'est observé. Il semblerait également que, quel que soit le traitement administré et le régime, ceux-ci n'ont pas d'effet sur le développement du stress oxydant dans le foie des animaux.

A	Groupe HFD comparé au groupe ND			
Temps (mois) de régime	2	3	4	5
↗ masse des foies		×	×	
↗ stéatose hépatique	×	×	×	×
↗ ROS intracellulaires				

B	HFD + EGCG			HFD + PP			HFD + Exercice		
Régime HFD (mois)	3	4	5	3	4	5	3	4	5
Antioxydants / exercice (mois)	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Masse des foies	→	→	→	→	→	→	↘	→	→
Stéatose hépatique	→	→	→	↘	→	→	↘	→	→
ROS intracellulaires	→	→	→	→	→	→	→	→	→

**Figure 171 : Récapitulatif de l'effet du régime sur les complications hépatiques chez le rat (A) et les effets des antioxydants et de l'exercice sur le modèle de rat HFD (B).**

(A) Les croix indiquent une augmentation significative du paramètre étudié. (B) Les flèches descendantes en vert indiquent une diminution significative du paramètre étudié, une flèche horizontale, une absence de modification significative du paramètre, et une flèche rouge montante, une augmentation significative du paramètre.

## *Synthèse des résultats*

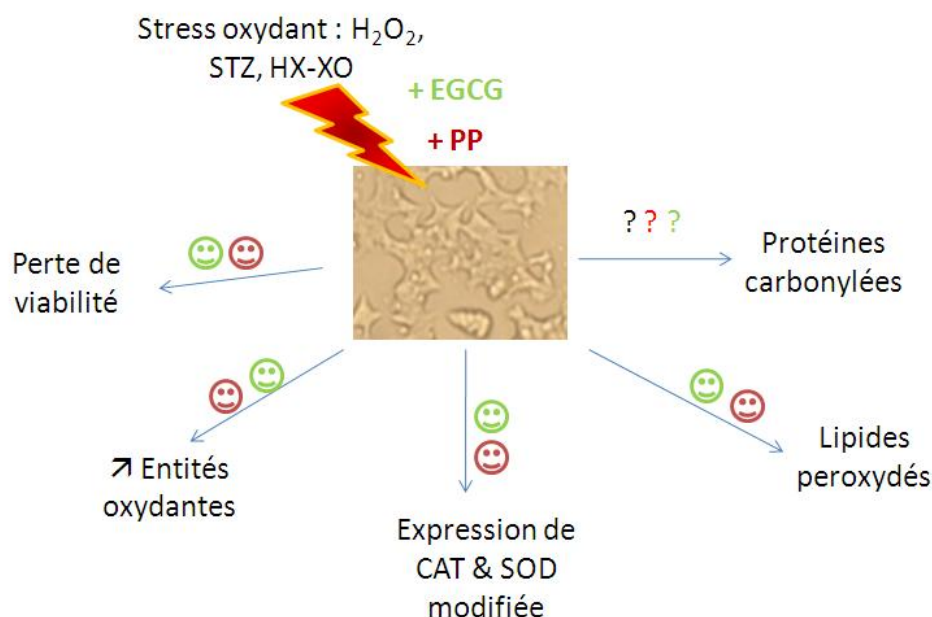
L'analyse globale des résultats *in vivo* semble indiquer d'une part, que les antioxydants agissent de façon précoce et que sur un temps plus long, l'effet opposé est observé. Dans le cas du stress oxydant, l'EGCG permettrait une meilleure prévention du stress, suivie de l'exercice et des PP. Concernant les complications métaboliques, l'exercice serait le meilleur moyen de prévenir les modifications engendrées par l'hyperinsulinisme et l'hyperglycémie, suivi de l'EGCG et enfin des PP. Cependant, au niveau des complications hépatiques, l'EGCG n'a pas d'effet contrairement aux PP et à l'exercice, même si l'effet bénéfique observé est de courte durée.

## Conclusions

Le diabète est une pathologie grave qui est liée au développement du stress oxydant. Ce concept de « stress oxydant » décrit une situation dans laquelle la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques, situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines (diabète, cancers, inflammations, maladies neurodégénératives...). De nombreuses études ont suggéré que des composés permettaient de moduler (*in vitro* et *in vivo*) le « stress oxydant » impliqué dans l'initiation, le développement et les complications de certaines de ces maladies chroniques. Dans le cas du diabète, de nombreux composés dont des molécules antioxydantes, sont utilisés pour limiter le développement du stress oxydant.

Le but de cette étude était de trouver de nouvelles approches thérapeutiques dans la prévention du diabète et de ses complications associées, en diminuant le stress oxydant dans cette pathologie. Pour cela, un screening de molécules antioxydantes a été réalisé sur des cellules  $\beta$  pancréatiques de rat RINm5F, afin de sélectionner le ou les meilleurs antioxydants. Ces antioxydants étaient soit des composés purs comme le resvératrol *cis* et *trans*, la procyanidine B2, ou l'extrait de thé vert contenant majoritairement de l'EGCG, soit des extraits comme l'extrait de polyphénols de vin rouge.

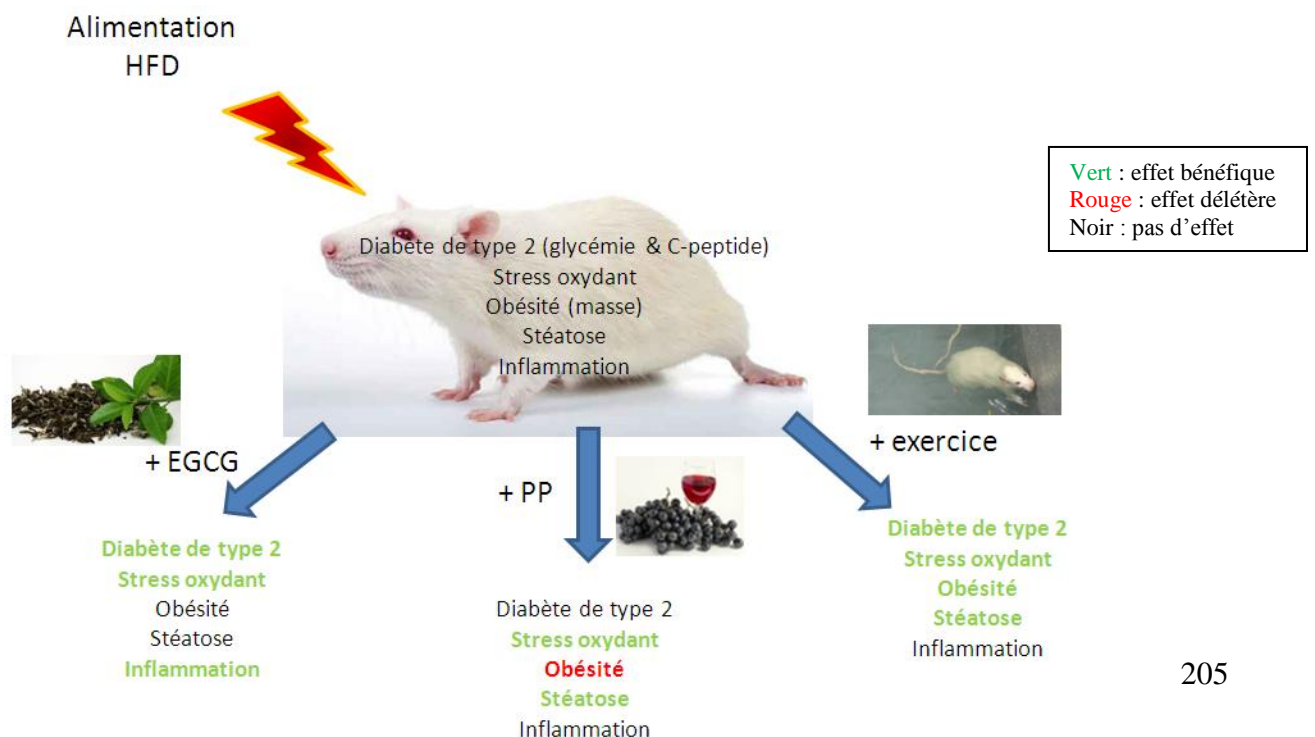
A l'issue de ce screening, deux bons antioxydants ont été retenus : **l'extrait pur de thé vert (EGCG)** et **l'extrait de polyphénols de vin rouge**. Ceux-ci ont montré avoir des effets protecteurs des cellules RINm5F soumises à différents stress cellulaires, suivant de nombreux paramètres comme la viabilité cellulaire, l'expression des enzymes antioxydantes, les marqueurs du stress oxydant...



Afin de corroborer ces résultats *in vitro* très prometteurs, ces deux molécules et extraits d'antioxydants ont été testés sur un modèle de rat rendu diabétique par administration *ad libitum* d'une alimentation hypercalorique. Ces animaux développaient au bout de 2 mois de régime, un hyperinsulinisme (stade en amont du diabète de type 2), une obésité, un stress oxydant et une stéatose hépatique. Les deux antioxydants ont été dilués dans un solvant et administrés dans l'eau de boisson à une dose de 50mg/kg/jour. Afin de compléter cette étude, un groupe d'animaux a effectué pendant toute la durée de l'étude une nage forcée ce qui représente notre témoin exercice.

Les résultats obtenus pour cette étude *in vivo* sont assez décevants de par l'intérêt porté à ces molécules et au vu des résultats obtenus *in vitro*. Les résultats sont assez mitigés en fonction des complications ou des marqueurs étudiés. Chaque antioxydant et l'exercice ont leur particularité d'action et aucun n'a d'effet positif sur tous les paramètres de façon simultanée. Il semblerait que les antioxydants aient des effets transitoires (1 ou 2 mois) et qu'aux doses utilisées, ils présenteraient des effets pro-oxydants à plus long terme. L'exercice quant à lui semble avoir des effets positifs mais n'ayant pas pu contrôler la prise alimentaire des animaux, ceux-ci ont pu l'augmenter en réponse à l'effort physique

Cette étude a permis de développer des techniques de screening et d'analyse de molécules antioxydantes afin de les tester *in vivo*. Bien que prometteuse de par les résultats obtenus *in vitro*, elle a été quelque peu décevante et n'a pas permis de conclure réellement sur l'effet des antioxydants ou de l'exercice dans le modèle de rat diabétique par alimentation hypercalorique. Cependant, il semblerait que l'EGCG ait des effets intéressants tout comme l'exercice. Une combinaison des antioxydants et/ou de l'exercice pourrait améliorer les paramètres étudiés. Le schéma ci-dessous récapitule les effets obtenus *in vivo* à court terme et sur quelques paramètres.



## Perspectives

Les perspectives de cette étude sont nombreuses et concernent les deux études. Elles peuvent s'articuler autour de quatre points :

### (1) **Tout d'abord, au niveau des résultats de l'étude *in vitro*.**

Grâce aux méthodes de screening et d'analyses de molécules antioxydantes mises au point au laboratoire, une des perspectives est de rechercher d'autres composés ou molécules issus de l'alimentation, qui pourraient avoir des effets protecteurs et prophylactiques dans la prévention du stress oxydant dans le diabète. Ainsi, il a récemment été mis en place un projet collaboratif avec entre autre, l'équipe d'Eric Marchioni de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg. Ce projet a pour but d'évaluer le pouvoir antioxydant des fruits et légumes cultivés en Alsace et d'en valider l'activité biologique dans la prévention du diabète et de ses complications.

### (2) **Ensuite, au niveau de la mise en place de l'étude *in vivo*.**

Du fait des résultats obtenus sur les différents paramètres et de la grande variabilité inter-animale observée au cours de l'étude, il serait judicieux dans une prochaine étude d'augmenter le nombre d'animaux par groupe. De plus, nous avons observé que les doses d'antioxydants utilisées sont souvent inférieures à ce qui est utilisé dans la littérature. Dans le cas de l'EGCG, par exemple, des études ont montré que des doses allant jusqu'à 500mg/kg/jour n'étaient pas toxiques pour des rats (Isbrucker *et al.*, 2006). Des doses plus élevées seraient sans doute adéquates pour observer un effet à plus long terme. Enfin, du fait des résultats particuliers obtenus et parfois propres à chaque traitement, une étude combinée des antioxydants et/ou de l'exercice permettrait sans doute d'améliorer beaucoup plus de paramètres que dans l'étude. Ainsi une future étude pourrait prendre en compte l'effet de l'exercice chez des rats HFD, en présence d'un régime approprié (mesures hygiéno-diététiques) ou non.

### (3) **Amélioration de certains dosages.**

Que ce soit dans les expérimentations *in vitro* ou *in vivo*, nous nous sommes heurtés à différents problèmes liés aux échantillons ou aux techniques utilisées. En effet, dans l'étude *in vitro*, l'analyse des résultats des protéines carbonylées n'a permis de tirer une conclusion sur ce paramètre, que ce soit par dosage ELISA (OxiSelect<sup>TM</sup>) ou par western-blot (Oxyblot<sup>TM</sup>). Il serait préférable de trouver un autre marqueur de l'atteinte protéique ou évaluer d'autres paramètres du



stress oxydant comme la mesure de l'oxydation des bases nucléiques (8-oxodésoxyguanosine ou 8-oxoguanine). De plus, les résultats d'apoptose obtenus par cytométrie sont prometteurs et doivent être confirmés.

D'un point de vue *in vivo*, les résultats de la glycémie mesurée ne rendent pas compte de l'équilibre glycémique. En effet, nos animaux n'ont pas été mis à jeun ou en réalimentation au cours de l'étude, il est donc difficile de pouvoir conclure sur ce paramètre. Des mesures de l'HbA1c ne permettraient pas non de nous renseigner sur l'équilibre glycémique, car elle mesure l'équilibre sur une période de 2 mois alors que les études réalisées sur nos animaux ont des durées plus courtes. En revanche, le dosage de la fructosamine serait une bonne approche pour mettre en évidence une différence dans l'équilibre glycémique entre les rats ND et HFD, puisqu'il prend en compte l'équilibre sur 2 à 3 semaines. Ces dosages seront prochainement réalisés sur les plasmas des animaux.

#### **(4) Poursuite de l'étude du stress oxydant dans d'autres organes et étudier les complications vasculaires.**

L'analyse du stress oxydant réalisée sur les tissus devra être confirmée au niveau moléculaire par ajout d'un inhibiteur de ROS, le MnTMPyp (SOD mimetic manganese(III) tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin) pour vérifier que les effets observés sont bien dûs aux ROS.

L'étude du stress oxydant s'est focalisée autour du pancréas et du foie. Il serait également intéressant de regarder l'impact du stress oxydant dans d'autres organes atteints lors du diabète comme les yeux et les reins. Cela est possible grâce à la tissuthèque élaborée au cours de ce travail. Enfin, l'étude des complications cardiovasculaires pourrait être réalisée par l'analyse des marqueurs du stress oxydant dans les vaisseaux (aorte, artère fémorale et mésentérique). Enfin, l'étude de la dysfonction endothéliale, initialement prévue dans notre travail, sera réalisée. Elle pourra ainsi rendre compte de l'effet d'un régime HFD sur la contraction ou relaxation des vaisseaux des animaux et de voir l'effet des molécules antioxydantes et de l'exercice.

# Bibliographie

## A

---

Abidov M, Ramazanov A, Jimenez Del Rio M, Chkhikvishvili I.  
Effect of Blueberin on fasting glucose, C-reactive protein and plasma aminotransferases, in female volunteers with diabetes type 2: double-blind, placebo controlled clinical study.  
*Georgian Med. News*, 2006, (141):66-72.

Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Mostefai HA, Tesse A, Mulder P, Rouet P, Desmoulin F, Heymes C, Martínez MC, Andriantsitohaina R.  
Red wine polyphenols prevent metabolic and cardiovascular alterations associated with obesity in Zucker fatty rats (Fa/Fa).  
*PLoS One*, 2009, 4(5):e5557.

Aikaiwa KM, Quintanilha AT, de Lumen BO, Brooks GA, Packer L.  
Exercise endurance-training alters vitamin E tissue levels and red-blood-cell hemolysis in rodents.  
*Biosci. Rep.*, 1984, 4(3):253-7.

Al-Awwadi N, Azay J, Poucheret P, Cassanas G, Krosniak M, Auger C, Gasc F, Rouanet JM, Cros G, Teissèdre PL.  
Antidiabetic activity of red wine polyphenolic extract, ethanol, or both in streptozotocin-treated rats.  
*J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52(4):1008-16.

Alessio HM, Goldfarb AH.  
Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training.  
*J. Appl. Physiol.*, 1988, 64(4):1333-6.

Alessio HM, Goldfarb AH, Cutler RG.  
MDA content increases in fast- and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat.  
*Am. J. Physiol.*, 1988, 255(6 Pt 1):C874-7.

Ammon HP, Hagele R, Youssif N.  
A possible role of intracellular and membrane thiols of rat pancreatic islets in calcium uptake and insulin release.  
*Endocrinology*, 1983, 112:720-726.

Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK.  
Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91(16):7583-7.

Asgary S, Naderi GA, Zadegan NS, Vakili R.  
The inhibitory effects of pure flavonoids on in vitro protein glycosylation.  
*J. Herb. Pharmacother.*, 2002, (2):47-55.

Astrup A.

The role of dietary fat in obesity.  
*Semin. Vasc. Med.*, 2005, 5(1):40-7.

Awasthi S, Srivatava SK, Piper JT, Singhal SS, Chaubey M, Awasthi YC.

Curcumin protects against 4-hydroxy-2-trans-nonenal-induced cataract formation in rat lenses.  
*Am. J. Clin. Nutr.*, 1996, 64(5):761-6.

## B

---

Babior BM.

NADPH Oxidase: An update.  
*Blood*, 1999, 93:1464-1476.

Babior BM.

Phagocytes and oxidative stress.  
*Am. J. Med.*, 2000, 109:33-44.

Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, De Camilli P.

Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase.  
*Nature*, 1990,347(6289):151-6.

Balentine DA, Wiseman SA, Bouwens LC.

The chemistry of tea flavonoids.  
*Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1997, 37(8):693-704.

Barbehenn R, Cheek S, Gasperut A, Lister E, Maben R.

Phenolic compounds in red oak and sugar maple leaves have prooxidant activities in the midgut fluids of *Malacosoma disstria* and *Orgyia leucostigma* caterpillars.  
*J. Chem. Ecol.*, 2005, 31(5):969-88.

Beckman KB, Ames BN.

The free radical theory of aging matures.  
*Physiol. Rev.*, 1998, 78(2):547-81.

Benhamou PY.

Biochimie des complications vasculaires du diabète.  
*Synthèse du 14ème Congrès de l'IDF*, Washington DC, 1991.

Berger MM.

Nutritional manipulation of oxidative stress: review of the evidence.  
*Nutrition Clinique et Métabolisme*, 2006, 20(1):48-53.

Bolling BW, Chen CY, Blumberg JB.

Tea and health: preventive and therapeutic usefulness in the elderly?  
*Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2009, 12(1):42-8.

Bohr VA.

DNA damage and its processing. relation to human disease.  
*J. Inherit. Metab. Dis.*, 2002, 25(3):215-22

Bonnefont-Rousselot D, Thérond P, Beaudeau JL, Peynet J, Legrand A, Delattre J.

Aging and oxidative stress. Which potential markers?  
*Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 2001, 59(4):453-9.

Bonnefont-Rousselot D, Raji B, Walrand S, Gardès-Albert M, Jore D, Legrand A, Peynet J, Vasson MP.

An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress.  
*Metabolism*, 2003, 52(5):586-9.

Booth FW, Lees SJ.

Fundamental questions about genes, inactivity, and chronic diseases.  
*Physiol. Genomics*, 2007, 28(2):146-57.

Bors W, Heller W, Michel C, Saran M.

Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies.  
*Methods Enzymol.*, 1990, 186:343-55.

Bose M, Lambert JD, Ju J, Reuhl KR, Shapses SA, Yang CS.

The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice.  
*J. Nutr.*, 2008, 138(9):1677-83.

Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D.

Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies.  
*Lancet*, 1974, 2(7892):1279-83.

Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R.

Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells.  
*FASEB J.*, 1999, 13(10):1231-8.

Bounous G.

Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment.  
*Anticancer Res.*, 2000, 20(6C):4785-92.

Brady PS, Brady LJ, Ullrey DE.

Selenium, vitamin E and the response to swimming stress in the rat.  
*J. Nutr.*, 1979, 109(6):1103-9.

Bravi MC, Pietrangeli P, Laurenti O, Basili S, Cassone-Faldetta M, Ferri C, De Mattia G.

Polyol pathway activation and glutathione redox status in non-insulin-dependent diabetic patients.  
*Metabolism*, 1997, 46(10):1194-8.

Brown MD.

Green tea (*Camellia sinensis*) extract and its possible role in the prevention of cancer.  
*Altern. Med. Rev.*, 1999, 4(5):360-70.

Brownlee M, Cerami A.

The biochemistry of the complications of diabetes mellitus.

*Annu. Rev. Biochem.*, 1981 50:385-432.

Brownlee M, Vlassara H, Cerami A.

Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications.

*Ann. Intern. Med.*, 1984, 101(4):527-37.

Brownlee M, Cerami A, Vlassara H.

Advanced products of nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic vascular disease.

*Diabetes Metab. Rev.*, 1988, 4(5):437-51.

Brownlee M.

Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.

*Nature*, 2001, 414(6865):813-20.

Brownlee M.

The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism.

*Diabetes*, 2005, 54(6):1615-25.

Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR.

Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions.

*Am. J. Gastroenterol.*, 1999, 94(9):2467-74.

Budd SL.

Mechanisms of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation.

*Pharmacol. Ther.*, 1998, 80(2):203-29.

Buqué X, Aspichueta P, Ochoa B.

Molecular basis of obesity-related hepatic steatosis.

*Rev. Esp. Enferm. Dig.*, 2008, 100(9):565-78.

Burg MB.

Molecular basis of osmotic regulation.

*Am. J. Physiol.*, 1995, 268(6 Pt 2):F983-96.

Burns J, Gardner PT, O'Neil J, Crawford S, Morecroft I, McPhail DB, Lister C, Matthews D, MacLean MR, Lean ME, Duthie GG, Crozier A.

Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines.

*J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48(2):220-30.

## C

---

Caballero B.

Vitamin E improves the action of insulin.

*Nutr. Rev.*, 1993, 51(11):339-40.

- Cabrera C, Artacho R, Giménez R.  
Beneficial effects of green tea--a review.  
*J. Am. Coll. Nutr.*, 2006, 25(2):79-99.
- Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A.  
The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2006, 103(7):2334-9.
- Cadet J, Bellon S, Berger M, Bourdat AG, Douki T, Duarte V, Frelon S, Gasparutto D, Muller E, Ravanat JL, Sauvaigo S.  
Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases.  
*Biol. Chem.*, 2002, 383(6):933-43.
- Cai H, Harrison DG.  
Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress.  
*Circ Res.*, 2000, 87(10):840-4.
- Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, Hespeneide EE, Battle EH, Driscoll CJ.  
Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease.  
*Hepatology*, 1999, 29(3):664-9.
- Canali R, Vignolini F, Nobili F, Mengheri E.  
Reduction of oxidative stress and cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) expression by red wine polyphenols in zinc deficiency induced intestinal damage of rat.  
*Free Radic. Biol. Med.*, 2000, 28(11):1661-70.
- Cano A, Arnao MB, Williamson G, Garcia-Conesa MT.  
Superoxide scavenging by polyphenols: effect of conjugation and dimerization.  
*Redox Rep.*, 2002, 7(6):379-83.
- Ceconi C, Boraso A, Cargnoni A, Ferrari R.  
Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact?  
*Arch. Biochem. Biophys.*, 2003, 420(2):217-21
- Cederberg J, Basu S, Eriksson UJ.  
Increased rate of lipid peroxidation and protein carbonylation in experimental diabetic pregnancy.  
*Diabetologia*, 2001, 44(6):766-74.
- Chalopin M, Tesse A, Martínez MC, Rognan D, Arnal JF, Andriantsitohaina R.  
Estrogen receptor alpha as a key target of red wine polyphenols action on the endothelium.  
*PLoS One*, 2010, 5(1):e8554.
- Chedea VS, Braicu C, Socaciu C.  
Antioxidant/prooxidant activity of a polyphenolic grape seed extract.  
*Food Chemistry*, 2010, 121(1):132-139
- Chen D, Daniel KG, Kuhn DJ, Kazi A, Bhuiyan M, Li L, Wang Z, Wan SB, Lam WH, Chan TH, Dou QP.  
Green tea and tea polyphenols in cancer prevention.  
*Front. Biosci.*, 2004, 9:2618-2631.

Chen H, Karne RJ, Hall G, Campia U, Panza JA, Cannon RO 3rd, Wang Y, Katz A, Levine M, Quon MJ.

High-dose oral vitamin C partially replenishes vitamin C levels in patients with Type 2 diabetes and low vitamin C levels but does not improve endothelial dysfunction or insulin resistance.

*Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2006, 290(1):H137-45.

Chen L, Lee MJ, Li H, Yang CS.

Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats.

*Drug Metab. Dispos.*, 1997, 25(9):1045-50.

Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, Hsu MM, Ho YF, Shen TS, Ko JY, Lin JT, Lin BR, Ming-Shiang W, Yu HS, Jee SH, Chen GS, Chen TM, Chen CA, Lai MK, Pu YS, Pan MH, Wang YJ, Tsai CC, Hsieh CY.

Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions.

*Anticancer Res.*, 2001, 21(4B):2895-900.

Cho ES, Jang YJ, Kang NJ, Hwang MK, Kim YT, Lee KW, Lee HJ.

Cocoa procyanidins attenuate 4-hydroxynonenal-induced apoptosis of PC12 cells by directly inhibiting mitogen-activated protein kinase kinase 4 activity.

*Free Radic. Biol. Med.*, 2009, 46(10):1319-27.

Chowdhury PK, Halder M, Choudhury PK, Kraus GA, Desai MJ, Armstrong DW, Casey TA, Rasmussen MA, Petrich JW.

Generation of fluorescent adducts of malondialdehyde and amino acids: toward an understanding of lipofuscin.

*Photochem. Photobiol.*, 2004, 79(1):21-5.

Coimbra S, Castro E, Rocha-Pereira P, Rebelo I, Rocha S, Santos-Silva A.

The effect of green tea in oxidative stress.

*Clin. Nutr.*, 2006, 25(5):790-6.

Coughlan MT, Thorburn DR, Penfold SA, Laskowski A, Harcourt BE, Sourris KC, Tan AL, Fukami K, Thallas-Bonke V, Nawroth PP, Brownlee M, Bierhaus A, Cooper ME, Forbes JM.

RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes.

*J. Am. Soc. Nephrol.*, 2009, 20(4):742-52.

Coyle CH, Philips BJ, Morrisroe SN, Chancellor MB, Yoshimura N.

Antioxidant effects of green tea and its polyphenols on bladder cells.

*Life Sci.*, 2008, 83(1-2):12-8.

## D

---

Daneman D.

Type 1 diabetes.

*Lancet*, 2006, 367(9513):847-58.



Davie SJ, Gould BJ, Yudkin JS.

Effect of vitamin C on glycosylation of proteins.

*Diabetes*, 1992, 41(2):167-73.

Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L.

Free radicals and tissue damage produced by exercise.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1982, 107(4):1198-205.

Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ.

Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation.

*Biochem. J.*, 1997, 324: 1-18.

Diabète Atlas résumé,

Seconde édition 2003, IDF.

Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG.

Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies.

*Hypertension*, 2007, 49(4):717-27.

Donath MY, Gross DJ, Cerasi E, Kaiser N.

Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes.

*Diabetes*, 1999, 48(4):738-44.

Donath MY, Størling J, Maedler K, Mandrup-Poulsen T.

Inflammatory mediators and islet beta-cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes.

*J. Mol. Med.*, 2003, 81(8):455-70.

Dotta F, Censini S, van Halteren AG, Marselli L, Masini M, Dionisi S, Mosca F, Boggi U, Muda AO, Prato SD, Elliott JF, Covacci A, Rappuoli R, Roep BO, Marchetti P.

Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104(12):5115-20.

Douste-Blazy L, Mendy F.

Biologie des lipides chez l'homme : de la physiologie à la pathologie

*Editions Médicales Internationnales*, Paris, 1988.

Dröge W.

Free radicals in the physiological control of cell function.

*Physiol. Rev.*, 2002, 82(1):47-95.

Duthie GG, Robertson JD, Maughan RJ, Morrice PC.

Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running.

*Arch. Biochem. Biophys.*, 1990, 282(1):78-83.

## E

---

Etoh T, Inoguchi T, Kakimoto M, Sonoda N, Kobayashi K, Kuroda J, Sumimoto H, Nawata H.  
Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventional insulin treatment.  
*Diabetologia*, 2003, 46(10):1428-37.

Escarpa A, González MC.  
Optimization strategy and validation of one chromatographic method as approach to determine the phenolic compounds from different sources.  
*J. Chromatogr. A.*, 2000, 897(1-2):161-70.

Evans JL, Goldfine ID.  
Alpha-lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes.  
*Diabetes Technol. Ther.*, 2000, 2(3):401-13.

Evans P, Halliwell B.  
Micronutrients: oxidant/antioxidant status.  
*Br. J. Nutr.*, 2001, 85(Suppl 2):S67-74.

Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID.  
The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance.  
*Antioxid. Redox Signal.*, 2005, 7(7-8):1040-52.

## F

---

Facchini FS, Hua NW, Reaven GM, Stoohs RA.  
Hyperinsulinemia: the missing link among oxidative stress and age-related diseases?  
*Free Radic. Biol. Med.*, 2000, 29(12):1302-6.

Favier A.  
Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique  
*L'Actualité chimique*, 2003, N° 269-270, 108-115.

Feillet-Coudray C, Sutra T, Fouret G, Ramos J, Wrutniak-Cabello C, Cabello G, Cristol JP, Coudray C.  
Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: Involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems.  
*Free Radic. Biol. Med.*, 2009, 46(5):624-32.

Finkel T, Holbrook NJ.  
Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.  
*Nature*, 2000, 408(6809):239-47.

Flora SJ, Mittal M, Mehta A.

Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy.  
*Indian J. Med Res.*, 2008, 128(4):501-23.

Fong DS, Aiello LP, Ferris FL 3rd, Klein R.

Diabetic retinopathy.

*Diabetes Care*, 2004, 27(10):2540-53

Fraga CG.

Cocoa, diabetes, and hypertension: should we eat more chocolate?

*Am. J. Clin. Nutr.*, 2005, (3):541-2.

Fraley AE, Tsimikas S.

Clinical applications of circulating oxidized low-density lipoprotein biomarkers in cardiovascular disease.

*Curr. Opin. Lipidol.*, 2006, 17(5):502-9.

Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE.

Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine.

*Lancet*, 1993, 341 :454-457.

Frankel EN, Huang SW, Aeschbach R.

Antioxidant activity of green teas in different lipid systems.

*J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1997, 74:1309-1315.

Frati-Munari AC, Gordillo BE, Altamirano P, Ariza CR.

Hypoglycemic effect of *Opuntia streptacantha* Lemaire in NIDDM.

*Diabetes Care*, 1988, 11(1):63-6.

Fridovich I.

Superoxide radical and superoxide dismutases.

*Annu. Rev. Biochem.*, 1995, 64:97-112.

Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS.

Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid.

*J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1998, 83(3):847-50.

Fukino Y, Shimbo M, Aoki N, Okubo T, Iso H.

Randomized controlled trial for an effect of green tea consumption on insulin resistance and inflammation markers.

*J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 2005, 51(5):335-42.

## G

Gale C, Ashurst H, Powers H & Martin CN.

Antioxidant vitamin status and carotid atherosclerosis in the elderly.

*Am. J. Clin. Nutr.*, 2001, 74(3):402-8

García-Lafuente A, Guillamón E, Villares A, Rostagno MA, Martínez JA.  
Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease.  
*Inflamm. Res.*, 2009, 58(9):537-52.

Gerzer R, Bohme E, Hofmann F, Schultz G.  
Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper.  
*FEBS Lett.*, 1981, 132:71-74.

Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP.  
Glycation of proteins as a source of superoxide.  
*Diabete Metab.*, 1988, 14(1):25-30.

Gin H.  
Infection and diabetes.  
*Rev. Med. Interne.*, 1993, 14(1):32-8.

GISSI 4 prevenzione.  
*Lancet*, 1999, 354:447-55.

Gonzalez AM, Sochor M, Hothersall JS, McLean P.  
Effect of experimental diabetes on the activity of hexokinase in rat lens: an example of glucose overutilization in diabetes.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978, 30;84(4):858-64.

Göpel SO, Kanno T, Barg S, Weng XG, Gromada J & Rorsman P.  
Regulation of glucagon release in mouse  $\alpha$ -cells by KATP channels and inactivation of TTX-sensitive  $Na^+$  channels.  
*J Physiol.*, 2000, 528(Pt 3):509-20.

Grankvist K, Marklund SL, Täljedal IB.  
CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse.  
*Biochem. J.*, 1981, 199(2):393-8.

Grassi D, Lippi C, Necozione S, Desideri G, Ferri C.  
Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons.  
*Am. J. Clin. Nutr.*, 2005, 81(3):611-4.

Grimaldi A.  
Livre « Diabète de type 2 »  
EMC Référence, 2004.

Grimsrud PA, Picklo MJ Sr, Griffin TJ, Bernlohr DA.  
Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance: identification of adipocyte fatty acid-binding protein as a cellular target of 4-hydroxynonenal.  
*Mol. Cell. Proteomics.*, 2007, 6(4):624-37.

Gul M, Laaksonen DE, Atalay M, Vider L, Hänninen O.  
Effects of endurance training on tissue glutathione homeostasis and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats.  
*Scand. J. Med. Sci. Sports*, 2002, 12(3):163-70.

Guo Q, Zhao B, Li M, Shen S, Xin W.

Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes.

*Biochim. Biophys. Acta.*, 1996, 1304(3):210-22.

Gupta S, Hastak K, Ahmad N, Lewin JS, Mukhtar H.

Inhibition of prostate carcinogenesis in TRAMP mice by oral infusion of green tea polyphenols.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98(18):10350-5.

Gutteridge JM, Stocks J, Dormandy TL.

Thiobarbituric acid-reacting substances derived from autoxidizing linoleic and linolenic acids.

*Anal. Chim. Acta.*, 1974, 70(1):107-11.

## H

---

Han MK.

Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, suppresses cytokine-induced pancreatic beta-cell damage.

*Exp. Mol. Med.*, 2003, 35(2):136-9.

Halliwell B, Gutteridge JMC.

Free Radicals in Biology and Medicine,

Second edition, Clarendon Press, Oxford, 1989.

Halliwell B, Gutteridge JM.

Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview.

*Methods Enzymol.*, 1990, 186:1-85.

Hansen LL, Ikeda Y, Olsen GS, Busch AK, Mosthaf L.

Insulin signaling is inhibited by micromolar concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Evidence for a role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in tumor necrosis factor alpha-mediated insulin resistance.

*J. Biol. Chem.*, 1999, 274(35):25078-84.

Hardy J, Selkoe DJ.

The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.

*Science*, 2002, 298(5595):962-4.

Hasegawa N, Yamada N, Mori M.

Powdered green tea has antilipogenic effect on Zucker rats fed a high-fat diet.

*Phytother. Res.*, 2003, 17(5):477-80.

Hashimoto M, Shahdat MH, Shimada T, Yamasaki H, Fujii Y, Ishibashi Y, Shido O.

Relationship between age-related increases in rat liver lipid peroxidation and bile canalicular plasma membrane fluidity.

*Exp. Gerontol.*, 2001, 37(1):89-97.

Hatch GE.

Pollution and Oxidative Stress in Schoolchildren.

*Indian Pediatr.*, 2010, 47(3):233-9.

Higdon JV, Frei B.

Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions.  
*Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2003, 43(1):89-143.

Holt RR, Lazarus SA, Sullards MC, Zhu QY, Schramm DD, Hammerstone JF, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL.

Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 $\beta$ -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa.  
*Am. J. Clin. Nutr.*, 2002 Oct;76(4):798-804.

Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM.

Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance.  
*J. Clin. Invest.*, 1995, 95(5):2409-15.

Hotta M, Tashiro F, Ikegami H, Niwa H, Ogihara T, Yodoi J, Miyazaki J.

Pancreatic beta cell-specific expression of thioredoxin, an antioxidative and antiapoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotocin-induced diabetes.  
*J. Exp. Med.*, 1998, 188(8):1445-51.

Hung HC, Joshipura KJ, Jiang R, Hu FB, Hunter D, Smith-Warner SA, Colditz GA, Rosner Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease.

B, Spiegelman D, Willett WC.  
*J. Natl. Cancer Inst.*, 2004, 96(21):1577-84.

Hunt JV, Dean RT, Wolff SP.

Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing.  
*Biochem. J.*, 1988, 256(1):205-12.

Hunt JV, Wolff SP.

Oxidative glycation and free radical production: a causal mechanism of diabetic complications.  
*Free Radic. Res. Commun.*, 1991, 12(Pt1):115-23.

Hussain T, Gupta S, Adhami VM, Mukhtar H.

Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits COX-2 without affecting COX-1 expression in human prostate carcinoma cells.  
*Int. J. Cancer.*, 2005, 113(4):660-9.

Hyppönen E, Läärä E, Reunanen A, Järvelin MR, Virtanen SM.

Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study.  
*Lancet*, 2001, 358(9292):1500-3.

## I

Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K, Odaka H, Tanaka T, Ikeda H, Hiai H, Seino Y, Yamada Y.

Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes.  
*Diabetes*, 1999, 48(4):927-32.

Ikeda S, Kawamoto H, Kasaoka K, Hitomi Y, Kizaki T, Sankai Y, Ohno H, Haga S, Takemasa T.  
Muscle type-specific response of PGC-1 alpha and oxidative enzymes during voluntary wheel running in mouse skeletal muscle.  
*Acta. Physiol. (Oxf)*, 2006, 188(3-4):217-23.

Imlay JA, Linn S.  
DNA damage and oxygen radical toxicity.  
*Science*, 1988, 240(4857):1302-9.

Isbrucker RA, Edwards JA, Wolz E, Davidovich A, Bausch J.  
Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 2: dermal, acute and short-term toxicity studies.  
*Food Chem. Toxicol.*, 2006, 44(5):636-50.

## J

---

Jackson TK, Salhanick AI, Elovson J, Deichman ML, Amatruda JM.  
Insulin regulates apolipoprotein B turnover and phosphorylation in rat hepatocytes.  
*J. Clin. Invest.*, 1990, 86(5):1746-51.

Jahr H, Bretzel RG, Wacker T, Weinand S, Brandhorst H, Brandhorst D, Lau D, Hering BJ, Federlin K.  
Toxic effects of superoxide, hydrogen peroxide, and nitric oxide on human and pig islets.  
*Transplant Proc.*, 1995, 27(6):3220-1.

Jaïdane H, Hober D.  
Role of coxsackievirus B4 in the pathogenesis of type 1 diabetes.  
*Diabetes Metab.*, 2008, 34(6 Pt 1):537-48.

Jain SK, Palmer M.  
The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin E on glycosylation of proteins.  
*Free Radic. Biol. Med.*, 1997, 22(4):593-6.

James OFW, Day CP.  
Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): a disease of emerging identity and importance.  
*J Hepatol.*, 1998, 29(3):495-501.

Janle EM, Portocarrero C, Zhu Y, Zhou Q.  
Effect of long-term oral administration of green tea extract on weight gain and glucose tolerance in Zucker diabetic (ZDF) rats.  
*J. Herb. Pharmacother.*, 2005, 5(3):55-65.

## K

---

Kamal-Eldin A, Appelqvist LA.  
The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols.  
*Lipids*, 1996, 31(7):671-701.



- Kang KA, Lee KH, Kim SY, Kim HS, Kim JS, Hyun JW.  
Cytoprotective effects of KIOM-79 on streptozotocin induced cell damage by inhibiting ERK and AP-1.  
*Biol. Pharm. Bull.*, 2007, 30(5):852-8.
- Kang KA, Kim JS, Zhang R, Piao MJ, Ko DO, Wang ZH, Heo YJ, Park DB, Maeng YH, Hyun JW.  
Effect of KIOM-79 against mitochondrial damage induced by streptozotocin in pancreatic beta-cells.  
*J. Toxicol. Environ. Health. A.*, 2009, 72(20):1201-8.
- Kao YH, Chang HH, Lee MJ, Chen CL.  
Tea, obesity, and diabetes.  
*Mol. Nutr. Food Res.*, 2006, 50(2):188-210.
- Kaschina E, Stoll M, Sommerfeld M, Steckelings UM, Kreutz R, Unger T.  
Genetic kininogen deficiency contributes to aortic aneurysm formation but not to atherosclerosis.  
*Physiol. Genomics*, 2004, 19(1):41-9.
- Kashiwagi A, Shinozaki K, Nishio Y, Okamura T, Toda N, Kikkawa R.  
Free radical production in endothelial cells as a pathogenetic factor for vascular dysfunction in the insulin resistance state.  
*Diabetes Res. Clin. Pract.*, 1999, 45(2-3):199-203.
- Katiyar SK, Afaq F, Azizuddin K, Mukhtar H.  
Inhibition of UVB-induced oxidative stress-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate.  
*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2001, 176(2):110-7.
- Katsura K, Rodriguez de Turco EB, Folbergrová J, Bazan NG, Siesjö BK.  
Coupling among energy failure, loss of ion homeostasis, and phospholipase A2 and C activation during ischemia.  
*J. Neurochem.*, 1993, 61(5):1677-84.
- Kaufman DL, Erlander MG, Clare-Salzler M, Atkinson MA, Maclaren NK, Tobin AJ.  
Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes.  
*J. Clin. Invest.*, 1992, 89(1):283-92.
- Kennedy AL, Lyons TJ.  
Glycation, oxidation, and lipoxidation in the development of diabetic complications.  
*Metabolism*, 1997, 46(12 Suppl 1):14-21.
- Kern M, Tapscott EB, Downes DL, Frisell WR, Dohm GL.  
Insulin resistance induced by high-fat feeding is only partially reversed by exercise training.  
*Pflugers Arch.*, 1990, 417(1):79-83.
- Khan A, Safdar M, Ali Khan MM, Khattak KN, Anderson RA.  
Cinnamon improves glucose and lipids of people with type 2 diabetes.  
*Diabetes Care*, 2003, 26(12):3215-8.

Khan NQ, Lees DM, Douthwaite JA, Carrier MJ, Corder R.  
Comparison of red wine extract and polyphenol constituents on endothelin-1 synthesis by cultured endothelial cells.  
*Clin. Sci. (Lond).*, 2002, 103(48):72S-75S.

Khardori R, Pauza ME  
Type 1 Diabetes Mellitus: Pathogenesis and Advances in Therapy.  
*International Journal of Diabetes in Developing Countries*, 2003, 23(4):106-119.

Kim HR, Rho HW, Park BH, Park JW, Kim JS, Kim UH, Chung MY.  
Role of Ca<sup>2+</sup> in alloxan-induced pancreatic beta-cell damage.  
*Biochim. Biophys. Acta.*, 1994, 1227(1-2):87-91.

Kimball CP and Murlin JR.  
Aqueous extracts of pancreas. III. Some precipitation reactions of insulin.  
*J. Biol. Chem.*, 1923, 58(1):337-346.

Kimoto K, Suzuki K, Kizaki T, Hitomi Y, Ishida H, Katsuta H, Itoh E, Ookawara T, Suzuki K, Honke K, Ohno H.  
Gliclazide protects pancreatic beta-cells from damage by hydrogen peroxide.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 28;303(1):112-9.

King GL, Brownlee M.  
The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications.  
*Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 1996, 25(2):255-70.

Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ;  
Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease.  
*Hepatology*, 2005, 41(6):1313-21.

Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, Saudek C, Lehrman M, Cerami A.  
Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus.  
*N. Engl. J. Med.*, 1976, 295(8):417-20.

Koppenol WH.  
100 years of peroxynitrite chemistry and 11 years of peroxynitrite biochemistry.  
*Redox Rep.*, 2001, 6(6):339-41.

Kralik PM, Xu B, Epstein PN.  
Catalase transfection decreases hydrogen peroxide toxicity in a pancreatic beta cell line.  
*Endocr. Res.*, 1998, 24(1):79-87.

Krieger-Brauer HI, Kather H.  
Human fat cells possess a plasma membrane-bound H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating system that is activated by insulin via a mechanism bypassing the receptor kinase.  
*J. Clin. Invest.*, 1992, 89(3):1006-13.

Krinsky NI.  
Carotenoids and cancer in animal models.  
*J. Nutr.*, 1989, 119(1):123-6.

Krippeit-Drews P, Lang F, Häussinger D, Drews G.  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced hyperpolarization of pancreatic B-cells.  
*Pflugers Arch.*, 1994, 426(6):552-4.

Krippeit-Drews P, Kramer C, Welker S, Lang F, Ammon HP, Drews G.  
Interference of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic beta-cells.  
*J. Physiol.*, 1999, 514 ( Pt 2):471-81.

Kristl J, Teskac K, Caddeo C, Abramović Z, Sentjurc M.  
Improvements of cellular stress response on resveratrol in liposomes.  
*Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2009, 73(2):253-9.

Kubisch HM, Wang J, Luche R, Carlson E, Bray TM, Epstein CJ, Phillips JP.  
Transgenic copper/zinc superoxide dismutase modulates susceptibility to type I diabetes.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1994, 91(21):9956-9.

Kubisch HM, Wang J, Bray TM, Phillips JP.  
Targeted overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase protects pancreatic beta-cells against oxidative stress.  
*Diabetes*, 1997, 46(10):1563-6.

Kundu JK, Surh YJ.  
Molecular basis of chemoprevention by resveratrol: NF-kappaB and AP-1 as potential targets.  
*Mutat. Res.*, 2004, 555(1-2):65-80.

Kusminski CM, Shetty S, Orci L, Unger RH, Scherer PE.  
Diabetes and apoptosis: lipotoxicity.  
*Apoptosis*, 2009, 14(12):1484-95.

Kusnik-Joinville O, Weill A, Ricordeau P, Allemand H.  
Diabète traité en France en 2007 : un taux de prévalence proche de 4% et des disparités géographiques croissantes.  
*Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 2008, 43:409-420.

Kuttan R, Bhanumathy P, Nirmala K, George MC.  
Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*).  
*Cancer Lett.*, 1985, 29(2):197-202.

Kuzu N, Bahcecioglu IH, Dagli AF, Ozercan IH, Ustündag B, Sahin K.  
Epigallocatechin gallate attenuates experimental non-alcoholic steatohepatitis induced by high fat diet.  
*J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2008, 23(8 Pt 2):e465-70.

---

## L

Laaksonen DE, Atalay M, Niskanen L, Uusitupa M, Hänninen O, Sen CK.  
Increased resting and exercise-induced oxidative stress in young IDDM men.  
*Diabetes Care*, 1996, 19(6):569-74.

Lal B, Kapoor AK, Asthana OP, Agrawal PK, Prasad R, Kumar P, Srimal RC.  
Efficacy of curcumin in the management of chronic anterior uveitis.  
*Phytother. Res.*, 1999, 13(4):318-22.

Larson RA.  
The antioxidants of higher plants.  
*Phytochemistry*, 1988, 27:969-978.

Latha M, Pari L, Sitasawad S, Bhonde R.  
Scoparia dulcis, a traditional antidiabetic plant, protects against streptozotocin induced oxidative stress and apoptosis in vitro and in vivo.  
*J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 2004, 18(5):261-72.

Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hoult JR, Halliwell B.  
Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability.  
*Biochem. Pharmacol.*, 1991, 42:1673-1681.

Lean ME, Noroozi M, Kelly I, Burns J, Talwar D, Sattar N, Crozier A.  
Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA.  
*Diabetes*, 1999, 48(1):176-81.

Lee H, Bae JH, Lee SR.  
Protective effect of green tea polyphenol EGCG against neuronal damage and brain edema after unilateral cerebral ischemia in gerbils.  
*J. Neurosci. Res.*, 2004, 77(6):892-900.

Lee BW, Kwon SJ, Chae HY, Kang JG, Kim CS, Lee SJ, Yoo HJ, Kim JH, Park KS, Ihm SH.  
Dose-related cytoprotective effect of alpha-lipoic acid on hydrogen peroxide-induced oxidative stress to pancreatic beta cells.  
*Free Radic. Res.*, 2009, 43(1):68-77.

Lefebvre PJ.  
Glucagon and its family revisited.  
*Diabetes Care*, 1995, 18:715-730.

Lefèvre G, Beljean-Leymarie M, Beyerle F, Bonnefont-Rousselot D, Cristol JP, Thérond P, Torrelles J.  
Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances.  
*Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 1998, 56(3):305-19.

Legoy M.  
Le "French Paradox".  
*The Weston A. Price Foundation*, 2002

Leiro J, Alvarez E, Arranz JA, Laguna R, Uriarte E, Orallo F.  
Effects of cis-resveratrol on inflammatory murine macrophages: antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes.  
*J. Leukoc. Biol.*, 2004, 75(6):1156-65.

Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M.

Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues.

*Free Radic. Biol. Med.*, 1996, 20(3):463-6.

Leverve X.

Hyperglycemia and oxidative stress: complex relationships with attractive prospects.

*Intensive Care Med.*, 2003, 29(4):511-4.

Li J, Jiang Y.

Litchi flavonoids: isolation, identification and biological activity.

*Molecules*, 2007, 12(4):745-58.

Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli LM.

Model of nonalcoholic steatohepatitis.

*Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, 79(3):502-9.

Liebman M, Pelican S, Moore SA, Holmes B, Wardlaw MK, Melcher LM, Liddil AC, Paul LC, Dunnagan T, Haynes GW.

Dietary intake, eating behavior, and physical activity-related determinants of high body mass index in rural communities in Wyoming, Montana, and Idaho.

*Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 2003, 27(6):684-92.

Lortz S, Tiedge M, Nachtwey T, Karlsen AE, Nerup J, Lenzen S.

Protection of insulin-producing RINm5F cells against cytokine-mediated toxicity through overexpression of antioxidant enzymes.

*Diabetes*, 2000, 49(7):1123-30.

Lovlin R, Cottle W, Pyke I, Kavanagh M, Belcastro AN.

Are indices of free radical damage related to exercise intensity.

*Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.*, 1987, 56(3):313-6.

Lu YX, Zhang Q, Li J, Sun YX, Wang LY, Cheng WM, Hu XY.

Antidiabetic effects of total flavonoids from *Litsea Coreana* leave on fat-fed, streptozotocin-induced type 2 diabetic rats.

*Am. J. Chin. Med.*, 2010, 38(4):713-25.

## M

---

MacKay DL, Blumberg JB.

The role of tea in human health: an update.

*J. Am. Coll. Nutr.*, 2002, 21(1):1-13.

Mackenzie T, Leary L, Brooks WB.

The effect of an extract of green and black tea on glucose control in adults with type 2 diabetes mellitus: double-blind randomized study.

*Metabolism*, 2007, 56(10):1340-4.

- MacLaughlin JA, Pethig R, Szent-Györgyi A.  
Spectroscopic studies of the protein-methylglyoxal adduct.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1980, 77(2):949-51.
- Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS.  
Oxidative stress and vascular disease.  
*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005, 25(1):29-38.
- Maedler K, Fontana A, Ris F, Sergeev P, Toso C, Oberholzer J, Lehmann R, Bachmann F, Tassinato A, Spinass GA, Halban PA, Donath MY.  
FLIP switches Fas-mediated glucose signaling in human pancreatic beta cells from apoptosis to cell replication.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99(12):8236-41.
- Mandel SA, Amit T, Weinreb O, Reznichenko L, Youdim MB.  
Simultaneous manipulation of multiple brain targets by green tea catechins: a potential neuroprotective strategy for Alzheimer and Parkinson diseases.  
*CNS Neurosci Ther.*, 2008, 14(4):352-65.
- Makita Z, Yanagisawa K, Kuwajima S, Bucala R, Vlassara H, Koike T.  
The role of advanced glycosylation end-products in the pathogenesis of atherosclerosis.  
*Nephrol. Dial. Transplant.*, 1996, 11(Suppl 5):31-3.
- Mattson MP.  
Oxidative stress, perturbed calcium homeostasis, and immune dysfunction in Alzheimer's disease.  
*J. Neurovirol.*, 2002, 8(6):539-50.
- Mattson MP, Wan R.  
Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems.  
*J. Nutr. Biochem.*, 2005, 16(3):129-37..
- Mattson MP, Magnus T.  
Ageing and neuronal vulnerability.  
*Nat. Rev. Neurosci.*, 2006, 7(4):278-94.
- Mao GD, Poznansky MJ.  
Electron spin resonance study on the permeability of superoxide radicals in lipid bilayers and biological membranes.  
*FEBS Lett.*, 1992, 305(3):233-6.
- Mas E, Woodman RJ, Burke V, Puddey IB, Beilin LJ, Durand T, Mori TA.  
The omega-3 fatty acids EPA and DHA decrease plasma F(2)-isoprostanes: Results from two placebo-controlled interventions.  
*Free Radic. Res.*, 2010.
- Meier CA, Bobbioni E, Gabay C, Assimakopoulos-Jeannet F, Golay A, Dayer JM.  
IL-1 receptor antagonist serum levels are increased in human obesity: a possible link to the resistance to leptin?  
*J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002, 87(3):1184-8.

- Metodiewa D, Jaiswal AK, Cenas N, Dickancaité E, Segura-Aguilar J.  
Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product.  
*Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 26(1-2):107-16.
- Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC.  
The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer.  
*Pharmacol. Rev.*, 2000, 52(4):673-751.
- Migliore L, Coppedè F.  
Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases.  
*Mutat. Res.*, 2002, 512(2-3):135-53.
- Milagro FI, Campión J, Martínez JA.  
Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress.  
*Obesity (Silver Spring)*, 2006, 14(7):1118-23.
- Miller NJ, Castelluccio C, Tijburg L, Rice-Evans C.  
The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters--radical scavengers or metal chelators?  
*FEBS Lett.*, 1996, 392(1):40-4.
- Miura Y, Chiba T, Miura S, Tomita I, Umegaki K, Ikeda M, Tomita T.  
Green tea polyphenols (flavan 3-ols) prevent oxidative modification of low density lipoproteins: an ex vivo study in humans.  
*J. Nutr. Biochem.*, 2000, 11(4):216-22.
- Miwa I, Ichimura N, Sugiura M, Hamada Y, Taniguchi S.  
Inhibition of glucose-induced insulin secretion by 4-hydroxy-2-nonenal and other lipid peroxidation products.  
*Endocrinology*, 2000, 141(8):2767-72.
- Monnier VM.  
Toward a Maillard reaction theory of aging.  
*Prog. Clin. Biol. Res.*, 1989, 304:1-22.
- Morel I, Lescoat G, Cogrel P, Sergent O, Padeloup N, Brissot P, Cillard P, Cillard J.  
Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures.  
*Biochem. Pharmacol.*, 1993, 45(1):13-9.
- Moriscot C, Richard MJ, Favrot MC, Benhamou PY.  
Protection of insulin-secreting INS-1 cells against oxidative stress through adenoviral-mediated glutathione peroxidase overexpression.  
*Diabetes Metab.*, 2003, 29(2 Pt 1):145-51.
- Motterlini R, Foresti R, Bassi R, Green CJ.  
Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress.  
*Free Radic. Biol. Med.*, 2000, 28(8):1303-12.



Mueller CF, Laude K, McNally JS, Harrison DG.  
ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels.  
*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005, 25(2):274-8.

Murakami C, Hirakawa Y, Inui H, Nakano Y, Yoshida H.  
Effects of epigallocatechin 3-O-gallate on cellular antioxidative system in HepG2 cells.  
*J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 2002, 48(2):89-94.

## N

---

Nakagawa K, Ninomiya M, Okubo T, Aoi N, Juneja LR, Kim M, Yamanaka K, Miyazawa T.  
Tea catechin supplementation increases antioxidant capacity and prevents phospholipid hydroperoxidation in plasma of humans.  
*J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47(10):3967-73.

Nakagawa T, Yokozawa T.  
Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea.  
*Food Chem. Toxicol.*, 2002, 40(12):1745-50.

Nakayama M, Inoguchi T, Sonta T, Maeda Y, Sasaki S, Sawada F, Tsubouchi H, Sonoda N, Kobayashi K, Sumimoto H, Nawata H.  
Increased expression of NAD(P)H oxidase in islets of animal models of Type 2 diabetes and its improvement by an AT1 receptor antagonist.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, 332(4):927-33.

Nicklas TA, Yang SJ, Baranowski T, Zakeri I, Berenson G.  
Eating patterns and obesity in children. The Bogalusa Heart Study.  
*Am. J. Prev. Med.*, 2003, 25(1):9-16.

Njoroge FG, Sayre LM, Monnier VM.  
Detection of D-glucose-derived pyrrole compounds during Maillard reaction under physiological conditions.  
*Carbohydr. Res.*, 1987, 167:211-20.

Noctor G, Foyer CH.  
Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control.  
*Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 1998, 49:249-279.

Norris JM, Yin X, Lamb MM, Barriga K, Seifert J, Hoffman M, Orton HD, Barón AE, Clare-Salzler M, Chase HP, Szabo NJ, Erlich H, Eisenbarth GS, Rewers M.  
Omega-3 polyunsaturated fatty acid intake and islet autoimmunity in children at increased risk for type 1 diabetes.  
*JAMA*, 2007, 298(12):1420-8.

## O

---

Oliveira HR, Verlengia R, Carvalho CR, Britto LR, Curi R, Carpinelli AR.  
Pancreatic beta-cells express phagocyte-like NAD(P)H oxidase.  
*Diabetes*, 2003, 52(6):1457-63.

Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh JP, Meyskens FL Jr, Valanis B, Williams JH Jr, Barnhart S, Cherniack MG, Brodtkin CA, Hammar S.  
Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial.  
*J. Natl. Cancer Inst.*, 1996, 88(21):1550-9.

Oppert JM.  
Physical activity as a therapeutic tool in type 2 diabetes: practical aspects.  
*Ann. Endocrinol. (Paris)*, 2004, 65(1 Suppl):S52-8.

Orallo F, Alzueta AF.  
Preliminary study of the vasorelaxant effects of (+)-nantenine, an alkaloid isolated from *Platycapnos spicata*, in rat aorta.  
*Planta. Med.*, 2001, 67(9):800-6.

Orallo F, Alvarez E, Camiña M, Leiro JM, Gómez E, Fernández P.  
The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption.  
*Mol. Pharmacol.*, 2002, 61(2):294-302.

Orgogozo JM, Dartigues JF, Lafont S, Letenneur L, Commenges D, Salamon R, Renaud S, Bretelet MB.  
Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area.  
*Rev. Neurol.*, 1997, 153:185-192.

## P

---

Palinski W, Rosenfeld ME, Ylä-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, Parthasarathy S, Carew TE, Steinberg D, Witztum JL.  
Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1989, 86(4):1372-6.

Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL.  
Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment.  
*Science*, 1983, 222(4630):1337-9.

Paolisso G, D'Amore A, Galzerano D, Balbi V, Giugliano D, Varricchio M, D'Onofrio F.  
Daily vitamin E supplements improve metabolic control but not insulin secretion in elderly type II diabetic patients.  
*Diabetes Care*, 1993, 16(11):1433-7.

- Paolisso G, D'Amore A, Balbi V, Volpe C, Galzerano D, Giugliano D, Sgambato S, Varricchio M, D'Onofrio F.  
Plasma vitamin C affects glucose homeostasis in healthy subjects and in non-insulin-dependent diabetics.  
*Am. J. Physiol.*, 1994, 267(4 Pt 1).
- Park S, Hong SM, Lee JE, Sung SR.  
Exercise improves glucose homeostasis that has been impaired by a high-fat diet by potentiating pancreatic beta-cell function and mass through IRS2 in diabetic rats.  
*J. Appl. Physiol.*, 2007, 103(5):1764-71.
- Pearl-Yafe M, Kaminitz A, Yolcu ES, Yaniv I, Stein J, Askenasy N.  
Pancreatic islets under attack: cellular and molecular effectors.  
*Curr Pharm Des*, 2007, 13(7):749-60.
- Pelli K, Lyly M.  
Antioxidants in the diet.  
VTT Biotechnology, Finland.
- Peth JA, Kinnick TR, Youngblood EB, Tritschler HJ, Henriksen EJ.  
Effects of a unique conjugate of alpha-lipoic acid and gamma-linolenic acid on insulin action in obese Zucker rats.  
*Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2000, 278(2):R453-9.
- Pihoker C, Gilliam LK, Hampe CS, Lernmark A.  
Autoantibodies in diabetes.  
*Diabetes*, 2005, 54(Suppl.2):S52-61
- Pinent M, Blay M, Bladé MC, Salvadó MJ, Arola L, Ardévol A.  
Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines.  
*Endocrinology*, 2004, 145(11):4985-90.
- Pirot P, Cardozo AK, Eizirik DL.  
Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes.  
*Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, 2008, 52(2):156-65.
- Pociot F, McDermott MF.  
Genetics of type 1 diabetes mellitus.  
*Genes Immun.*, 2002, 3(5):235-49.
- Potter GA, Patterson LH, Wanogho E, Perry PJ, Butler PC, Ijaz T, Ruparelia KC, Lamb JH, Farmer PB, Stanley LA, Burke MD.  
The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1.  
*Br. J. Cancer.*, 2002, 86(5):774-8.
- Pozo-Guisado E, Alvarez-Barrientos A, Mulero-Navarro S, Santiago-Josefat B, Fernandez-Salguero PM.  
The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle.  
*Biochem. Pharmacol.*, 2002, 64(9):1375-86.

Prior RL, Cao G.

Antioxydant related to natural product supplements – the need for methods of standardisation. *Journal of American Nutraceutical Association*, 1999, 2(2):45-56.

---

## Q

---

Quesada I, Tudurí E, Ripoll C, Nadal A.

Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes.

*J. Endocrinol.*, 2008, 199(1):5-19.

---

## R

---

Radák Z, Sasvári M, Nyakas C, Pucsok J, Nakamoto H, Goto S.

Exercise preconditioning against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in proteins of rat myocardium.

*Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, 376(2):248-51.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S.

Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium.

*Lancet*, 1987, 2(8567):1057-8.

Raffaella C, Francesca B, Italia F, Marina P, Giovanna L, Susanna I.

Alterations in hepatic mitochondrial compartment in a model of obesity and insulin resistance.

*Obesity (Silver Spring)*, 2008, 16(5):958-64

Ramadass P, Meerarani P, Toborek M, Robertson LW, Hennig B.

Dietary flavonoids modulate PCB-induced oxidative stress, CYP1A1 induction, and AhR-DNA binding activity in vascular endothelial cells.

*Toxicol. Sci.*, 2003, 76(1):212-9.

Rao AV, Balachandran B.

Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases.

*Nutr. Neurosci.*, 2002, 5(5):291-309.

Rasilainen S, Nieminen JM, Levonen AL, Otonkoski T, Lapatto R.

Dose-dependent cysteine-mediated protection of insulin-producing cells from damage by hydrogen peroxide.

*Biochem. Pharmacol.*, 2002, 63(7):1297-304.

Ratziu V, Bonyhay L, Di Martino V, Charlotte F, Cavallaro L, Sayegh-Tainturier MH, Giral P, Grimaldi A, Opolon P, Poynard T.

Survival, liver failure, and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis.

*Hepatology*, 2002, 35(6):1485-93.

Ray R, Shah AM.

NADPH oxidase and endothelial cell function.

*Clin. Sci. (Lond.)*, 2005, 109(3):217-26.

Raynal R, Cortie C.

Ouvrage « Le diabète de type 2: aspect fondamentaux ».

Rector RS, Thyfault JP, Laye MJ, Morris RT, Borengasser SJ, Uptergrove GM, Chakravarthy MV, Booth FW, Ibdah JA.

Cessation of daily exercise dramatically alters precursors of hepatic steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats.

*J. Physiol.*, 2008, 586(Pt 17):4241-9.

Redondo MJ, Rewers M, Yu L, Garg S, Pilcher CC, Elliott RB, Eisenbarth GS.

Genetic determination of islet cell autoimmunity in monozygotic twin, dizygotic twin, and non-twin siblings of patients with type 1 diabetes: prospective twin study.

*BMJ.*, 1999, 318(7185):698-702.

Renard E, Schaepelynck-Bélicar P.

Implantable insulin pumps. A position statement about their clinical use.

*Diabetes Metab.*, 2007, 33(2):158-66.

Renaud SC, Guéguen R, Schenker J, d'Houtaud A.

Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France.

*Epidemiology*, 1998, 9(2):184-8.

Requena JR, Fu MX, Ahmed MU, Jenkins AJ, Lyons TJ, Thorpe SR.

Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions.

*Nephrol. Dial. Transplant.*, 1996, 11(Suppl 5):48-53.

Rezai-Zadeh K, Shytle D, Sun N, Mori T, Hou H, Jeanniton D, Ehrhart J, Townsend K, Zeng J, Morgan D, Hardy J, Town T, Tan J.

Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates amyloid precursor protein cleavage and reduces cerebral amyloidosis in Alzheimer transgenic mice.

*J. Neurosci.*, 2005, 25(38):8807-14.

Rice-Evans C.

Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants?

*Biochem. Soc. Symp.*, 1995, 61:103-16.

Ricordi C, Finke EH, Dye ES, Socci C, Lacy PE.

Automated isolation of mouse pancreatic islets.

*Transplantation*, 1988, 46(3):455-7.

Rietveld A, Wiseman S.

Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials.

*J. Nutr.*, 2003, 133(10):3285S-3292S.

Robichon C, Girard J, Postic C.

Can the hyperactivity of lipogenesis cause hepatic steatosis? A role for ChREBP.

*Med. Sci.*, 2008, 24(10):841-6.

Roghani M, Baluchnejadmojarad T.  
Hypoglycemic and hypolipidemic effect and antioxidant activity of chronic epigallocatechin-gallate in streptozotocin-diabetic rats.  
*Pathophysiology*. 2010, 17(1):55-59.

Rolfe DF, Brown GC.  
Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals.  
*Physiol. Rev.*, 1997, 77(3):731-58.

Romieu I, Garcia-Esteban R, Sunyer J, Rios C, Alcaraz-Zubeldia M, Velasco SR, Holguin F.  
The effect of supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids on markers of oxidative stress in elderly exposed to PM(2.5).  
*Environ. Health Perspect.*, 2008, 116(9):1237-42.

Rosenfeld L.  
Insulin: discovery and controversy.  
*Clin Chem.*, 2002, 48(12):2270-88.

Rouillé Y, Martin S, Steiner DF.  
Differential processing of proglucagon by the subtilisin-like prohormone convertases PC2 and PC3 to generate either glucagon or glucagon-like peptide.  
*J. Biol. Chem.*, 1995, 270:26488-26496.

Roussis IG, Lambropoulos I, Soulti K.  
Scavenging Capacities of Wines and Wine Phenolic Extracts.  
*Food Technol. Biotechnol.*, 2005, 43(4):351–358.

Ruderman N, Prentki M.  
AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome.  
*Nat. Rev. Drug Discov.*, 2004, 3(4):340-51.

Rudich A, Tirosh A, Potashnik R, Hemi R, Kanety H, Bashan N.  
Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes.  
*Diabetes*, 1998, 47(10):1562-9.

Ryu OH, Lee J, Lee KW, Kim HY, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Baik SH, Choi DS, Choi KM.  
Effects of green tea consumption on inflammation, insulin resistance and pulse wave velocity in type 2 diabetes patients.  
*Diabetes Res. Clin. Pract.*, 2006, 71(3):356-8.

## S

---

St Leger AS, Cochrane AL, Moore F.  
Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine.  
*Lancet*, 1979, 1(8124):1017-20.

- Sakano K, Mizutani M, Murata M, Oikawa S, Hiraku Y, Kawanishi S.  
Procyanidin B2 has anti- and pro-oxidant effects on metal-mediated DNA damage.  
*Free Radic. Biol. Med.*, 2005, 39(8):1041-9.
- Sambaiah K, Srinivasan K.  
Effect of cumin, cinnamon, ginger, mustard and tamarind in induced hypercholesterolemic rats.  
*Nahrung*, 1991, 35(1):47-51.
- Sang S, Lambert JD, Hong J, Tian S, Lee MJ, Stark RE, Ho CT, Yang CS.  
Synthesis and structure identification of thiol conjugates of (-)-epigallocatechin gallate and their urinary levels in mice.  
*Chem. Res. Toxicol.*, 2005, 18(11):1762-9.
- Santamaria P, Nakhleh RE, Sutherland DE, Barbosa JJ.  
Characterization of T lymphocytes infiltrating human pancreas allograft affected by isletitis and recurrent diabetes.  
*Diabetes*, 1992, 41(1):53-61.
- Sarkar A, Bhaduri A.  
Black tea is a powerful chemopreventor of reactive oxygen and nitrogen species: comparison with its individual catechin constituents and green tea.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, 284(1):173-8.
- Schneider Y, Chabert P, Stutzmann J, Coelho D, Fougèrouse A, Gossé F, Launay JF, Brouillard R, Raul F.  
Resveratrol analog (Z)-3,5,4'-trimethoxystilbene is a potent anti-mitotic drug inhibiting tubulin polymerization.  
*Int. J. Cancer.*, 2003, 107(2):189-96.
- Senthil Kumaran V, Arulmathi K, Srividhya R, Kalaiselvi P.  
Repletion of antioxidant status by EGCG and retardation of oxidative damage induced macromolecular anomalies in aged rats.  
*Exp. Gerontol.*, 2008, 43(3):176-83.
- Seo KI, Choi MS, Jung UJ, Kim HJ, Yeo J, Jeon SM, Lee MK.  
Effect of curcumin supplementation on blood glucose, plasma insulin, and glucose homeostasis related enzyme activities in diabetic db/db mice.  
*Mol. Nutr. Food Res.*, 2008, 52(9):995-1004.
- Serteyn D, Grulke S, Franck T, Mouithys-mickalad A, Deby-dupont G.  
La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes.  
*Ann. Méd. Vét.*, 2003, 147:79-93
- Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV.  
Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen.  
*N. Engl. J. Med.*, 2000, 343(4):230-8.
- Sharma RD, Raghuram TC, Rao NS.  
Effect of fenugreek seeds on blood glucose and serum lipids in type I diabetes.  
*Eur. J. Clin. Nutr.*, 1990, 44(4):301-6.



- Shen X, Cai W, Tang Q, Feng Y, et al.  
Oxidative stress in a rat model of dietary-induced obesity.  
*Wei. Sheng Yan Jiu.*, 2007, 36(4):440-2.
- Shimabukuro M, Higa M, Zhou YT, Wang MY, Newgard CB, Unger RH.  
Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyl transferase overexpression.  
*J. Biol. Chem.*, 1998, 273:32487-90.
- Shiva S, Crawford JH, Ramachandran A, Ceaser EK, Hillson T, Brookes PS, Patel RP, Darley-Usmar VM.  
Mechanisms of the interaction of nitroxyl with mitochondria.  
*Biochem. J.*, 2004, 379(Pt 2):359-66.
- Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS.  
Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers.  
*Planta. Med.*, 1998, 64(4):353-6.
- Shulman GI.  
Cellular mechanisms of insulin resistance.  
*J. Clin. Invest.*, 2000, 106(2):171-6.
- Sies H.  
Role of reactive oxygen species in biological processes.  
*Klin. Wochenschr.*, 1991, 69(21-23):965-8.
- Sies H.  
Strategies of antioxidant defense.  
*Eur. J. Biochem.*, 1993, 215(2):213-9.
- Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA.  
Preventing foot ulcers in patients with diabetes.  
*JAMA.*, 2005, 293:217-228.
- Sinclair AJ, Lunec J, Girling AJ, Barnett AH.  
Modulators of free radical activity in diabetes mellitus: role of ascorbic acid.  
*EXS*, 1992, 62:342-52.
- Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC.  
Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis.  
*Free Radic. Biol. Med.*, 2002, 33(5):575-86.
- Solimena M, Dirkx R, Hermel JM, Pleasic-Williams S, Shapiro JA, Caron L, Rabin DU.  
ICA 512, an autoantigen of type I diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules.  
*EMBO J.*, 1996, 15(9):2102-2114.
- Solomons NW, Gross R.  
Urban nutrition in developing countries.  
*Nutr. Rev.*, 1995, 53(4 Pt 1):90-5.

Song EK, Hur H, Han MK.

Epigallocatechin gallate prevents autoimmune diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin in mice.

*Arch. Pharm. Res.*, 2003, 26(7):559-63.

Soni KB, Kuttan R.

Effect of oral curcumin administration on serum peroxides and cholesterol levels in human volunteers.

*Indian. J. Physiol. Pharmacol.*, 1992, 36(4):273-5.

Sorg O.

Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?

*C. R. Biol.*, 2004, 327(7):649-62.

Stadtman ER.

Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences.

*Free Radic. Biol. Med.*, 1991, 10(3-4):249.

Stadtman ER.

Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions.

*Annu. Rev. Biochem.*, 1993, 62:797-821.

Stahl W, Sies H.

Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids.

*Diabetes*, 1997, 46(Suppl 2):S14-8.

Stahl W, Sies H.

Carotenoids and protection against solar UV radiation.

*Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 2002, 15(5):291-6.

Stene LC, Joner G; Norwegian Childhood Diabetes Study Group.

Use of cod liver oil during the first year of life is associated with lower risk of childhood-onset type 1 diabetes: a large, population-based, case-control study.

*Am. J. Clin. Nutr.*, 2003, 78(6):1128-34.

Stevnsner T, Thorslund T, de Souza-Pinto NC, Bohr VA.

Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging.

*Exp. Gerontol.*, 2002, 37(10-11):1189-96.

Stewart AJ, Mullen W, Crozier A.

On-line high-performance liquid chromatography analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in green and black tea.

*Mol. Nutr. Food Res.*, 2005, 49(1):52-60.

Su HC, Hung LM, Chen JK.

Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats.

*Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2006, 290(6):1339-46.

Suárez G, Rajaram R, Bhuyan KC, Oronsky AL, Goidl JA.  
Administration of an aldose reductase inhibitor induces a decrease of collagen fluorescence in diabetic rats.  
*J. Clin. Invest.*, 1988, 82(2):624-7.

Suh KS, Chon S, Oh S, Kim SW, Kim JW, Kim YS, Woo JT.  
Prooxidative effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate on the HIT-T15 pancreatic beta cell line.  
*Cell. Biol. Toxicol.*, 2010, 26(3):189-99.

Sutherland BM, Harber LC, Kochevar IE.  
Pyrimidin dimer formation and repair in human skin.  
*Cancer Res.*, 1980, 40:3181-5.

Sutherland DE, Cecka M, Gruessner AC.  
Report from the International Pancreas Transplant Registry--1998.  
*Transplant Proc.*, 1999, 31(1-2):597-601.

Sutherland DE, Gruessner RW, Gruessner AC.  
Pancreas transplantation for treatment of diabetes mellitus.  
*World J. Surg.*, 2001, 25(4):487-96.

## T

---

Tedesco I, Russo M, Russo P, Iacomino G, Russo GL, Carraturo A, Faruolo C, Moio L, Palumbo R.  
Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells.  
*J. Nutr. Biochem.*, 2000, 11(2):114-9.

Thallas-Bonke V, Thorpe SR, Coughlan MT, Fukami K, Yap FY, Sourris KC, Penfold SA, Bach LA, Cooper ME, Forbes JM.  
Inhibition of NADPH oxidase prevents advanced glycation end product-mediated damage in diabetic nephropathy through a protein kinase C-alpha-dependent pathway.  
*Diabetes*, 2008 Feb;57(2):460-9.

The ATBC Cancer Prevention Study Group.  
The alpha-tocopherol, beta-carotene lung cancer prevention study: design, methods, participant characteristics, and compliance.  
*Ann. Epidemiol.*, 1994, 4(1):1-10.

The Alpha-Tocopherol Beta Carotene Cancer Prevention Study Group.  
The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers.  
*N. Engl. J. Med.*, 1994, 330(15):1029-35.

Thornalley PJ, McLellan AC, Lo TW, Benn J, Sönksen PH.  
Negative association between erythrocyte reduced glutathione concentration and diabetic complications.  
*Clin. Sci. (Lond.)*, 1996, 91(5):575-82.

Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS.

Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose.  
*Biochem. J.*, 1999, 344(Pt 1):109-16.

Tian B, Sun Z, Xu Z, Hua Y.

Chemiluminescence analysis of the prooxidant and antioxidant effects of epigallocatechin-3-gallate.  
*Asia. Pac. J. Clin. Nutr.*, 2007, 16(1):153-7.

Tiedge M, Lortz S, Munday R, Lenzen S.

Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5F cells against the toxicity of reactive oxygen species.  
*Diabetes*, 1998, 47(10):1578-85.

Tiedge M, Lortz S, Munday R, Lenzen S.

Protection against the co-operative toxicity of nitric oxide and oxygen free radicals by overexpression of antioxidant enzymes in bioengineered insulin-producing RINm5F cells.  
*Diabetologia*, 1999, 42(7):849-55.

Tinahones FJ, Rubio MA, Garrido-Sánchez L, Ruiz C, Gordillo E, Cabrerizo L, Cardona F.

Green tea reduces LDL oxidability and improves vascular function.  
*J. Am. Coll. Nutr.*, 2008, 27(2):209-13.

Torzewski M, Klouche M, Hock J, Messner M, Dorweiler B, Torzewski J, Gabbert HE, Bhakdi S.

Immunohistochemical demonstration of enzymatically modified human LDL and its colocalization with the terminal complement complex in the early atherosclerotic lesion.  
*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1998, 18(3):369-78.

Trout DL.

Vitamin C and cardiovascular risk factors.  
*Am. J. Clin. Nutr.*, 1991, 53:322S-5S.

Tsubouchi H, Inoguchi T, Inuo M, Kakimoto M, Sonta T, Sonoda N, Sasaki S, Kobayashi K, Sumimoto H, Nawata H.

Sulfonylurea as well as elevated glucose levels stimulate reactive oxygen species production in the pancreatic beta-cell line, MIN6—a role of NAD(P)H oxidase in beta-cells,  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, 7:60–65.

## U

---

Uchizono Y, Takeya R, Iwase M, Sasaki N, Oku M, Imoto H, Iida M, Sumimoto H.

Expression of isoforms of NADPH oxidase components in rat pancreatic islets.  
*Life Sci.*, 2006, 80(2):133-9.

## V

---

Vacek L, Machova L.

Early stages of experimental atheromatosis.

*Biochem. Exp. Biol.*, 1979, 15(4):335-40.

Van der Werf N, Kroese FG, Rozing J, Hillebrands JL.

Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes.

*Diabetes Metab. Res. Rev.*, 2007, 23(3):169-83.

van het Hof KH, de Boer HS, Wiseman SA, Lien N, Westrate JA, Tijburg LB.

Consumption of green or black tea does not increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans.

*Am. J. Clin. Nutr.*, 1997, 66(5):1125-32.

van Het Hof KH, West CE, Weststrate JA, Hautvast JG.

Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids.

*J. Nutr.*, 2000, 130(3):503-6.

Viinikka L, Vuori J, Ylikorkala O.

Lipid peroxides, prostacyclin, and thromboxane A<sub>2</sub> in runners during acute exercise.

*Med. Sci. Sports Exerc.*, 1984, 16(3):275-7.

Voet D, Voet JG.

Biochimie, 2ème édition.

Edition De Boeck, 2005.

## X

---

Xia P, Inoguchi T, Kern TS, Engerman RL, Oates PJ, King GL.

Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia.

*Diabetes*, 1994, 43(9):1122-9.

Xu L, Badr MZ.

Enhanced potential for oxidative stress in hyperinsulinemic rats: imbalance between hepatic peroxisomal hydrogen peroxide production and decomposition due to hyperinsulinemia.

*Horm. Metab. Res.*, 1999, 31(4):278-82.

## Y

---

Yamabe N, Yokozawa T, Oya T, Kim M.

Therapeutic potential of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate on renal damage in diabetic nephropathy model rats.

*J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2006, 319(1):228-36.

Yang GY, Liao J, Li C, Chung J, Yurkow EJ, Ho CT, Yang CS.  
Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction.  
*Carcinogenesis*, 2000, 21(11):2035-9.

Yang S, Lin HZ, Hwang J, Chacko VP, Diehl AM.  
Hepatic hyperplasia in noncirrhotic fatty livers: is obesity-related hepatic steatosis a premalignant condition?  
*Cancer Res.*, 2001, 61(13):5016-23.

Yang TT, Koo MW.  
Inhibitory effect of Chinese green tea on endothelial cell-induced LDL oxidation.  
*Atherosclerosis*, 2000, 148(1):67-73.

Yang YB, Piao YJ.  
Effects of resveratrol on secondary damages after acute spinal cord injury in rats.  
*Acta. Pharmacol. Sin.*, 2003, 24(7):703-10.

Yao K, Ye P, Zhang L, Tan J, Tang X, Zhang Y.  
Epigallocatechin gallate protects against oxidative stress-induced mitochondria-dependent apoptosis in human lens epithelial cells.  
*Mol. Vis.*, 2008, 14:217-23.

Yin ST, Tang ML, Deng HM, Xing TR, Chen JT, Wang HL, Ruan DY.  
Epigallocatechin-3-gallate induced primary cultures of rat hippocampal neurons death linked to calcium overload and oxidative stress.  
*Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 2009, 379(6):551-64.

## W

---

Waltner-Law ME, Wang XL, Law BK, Hall RK, Nawano M, Granner DK.  
Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production.  
*J. Biol. Chem.*, 2002, 277(38):34933-40.

Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL.  
Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE.  
*Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2001, 280(5):E685-94.

Weisberg SP, Leibel R, Tortoriello DV.  
Dietary curcumin significantly improves obesity-associated inflammation and diabetes in mouse models of diabetes.  
*Endocrinology*, 2008, 149(7):3549-58.

Widlansky ME, Hamburg NM, Anter E, Holbrook M, Kahn DF, Elliott JG, Keaney JF Jr, Vita JA.  
Acute EGCG supplementation reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease.  
*J. Am. Coll. Nutr.*, 2007, 26(2):95-102

Wolff SP, Dean RT.

Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes.

*Biochem. J.*, 1987, 245(1):243-50.

Wolff SP, Bascal ZA, Hunt JV.

"Autoxidative glycosylation": free radicals and glycation theory.

*Prog. Clin. Biol. Res.*, 1989, 304:259-75.

Wolff SP.

Is hyperglycemia risky enough to justify the increased risk of hypoglycemia linked with tight diabetes control?

*Biochem. Med. Metab. Biol.*, 1991, 46(2):129-39.

Wolfram S, Wang Y, Thielecke F.

Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench.

*Mol. Nutr. Food Res.*, 2006, 50(2):176-87.

Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL.

Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States.

*J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52(12):4026-37.

## Z

---

Zastawny TH, Dabrowska M, Jaskolski T, Klimarczyk M, Kulinski L, Koszela A, Szczesniewicz M, Sliwinska M, Witkowski P, Olinski R.

Comparison of oxidative base damage in mitochondrial and nuclear DNA.

*Free Radic. Biol. Med.*, 1998, 24(5):722-5.

Zern TL, Wood RJ, Greene C, West KL, Liu Y, Aggarwal D, Shachter NS, Fernandez ML.

Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre- and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress.

*J. Nutr.*, 2005, 135(8):1911-7.

Zhang F, Ye C, Li G, Ding W, Zhou W, Zhu H, Chen G, Luo T, Guang M, Liu Y, Zhang D, Zheng S, Yang J, Gu Y, Xie X, Luo M.

The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters.

*Exp. Anim.*, 2003, 52(5):401-7.

Zuo Y, Xiang B, Yang J, Sun X, Wang Y, Cang H, Yi J.

Oxidative modification of caspase-9 facilitates its activation via disulfide-mediated interaction with Apaf-1.

*Cell. Res.*, 2009, 19(4):449-57.



# Communications

## Communications orales (Grand Public)

- Dans le cadre de l'association « Vaincre le Diabète », chaque année au Centre européen d'étude du Diabète, les travaux en cours ont été présentés devant les bénévoles de l'association, en vulgarisant aux mieux les termes scientifiques afin que la thématique soit comprise de chacun :
  - Stress oxydant et diabète (Juillet 2008)
  - Stress oxydant et diabète : les données *in vitro* (Juin 2009)
  - Stress oxydant et diabète : données des études *in vivo* (Juin 2010)

## Communications affichées

- « Effet antioxydant des extraits de polyphénols, de la procyanidine B2, de l'épigallocatechine gallate, du resvératrol *cis* and *trans* sur des cellules RINm5F après un stress oxydant »,  
Association de Langue Française pour l'Etude du Diabète et des Maladies Métaboliques, Mars 2009, Strasbourg, France (Diabetes & Metabolism, March 2009, page A64)
- « Mesures du pH et du rH<sup>2</sup> du sang de rat par la méthode bioélectronique de Vincent »,  
Association de Langue Française pour l'Etude du Diabète et des Maladies Métaboliques, Mars 2009, Strasbourg, France (Diabetes & Metabolism, March 2009, page A87)
- « Antioxidant effects of polyphenols extract, procyanidin B2, epigallocatechin gallate, *trans* and *cis* resveratrol on RINm5F cells after oxidative stress »,  
Gordon Research Conferences, Oxidative Stress and Disease, March 2009, Barga, Italia
- « Protection des cellules  $\beta$  pancréatiques : vers une nouvelle approche thérapeutique antioxydante dans le diabète »,  
Société Française D'endocrinologie (SFE), octobre 2009 , Nice, France (Annales d'endocrinologie, page 420)
- « Effet antioxydant des extraits de polyphénols de vin rouge et de thé vert sur des cellules RINm5F après induction d'un stress oxydant »,

Société Française de Diabétologie (SFD), Mars 2010, Lille, France

- « Etude d'un modèle de rat rendu hyperinsulinique par une alimentation hypercalorique », *N Auberval, N Jeandidier, M Pinget, S Sigrist*  
Société Française de Diabétologie (SFD), Mars 2010, Lille, France
- « Antioxidative effect of green tea and red wine polyphenol extracts on RINm5F cells after oxidative stress induction »,  
European Society of Endocrinology (ESE), 24-28 avril 2010, Prague, République Tchèque
- « Effet antioxydant des extraits de polyphénols de vin rouge et de thé vert sur des cellules RINm5F après induction d'un stress oxydant »,  
5<sup>ème</sup> Congrès International Gout-Nutrition-Santé VITAGORA, 23&24 mars 2010, Dijon, France

### **Prix**

Obtention du premier prix poster au 5<sup>ème</sup> Congrès International Gout-Nutrition-Santé VITAGORA, 23&24 mars 2010, Dijon, France

## **Valorisation des compétences, « un Nouveau Chapitre de la thèse »**

Au cours de ma troisième année de thèse, j'ai eu l'opportunité de participer à un bilan de compétences, intitulé « Valorisation des compétences, un nouveau chapitre de la thèse ». Ce programme dispensé par l'Association Bernard Grégory (ABG) s'est axé autour de la définition des compétences techniques et transversales, de la rédaction d'un CV et d'un document qui a permis de synthétiser les tenants et les aboutissants de la thèse, définie comme un projet de recherche, le mien. C'est pourquoi, je tenais à ce que ce travail figure dans mon mémoire de thèse.

Une synthèse du document a été présentée devant Madame Danièle HAUG (Directrice du Service d'Information, Orientation et Emploi, représentante de l'ABG), Monsieur Bernard CHAPUS, mon mentor durant cette formation, et un directeur des ressources humaines.

Je tiens à remercier mon mentor pour tout son accompagnement et pour m'avoir donnée les outils nécessaires à l'élaboration d'un tel travail.



## *Valorisation des compétences* *« Un nouveau chapitre de la thèse »<sup>®</sup>*

Nathalie AUBERVAL

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé (ED 414) de Strasbourg

Université de Strasbourg

Mentor : M. Bernard CHAPUS



Amélioration du statut des cellules  $\beta$  du pancréas  
par des antioxydants d'origine naturelle :  
rôle du stress oxydant



Présentation orale du « NCT » : le 9 juin 2010

**Sujet de la thèse :** Protection des cellules  $\beta$  pancréatiques : vers une nouvelle approche thérapeutique antioxydante dans le diabète

**Directeur de thèse :** Dr Séverine SIGRIST

**Soutenance de thèse :** 24 septembre 2010

## I. Le diabète, les enjeux scientifiques et la recherche.

Le **diabète** est une maladie silencieuse et chronique qui peut évoluer sans que le patient ait conscience de sa pathologie. D'ailleurs, le diabète est déjà en place déjà depuis 7 ans environ lorsque le diagnostic est établi. Cette pathologie est caractérisée par une augmentation persistante du taux de glucose dans le sang. Il existe deux types de diabète :

- le diabète de type 1 ou juvénile, il touche les enfants de plus en plus tôt et est lié à une destruction des cellules produisant l'insuline (cellules  $\beta$  du pancréas) par des auto-anticorps,
- le diabète de type 2 ou diabète de la maturité concerne en revanche souvent des personnes souffrant d'obésité. Il est caractérisé par une mauvaise production de l'insuline ou la non-reconnaissance de celle-ci par ses récepteurs, c'est l'insulino-résistance. Dans ce cas, le patient produit de plus en plus d'insuline pour réguler son hyperglycémie et cela va entraîner au fur et à mesure une destruction des cellules  $\beta$  et donc une non-production d'insuline, on parle alors d'insulino-requérance ou insulino-nécessité.

En 1998, on comptait 143 millions de diabétiques dans le monde. Les prévisions pour 2025 font état de 300 millions, dont 2,4 millions pour la France. Chaque année 4000 nouveaux cas sont identifiés en France et beaucoup d'autres s'ignorent.

L'hyperglycémie qui accompagne les deux formes de diabète est quant à elle responsable des **complications cardiovasculaires**. En effet, la forte quantité de sucre dans le sang endommage les petits et les gros vaisseaux. Ces atteintes sont appelées micro-angiopathies quand elles concernent les petits vaisseaux, les organes lésés sont alors les reins, les yeux et les nerfs. Les macro-angiopathies concernent l'atteinte de plus gros vaisseaux comme l'aorte et sont responsables d'accidents cardiovasculaires et d'infarctus du myocarde.

De plus, dans cette pathologie, il a été démontré que le **stress oxydant**, c'est-à-dire la production anormale par le corps d'entités oxydantes ou la production insuffisante de défenses contre ces radicaux, aggrave le diabète en favorisant la production des radicaux, en perturbant l'insulino-sécrétion et en augmentant l'insulino-résistance.

Le diabète, le stress oxydant et les complications cardio-vasculaires sont étroitement liés, c'est pourquoi nous avons cherché au laboratoire à protéger les cellules  $\beta$  contre le stress oxydant qui aggrave la pathologie.

Dans la littérature scientifique, les **antioxydants** ont montré des **effets protecteurs** contre le stress oxydant et cela au niveau cardiovasculaire avec notamment comme chef de file le resvératrol, un des composants du vin rouge. En se basant sur ces études, nous avons choisi sur des modèles de

stress de cellules  $\beta$ , de tester l'effet d'antioxydants comme des **extraits de vin rouge et de thé vert**. En parallèle, des études conduites sur le petit animal consistaient à administrer dans l'eau de boisson des antioxydants ayant montré un effet bénéfique sur les cellules.

L'objectif de ce projet Stress Oxydant et Diabète (SODI) était de développer une **nouvelle approche thérapeutique** pour protéger les cellules  $\beta$  du stress oxydant et cela à long terme et de pouvoir compléter l'alimentation en composants antioxydants naturels pour « alléger » les atteintes provoquées par le diabète chez le patient.

## II. Le projet SODI au Centre européen d'étude du Diabète.

### a) SODI et les collaborations

Au **Centre européen d'étude du Diabète**, les diverses thématiques du laboratoire sont regroupées autour du diabète et de ses complications cardiovasculaires. Le projet SODI est un projet qui a réellement démarré en 2007 avec le commencement de ma thèse. C'est un projet original qui a sa place parmi ceux développés au CeeD et c'est le premier du Centre qui utilise des molécules d'origine naturelle. Cette thèse a été développée en collaboration avec Mme le Professeur V. Schini-Kerth du Département de Pharmacologie et Physico-chimie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg pour tout l'aspect cardiovasculaire et leurs connaissances dans le domaine du stress oxydant. Cela nous a permis d'échanger des compétences techniques dans le domaine de l'expérimentation animale et des études de molécules naturelles sur des cellules.

Grâce à cette collaboration, ma directrice de thèse et du laboratoire a initialisé un projet d'ampleur européenne appelé BIOFRUVE pour « BIO-active compounds in FRUits and VEgetables ». Il regroupait 10 équipes de 5 nationalités différentes comprenant des épidémiologistes, des biochimistes, des biologistes et des entreprises agroalimentaires :

- CeeD, spécialisé dans les études *in vitro* des propriétés antioxydantes, les voies de signalisations et les études *in vivo* sur le contrôle métabolique,
- ACTIA (Aérial & WELIENCE) pour la sélection des fruits et légumes, la formulation des composés bioactifs,
- CNRS, pour l'extraction, le fractionnement et la caractérisation des composés bioactifs,
- SNFT, un hôpital britannique pour l'étude clinique du comportement diététique des patients,
- MRI, un centre allemand de Recherche de la Nutrition et des Sciences de l'Aliment, spécialisé dans la détermination des effets anti-inflammatoires et stéatosiques chez le rat,

- UNINA, une université italienne spécialisée dans la biodisponibilité et la biotransformation des aliments,
- HACETTEPE, une université turque pour la mesure de la capacité antioxydante des produits,
- TUBITAK-ATAL, un institut turc menant des études épidémiologiques chez l'homme,
- PLANTA, une PME autrichienne pour l'isolation des constituants bioactifs,
- HLP, une société de consulting pour le management du projet.

L'objectif était d'évaluer l'effet bénéfique d'une consommation de fruits et de légumes dans la prévention du diabète et de l'inflammation, et de proposer de nouvelles formulations de nos aliments en privilégiant l'apport d'antioxydants d'origine naturelle. Le Ceed était en charge du screening cellulaire de molécules à l'aide de modèles que j'avais mis au point au laboratoire. La demande de financement de ce projet avait été déposée devant la commission européenne mais le projet n'a malheureusement pas été accepté.

Enfin, en dehors de ce projet européen et comme nous ne disposions pas de tout le matériel nécessaire à nos expériences, j'ai proposé à ma directrice d'établir une collaboration avec l'équipe du Laboratoire d'Innovation Thérapeutique dirigée par le Docteur CD Muller. Cette équipe est spécialisée dans le domaine de la cytométrie en flux. Mon projet a requis cette technique, c'est pourquoi nous avons eu besoin de leurs compétences et de leur savoir-faire qui sont un outil précieux à la réalisation de mon projet en particulier.

### b) Pourquoi j'ai choisi le Ceed et SODI ?

Mon entrée dans la recherche scientifique s'est faite grâce à un coup de foudre pour une section de Sciences et Techniques de Laboratoire (STL) à la fin du collège. Dès que j'ai vu des micro-organismes évoluer sous le microscope, j'ai su que je voulais être chercheur. Dès lors, j'ai entamé un parcours long et parfois difficile au travers d'études techniques (DUT) après le baccalauréat, puis plus général et approfondi grâce au Magistère de Microbiologie et Enzymologie et au cursus Licence, Maîtrise et DEA que j'ai fait à la faculté des Sciences de Vandœuvre-lès-Nancy.

La préparation du doctorat a été pour moi une façon de pousser encore plus loin la recherche et l'apprentissage des connaissances dans un domaine particulier (ici le diabète). Mon choix de cette entreprise et de ce sujet s'est fait notamment grâce à mes expériences lors de divers stages dont la plupart avaient été fait dans le domaine du stress oxydant. Tout d'abord, j'ai travaillé sur les systèmes de régénération des protéines contre le stress oxydant chez une bactérie puis sur des

cellules vasculaires en les protégeant par des molécules antioxydantes et enfin sur des cellules du pancréas au Ceed.

### III. SODI, la gestion et les coûts.

#### c) Préparation et cadrage du projet

Pour ce projet, les facteurs de succès étaient réunis grâce aux différents éléments trouvés dans la littérature scientifique et du fait des données recueillies au laboratoire avant mon arrivée. Il ne semblait pas présenter de risque à la fois sur le plan scientifique et financier.

Comme évoqué précédemment, le projet SODI a été élaboré avec Mme le Professeur V. Schini-Kerth du Département de Pharmacologie et Physico-chimie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg. Sa connaissance dans le domaine cardiovasculaire, celui des polyphénols de vin rouge et son esprit critique en tant que non spécialiste du diabète, a permis d'harmoniser au mieux les liens entre diabète et maladies cardiovasculaires. La thèse a été financée sur les fonds propres du Ceed, cependant afin d'alléger les coûts au laboratoire, nous avons déposé un dossier de bourse ANR (Agence Nationale de Recherche), qui malheureusement n'a pas été retenu.

Pour ce projet, ainsi que tous ceux menés au Ceed, une chartre de confidentialité des résultats a été signée par toutes les personnes internes au laboratoire ainsi que les stagiaires, afin d'éviter toute fuite de connaissances.

#### d) Conduite du projet

Dès mon arrivée, j'ai été prise en charge par un post-doctorant et j'ai dû faire un travail important de bibliographie scientifique afin de présenter mon projet de thèse incluant le matériel et les méthodes envisagés, devant tout le personnel du laboratoire. Cependant, il n'y avait pas de réunion de projet régulière en dehors des réunions de laboratoire, il s'agissait plus de courtes synthèses après chaque expérience.

Cette technique d'encadrement fut malheureusement désastreuse, nous reproduisons des expérimentations validées dans la littérature scientifique ce qui m'a fait perdre près de six mois de ma thèse. Dès lors, la directrice du laboratoire a repris le projet en main pour que nous puissions avoir une chance de le mener à bien et les choses se sont améliorées. Nous avons alors fait des bilans réguliers (environ une fois par mois) et le travail fut bien mieux encadré. Au vu des circonstances, nous avons été obligées de focaliser l'étude sur les cellules  $\beta$  uniquement au lieu des cellules  $\beta$  et des îlots de Langerhans. En parallèle, nous avons débuté la mise au point du modèle de diabète de type 2 chez le rat.



Enfin avec ma co-directrice de thèse des entretiens réguliers ont été effectués (plusieurs fois par an) en dehors des petites réunions de synthèses.

#### e) Estimations des coûts du projet SODI et source de financement

Le coût total détaillé de mes trois années de thèse figure en annexe 1. Elle présente d'une part le coût attribué aux ressources humaines avec la participation de ma directrice de thèse à 10% et de moi-même à 100% de mon temps, sur une période de 3 ans. A cela, s'ajoute, l'investissement d'un post-doctorant à 50% sur un an, d'une technicienne à 5% et d'un animalier à 20% pendant 2 ans. L'aide apportée par les différents stagiaires au cours de ma thèse, a également été prise en compte dans le coût total des ressources humaines qui s'élève à **155810 euros**.

Les frais de fonctionnement du laboratoire incluant les frais de consommables de bureau, d'expérimentations scientifiques (cônes de pipettes, tubes, anticorps...) et kits de dosage (marqueurs du stress oxydant, C-peptide, insuline...) ainsi que l'amortissement du matériel constitue une grosse partie du coût de la thèse. Il est estimé dans mon cas, à environ **51038 euros** pour les trois ans.

Au cours de ma thèse, j'ai eu la chance de participer à de nombreux congrès scientifiques nationaux et internationaux, en France et à l'étranger, qui m'ont permis entre autres choses d'améliorer mon anglais ! A cela s'ajoute les frais de formations (Equipier de Première Intervention, Expérimentation Animale...). Au total, les déplacements et formations représentent environ **9365 euros**.

Enfin, les frais liés aux diverses dépenses de l'infrastructure et au coût de la documentation s'élèvent à environ **21954 euros**.

Au total, le coût de ma thèse pendant ces trois années revient à **238167 euros** (cf. tableau ci-dessous).

Nature de la dépense	Montant (euros)
Ressources humaines	155810,13
Consommables	47388,85
Infrastructure	21651,47
Matériels (amortissements)	3648,84
Déplacements	4683,16
Formations	4681,71
Documentations	302,00
<b>TOTAL</b>	<b>238166,16</b>

Les sources de financements de ma thèse proviennent exclusivement des fonds propres du Centre européen d'étude du Diabète (laboratoire) qui est une structure à but non lucratif. En

revanche, le CeeD est 100% actionnaire d'une SAS (Société par Action Simplifiée), prestataire de service et d'assistance pour le diabète (structure à but lucratif) dont les bénéfices sont intégralement reversés à la recherche.

#### IV. La thèse : quelles compétences, savoir-faire et qualités a-t-on développé ou acquis ?

##### f) Dans le domaine d'expertise scientifique et technique

L'analyse des résultats obtenus lors de la thèse est travail très intéressant car il m'a permis de **prendre du recul** sur le projet lui-même et d'avoir un **avis plus critique** sur les résultats et perspectives. Par exemple, l'obtention de plusieurs résultats d'expérimentations qui ne me semblaient pas pertinents voire mauvais se sont avérés être cohérents au vu de la littérature scientifique. Ainsi le fait d'avoir un œil et un esprit plus critique permet de mieux apprécier et juger des résultats.

J'ai également développé quelques **compétences dans l'utilisation des tests statistiques** avec notamment le logiciel SigmaStat et j'ai ainsi pu adapter des tests statistiques au nombre et aux types d'échantillons.

Enfin je voudrais souligner le domaine de l'expertise médicale que je n'ai que côtoyé car je ne suis pas de formation médicale. En effet, la présence de médecins a permis de recentrer l'étude dans des directions plus pertinentes que nous, en tant que scientifiques, ne pensions pas étudier. Par exemple, au CeeD j'ai eu la chance de côtoyer le service d'Endocrinologie et de Diabétologie du Professeur M. Pinget et plus particulièrement Mme le Professeur N. Jeandidier. Son expertise et sa connaissance des modèles de diabète ont permis de nous orienter vers un modèle d'étude de diabète de type 2 chez le petit animal plus facile à mettre en place et tout aussi intéressant que le modèle de diabète de type 1 que nous voulions étudier en premier lieu. Le problème du modèle de type 1 d'intérêt est qu'il manque de reproductibilité et qu'il n'est pas un véritable modèle d'insulino-dépendance. De plus lors de l'étude *in vivo*, elle m'a indiqué qu'il était préférable de présenter des résultats d'une manière plutôt qu'une autre (rapport Glycémie/C-peptide).

##### g) Connaissances acquises

De par mon expérience acquise lors de mes différents stages, j'ai su développer une large connaissance dans le domaine du **stress oxydant**, à la fois sur les bactéries, sur des cellules musculaires et endothéliales et maintenant sur des cellules à insuline de rat. Cependant, le stress oxydant dans le diabète ne se limite pas à cela, il s'accompagne d'atteintes cardiovasculaires et j'ai

ainsi pu me familiariser à **l'étude de la réactivité des vaisseaux en cuve à organes isolés** grâce à au Docteur S. Dal-Ros.

D'une part, j'ai pu également travailler sur le petit animal, en l'occurrence le rat, pour l'étude du modèle de diabète de type 2. De par les travaux pratiques de pharmacologie et de toxicologie que j'ai effectué pendant mon DUT, j'ai pu mettre à profit mes connaissances par exemple pour la préhension des animaux, la pose de cathéters intraveineux et intrajugulaire, que j'appréciais particulièrement. De plus, j'ai pu aider ma collègue à la contention des rats lorsqu'elle faisait des injections. J'ai acquis aussi une grande connaissance dans **l'anatomie viscérale des rats** ainsi que dans le prélèvement des différents organes d'intérêt. De plus, grâce à la **formation Expérimentation Animale** proposée par l'école doctorale (ED 414, Sciences de la Vie), j'ai pu apprendre les notions d'éthique importantes concernant l'élevage et l'utilisation d'animaux d'expérimentation. J'ai pu également apprendre la signification de certains **comportements** chez les rongeurs, et cela m'a permis personnellement de me responsabiliser quand à la surveillance et au bien-être des animaux.

D'autre part, j'ai développé des connaissances approfondies dans le domaine de **l'histologie**, que je ne connaissais que peu auparavant. J'ai été formée à fixation des échantillons (paraformaldéhyde et paraffine), la coupe des organes fixés ou congelés par microtome ou cryostat, les colorations de base comme la coloration éosine-hématoxyline et l'observation des coupes sur de nombreux tissus, comme le foie ou le pancréas. J'ai également appris à faire de l'immuno-marquage sur des coupes histologiques notamment celles de pancréas pour lesquelles nous avons marqué spécifiquement les cellules produisant l'insuline.

Pour les études histologiques, j'ai eu recours à **l'utilisation de l'azote liquide**. Lors de mon arrivée, je me suis occupée des commandes et de la maintenance des niveaux en azote. J'ai également été formée à la manipulation de ce liquide qui sans précautions peut être très dangereux et entraîner des lésions irréversibles. Au fur et à mesure de la manipulation de ce produit, j'ai ainsi pu fortement diminuer mon aversion vis-à-vis de l'azote liquide.

J'ai également développé et approfondi des compétences dans le domaine de la **biologie moléculaire** au travers de l'amplification d'ADN par PCR quantitative en temps réelle (suivi en direct de l'amplification des brins d'ADN) mais aussi au travers de techniques comme la PCR arrays qui permet de faire un screening de 84 gènes pour une condition expérimentale testée.

De plus, j'ai été amenée à travailler dans le **domaine de la chimie** avec notamment M. le Professeur A Fougerousse, de la faculté de chimie de Strasbourg. Grâce à son aide, j'ai pu mettre en place un dosage permettant de mesurer l'état réduit ou oxydé d'échantillons sanguins de patients par la mesure du pH et d'une constante  $rH^2$ .

Enfin, j'ai pu acquérir des connaissances dans un domaine que je ne connaissais pas : la **cytométrie en flux** (CMF) ou cytométrie capillaire. Grâce à l'équipe du Docteur CD Muller et plus particulièrement au Docteur J Peluso et à Mlle C Gruber, j'ai appris à connaître la technique de CMF, aussi bien sur les conditions de passage des échantillons, les précautions à prendre vis-à-vis de la maintenance de ces appareils fort onéreux, mais aussi d'un point de vue méthodologique où de nombreux contrôles sont requis avant de procéder au test d'intérêt.

#### h) Connaissances acquises dans la méthodologie et la conduite de projet

La conduite d'un projet nécessite une certaine expérience. Tout au long de la thèse, j'ai du présenter mon travail à la fois devant un public scientifique, notamment lors de congrès nationaux ou internationaux, mais aussi lors de rencontres avec les bénévoles de l'association ou devant des lycéens.

Pour moi, le défi le plus important pour un jeune chercheur est la **vulgarisation scientifique**. Une certaine rigueur et méthodologie sont requises pour pouvoir expliquer de manière simple mais pour autant précise ce qu'est le diabète et le stress oxydant, dans le cas qui me concerne. Souvent l'utilisation de schémas ou de photos permet d'illustrer plus facilement les méthodes employées pour arriver à nos résultats. La formation professionnelle, Les Doctoriales, proposée par l'Ecole doctorale est également un très bon exercice dans l'apprentissage et l'élaboration d'une méthodologie.

De plus, pour moi, la présentation du projet de thèse devant des scientifiques doit suivre rigoureusement une méthodologie. En effet, à chaque congrès, j'ai du envoyer des résumés des travaux selon un plan comprenant une introduction du sujet dans son contexte ainsi que le but de l'étude, une partie courte, concise et précise sur le matériel et les méthodes utilisés, puis une partie comprenant les résultats qui est ensuite discutée dans la conclusion. Chaque méthode utilisée pour obtenir des résultats découlait d'une réflexion scientifique et logique, ce qui m'a permis d'obtenir le premier prix Poster au Congrès Vitagora Goût Nutrition Santé, qui s'est tenu à Dijon le 23 et 24 mars 2010.

Le projet de thèse lui-même est basé sur une **méthodologie précise** qui découle de la réflexion et de la logique. Par exemple, toutes les expérimentations ont commencé par des modèles d'étude *in vitro*, cela afin de pouvoir faire un screening de molécules avant de les passer sur un modèle animal, plus coûteux. De plus, chaque produit utilisé lors des essais *in vitro* a fait l'objet d'une validation, avant de passer aux tests suivants. Enfin, seuls les antioxydants ayant un réel potentiel ont été choisis pour être administrés aux animaux.

### i) Méthode de travail et gestion du temps

Lors de ma thèse j'ai été amené à travailler en grande partie seule, je n'ai pas eu de problèmes pour la gestion de mon temps ou de mes tâches. Majoritairement les expérimentations étaient **planifiées** d'avance avec des temps de latence prévus en cas de reproduction d'une ou de plusieurs manipulations. Je m'arrangeais pour commencer les expériences le plus tôt possible dans la journée afin de pouvoir les interpréter de suite.

Concernant les méthodes de travail avec les collaborateurs (cytométrie), chacune de mes visites à la faculté de Pharmacie était prévue d'avance afin de ne pas perturber les activités de recherche des membres de cette équipe.

### j) Savoir-faire administratifs – organisationnels

Pour ma part, le savoir-faire organisationnel s'est développé avec le temps. J'ai notamment **organisé des réunions** de collaboration avec l'équipe de cytométrie capillaire. Concernant le domaine administratif, je suis capable de remplir des **bons de commande**, de demander des **offres de prix** de kits de dosage ou de produits auprès des fournisseurs (tels que Tebu-bio ou Millipore). J'ai également fait appel plusieurs fois au **service technique** de chez Bio-Rad pour des soucis de calibrage d'appareil PCR mais aussi pour des renseignements concernant des filtres de spectrophotomètre. Enfin j'ai également eu recours au service technique de Millipore afin de résoudre un problème lié à l'utilisation d'un kit de dosage des protéines carbonylées.

### k) Qualités personnelles

Dans le domaine de la recherche, il est parfois nécessaire d'avoir recours à son imagination et de faire un peu de bricolage pour résoudre certains problèmes. Cela pour moi, fait appel à la **créativité** et à l'**inventivité**. Il m'est arrivée plusieurs fois, d'être confrontée à ce genre de situation. Lorsque j'ai effectué l'amplification de gènes par la technique de PCR arrays, le protocole stipulait une étape de centrifugation des plaques. Cependant au laboratoire, nous ne disposions pas de support spécifique à ces plaques dans la centrifugeuse. J'ai alors trouvé un moyen de les fixer (avec du scotch) sur un support non prévu à cet effet.

De plus, je suis extrêmement **rigoureuse**, que ce soit dans les expérimentations mais aussi dans la tenue des pièces du laboratoire dont je suis responsable, et j'aime particulièrement retrouver le matériel commun là où il doit être ainsi que les stocks remplis. De même qu'il est important pour moi de laisser une pièce ou un matériel propre après utilisation, mais cela reflète plus du bon sens et du respect pour le travail des autres que de la rigueur.

Cette **rigueur** se retrouve également dans mon travail ou ma tenue du cahier de laboratoire. Lors du bilan de thèse de deuxième année organisé à la demande de l'école doctorale, j'ai su faire la **synthèse** de tous les résultats obtenus depuis environ 18 mois. Cela a été un gros travail, qui m'a permis de prendre du recul sur la manière de conduire ma thèse et de recadrer, le cas échéant, les expériences ou de proposer de nouvelles stratégies d'investigation. Le résultat de ce comité fut largement positif et a été validé auprès de l'école doctorale.

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité **d'encadrer** plusieurs étudiants de formations diverses. La première fois, j'ai eu deux étudiants en même temps et en plus de « découvrir » l'encadrement, j'ai du faire face à la gestion de ces deux personnes aussi bien d'un point de vue expérimental (deux sujets différents avec des manipulations différentes) qu'humain, avec des personnalités bien distinctes. Lors de cette expérience, j'ai pu comprendre ce qu'était l'encadrement au travers de la **gestion du travail** de l'étudiant mais aussi du mien, car j'avais mes propres expérimentations à mener en parallèle. Cela demandé un grand effort d'**organisation** au niveau expérimental et temporel. Cette riche expérience m'a permis cette année de reprendre une stagiaire qui va permettre de boucler en temps voulu ma thèse.

Enfin, j'ai particulièrement su **m'adapter** au cadre dans lequel j'ai évolué. En effet, j'ai eu l'occasion et cela pendant plusieurs mois, de faire des expérimentations à la Faculté de Pharmacie avec le Docteur S. Dal-Ros, lors des études *in vivo* du modèle de diabète de type 1. Toujours dans le même lieu mais avec une équipe différente, j'ai su **m'intégrer** à l'équipe de cytométrie capillaire pour mener à bien mes expérimentations dans ce domaine. Cela a impliqué, une certaine adaptabilité aux conditions et aux méthodes de travail parfois différentes de mon laboratoire, notamment en ce qui concerne la culture des cellules. J'ai du emmener mon matériel et m'adapter à ce nouvel environnement de travail.

Toutes ces expériences m'ont permis d'établir des liens avec des chercheurs ou techniciens de laboratoire différents ou d'entreprises de biotechnologie.

## V. La thèse : quels résultats et impacts pour la recherche ?

Ce sujet était au départ un sujet nouveau qui devient de plus en plus intéressant au vu des résultats et d'autant plus que le laboratoire a recruté une post-doctorante pour continuer la suite de mes travaux après mon départ.

Pour moi, ces travaux auront un impact pour la société et plus particulièrement pour les patients atteints de diabète. La finalité de mes résultats était de démontrer la faisabilité d'une supplémentation en molécules antioxydantes d'origine naturelle dans la prévention du diabète et donc dans la prévention des cellules produisant l'insuline. A long terme, une telle supplémentation

pourrait diminuer la part de stress oxydant présente dans cette pathologie et ainsi soulager le diabète.

Enfin pour moi-même, ce fut une riche expérience, bien qu'elle ne soit pas encore finie. Cela m'a permis de découvrir un nouvel environnement de travail, de nouveaux collègues et surtout d'apprendre de nouvelles techniques. Les résultats obtenus au cours de la thèse sont très prometteurs mais comme il s'agit d'un sujet nouveau, plein d'expériences complémentaires restent à faire.

## VI. Après la thèse : les pistes professionnelles

Savoir ce que l'on peut faire après la thèse représente un véritable challenge. Il s'agit de bien identifier les compétences que l'on a acquises et développées au cours de ces trois années. Cette formation a permis de me donner les moyens et les stratégies pour savoir se définir comme chercheur mais aussi savoir employer les mots justes devant des recruteurs ou des employeurs.

### **Piste n° 1 : Chargée de recherche pour un CHU**

Au cours de mes diverses enquêtes professionnelles (entretiens avec de futurs recruteurs potentiels), j'ai été mise en relation avec mon ancien maître de stage de DUT, qui m'a parlé d'un projet qui se menait sur les lymphocytes à l'unité de thérapie cellulaire du CHU de Nancy-Brabois. Suite à cela j'ai contacté le responsable du projet pour mieux connaître les tenants et les aboutissants de celui-ci. La situation est pour le moment en attente.

### **Piste n° 2 : Post doctorat au CNRS**

Également sur un avenir à court terme, j'ai la possibilité de faire un post-doctorat de 3 ans au CNRS de Cronenbourg (Strasbourg) sur le développement d'une insuline par voie orale. Le projet requiert un docteur ayant les compétences que j'ai acquises au cours de ma thèse, comme l'expérimentation animale, de bonnes connaissances en chimie dispensées par ma formation, mais aussi des capacités d'encadrement. Le challenge pour moi serait de manager une équipe composée de technicien, ingénieur et étudiant en thèse et de faire le lien entre les différentes tâches qui incombent à ces fonctions. La demande de financement de ce projet est en cours d'évaluation et les résultats devront être connus ce mois-ci (juin 2010).

### **Piste n° 3 : Enseignant-chercheur**

D'autre part, sur un plus long terme, je souhaiterais pouvoir faire des interventions dans des facultés ou pouvoir faire de l'enseignement dans les lycées ayant des formations techniques Sciences et Techniques de Laboratoire, spécialisées en biologie – génie biologique. Ainsi pour

pouvoir toujours faire de la recherche, un poste de Maître de Conférences à l'université serait un bon compromis.

Une des possibilités qui s'offre à moi est de passer les concours CNRS et INSERM, ce qui me permettrait également de faire de l'enseignement. La prochaine session pour déposer les candidatures est prévue en Janvier 2011.

#### **Piste n° 4 : Start Up**

Enfin, et l'idéal pour moi, serait de pouvoir démarrer dans une petite start-up ayant pour but la recherche appliquée, où le défi serait de monter des projets, des demandes de financements, pouvoir gérer une équipe et s'investir. Je me suis renseignée sur des structures qui pourraient requérir mes compétences. Je suis également en contact avec un « ancien du NCT » qui travaille dans la société Hartmann et qui pourra certainement m'aiguiller de manière un peu plus précise dans cette voie.