



Activité physique et produits dérivés du soja : intérêts dans la prise en charge du stress oxydant associé au diabète de type 1

Ludivine Malardé

► **To cite this version:**

Ludivine Malardé. Activité physique et produits dérivés du soja : intérêts dans la prise en charge du stress oxydant associé au diabète de type 1. Education. Université Rennes 2, 2012. Français. <NNT : 2012REN20055>. <tel-00775870>

HAL Id: tel-00775870

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00775870>

Submitted on 14 Jan 2013

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

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



THESE / UNIVERSITE RENNES 2
sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

Pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE RENNES 2

Mention : STAPS
Ecole doctorale Sciences Humaines et Sociales

présentée par
Ludivine Malardé

Préparée au laboratoire Mouvement, Sport, Santé M2S
(EA 1274)
Université Rennes 2

Activité physique et produits dérivés du soja : intérêts dans la prise en charge du stress oxydant associé au diabète de type 1

Thèse soutenue le 17 décembre 2012
devant le jury composé de :

François GUERRERO
Professeur - Laboratoire ORPHY, Brest / *rapporteur*

Vincent PIALOUX
Maître de conférences/HDR - CRIS, Lyon / *rapporteur*

Sophie BLAT
Chargée de Recherche INRA – UMR SENAH, St-Gilles / *examinatrice*

Christine MOISAN
Professeur - Laboratoire ORPHY, Brest / *examinatrice*

Carole GROUSSARD
Maître de conférences, Co-directrice de thèse

Arlette GRATAS-DELAMARCHE
Professeur, Directrice de thèse

*Le principal obstacle à la découverte [...] n'est pas l'ignorance,
mais l'illusion de savoir.*

Daniel J. Boorstin

Cadre du projet de recherche	9
Revue de la littérature	13
Chapitre 1: Le Diabète de type 1	14
1 La glycémie, un paramètre finement régulé.....	14
1.1 Principe général.....	14
1.2 L'indispensable insuline.....	14
1.3 Rôle du glucagon.....	17
2 Quand l'insuline vient à manquer : le diabète de type 1.....	17
2.1 Définition	17
2.2 Les causes du diabète type 1 : une théorie émergente.....	18
2.3 Physiopathologie.....	24
2.4 Signes cliniques et diagnostic	25
3 Le diabète de type 1 : des conséquences multiples, des complications lourdes.....	28
3.1 Des perturbations multiples du métabolisme glucidique	28
3.2 A long terme, des complications ubiquitaires	31
4 La prise en charge du diabétique de type 1 : une prise en charge globale	33
4.1 Un seul traitement salvateur : l'insulinothérapie	34
4.2 L'activité physique : essentielle et pourtant difficile à mettre en place.....	35
4.3 L'alimentation : la "thérapie nutritionnelle médicale"	42
Chapitre 2 : Le Stress Oxydant: cause ou conséquence du diabète?.....	44
1 Le Stress Oxydant : un concept en perpétuelle évolution	44
2 Rôle du SO dans la survenue du diabète	49
2.1 Chez l'animal.....	49
2.2 Chez l'Homme	53
3 Le SO, conséquence du diabète :.....	54
3.1 Mise en évidence.....	54
3.2 Mécanismes impliqués : comment le diabète augmente t-il le SO ?.....	60
4 Implication du SO dans les complications diabétiques	69
4.1 Les modifications de la balance pro/antioxydante sont associées à la survenue de complications chez le DT1 : mise en évidence dans la littérature.....	69
4.2 Rôle du SO dans les complications vasculaires (comment le SO stimule/induit les mécanismes à l'origine des dysfonctions vasculaires chez le DT1 ?)	70
Chapitre 3 : Les moyens de protection contre le SO chez le DT1	78
1 L'insulinothérapie.....	78
2 L'activité physique.....	79
2.1 Rappel des effets de l'activité physique (exercice aigu et entraînement) chez le sujet sain	79
2.2 Chez le sujet diabétique.....	80
3 Alimentation/supplémentation.....	84
3.1 La supplémentation en antioxydants chez le sujet sain : un paradoxe	84
3.2 La supplémentation en antioxydants chez le sujet diabétique : beaucoup d'espoirs, des résultats pas toujours concluants.....	84
3.3 Améliorer la prise en charge du diabète en consommant des produits d'origine naturelle : la promesse du soja.....	86
3.4 Retrouver les bienfaits du soja dans un complément alimentaire : le PFS (Produit Fermenté de Soja)	98
4 Prise en charge globale.....	102
Synthèse et objectifs	104

Contributions personnelles : Travaux expérimentaux	108
Publications et communications	109
1 Publications relatives au travail de thèse.....	109
2 Communications orales.....	110
3 Communications affichées	110
Etude 1 : Un Produit Fermenté de Soja (PFS) réduit l'inflammation et le stress oxydant chez des rats rendus diabétiques par streptozotocine	111
Etude 2 : Un Produit Fermenté de Soja (PFS) améliore la concentration de glucose dans le muscle squelettique, sans restaurer le contenu en glycogène, chez des rats rendus diabétiques par streptozotocine.....	133
Etude 3 : L'entraînement en endurance et l'insulinothérapie doivent être associés pour exercer pleinement leurs effets bénéfiques sur le stress oxydant et la régulation glycémique chez des rats diabétiques	145
Etude 4 : Voies de production aortique de l'anion superoxyde chez le rat diabétique : bénéfices de l'insulinothérapie et de l'entraînement.....	163
Etude 5 : Evaluation de la glycation de la CuZn-SOD chez le rat diabétique : mise au point d'une technique par chromatographie d'affinité et western blot.....	179
Travail complémentaire : mise au point d'une technique d'analyse d'images (étude de la production aortique d'anion superoxyde par marquage fluorescent à la DHE).....	193
Contributions personnelles : Discussion générale et perspectives	198
1. Intérêt d'un produit dérivé du soja dans la prise en charge du diabète	199
2. L'activité physique, complément thérapeutique majeur de l'insulinothérapie	201
3. Le rôle prépondérant de l'anion superoxyde dans les complications diabétiques : de l'importance d'inhiber ses voies de production et d'améliorer sa neutralisation par la SOD.....	203
4. L'induction expérimentale du diabète et ses conséquences : considérations méthodologiques..	205
Conclusion	208
Références Bibliographiques	211
Annexes	234

Liste des abréviations

3-DG	3-deoxyglucosone	IRS	Insulin Receptor Substrate
ADA	American Diabetes Association	MGO	Méthylglyoxal
Akt (PKB)	Protéine kinase B	NOS	NO-Synthase
AOPP	Advanced Oxidation Protein Products	NOX	NADPH-Oxydase
ATP	Adénosine Tri-Phosphate	NOD	Non Obese Diabetic
BB	Bio Breeding	OMS	Organisation Mondiale de la Santé
CAT	Catalase	PARP	Poly(ADP-ribose)-polymerase
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial	PFS	Produit Fermenté de Soja
FDA	Food and Drug Administration	PTG <i>ou</i> AGE	Produits Terminaux de Glycation Advanced Glycation End-products
FID <i>ou</i> IDF	Fédération Internationale du Diabète International Diabetes Federation	RL	Radicaux Libres
G6P	Glucose-6-Phosphate	RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
GPX	Glutathion Peroxydase	SO	Stress Oxydant
GS	Glycogène Synthase	SOD	Superoxyde Dismutase
GLUT	Glucose Transporteur	STZ	Streptozotocine
IP3K	Phosphatidyl-inositol 3-kinase	XO	Xanthine Oxydase
IR	Insulin Receptor (Récepteur à l'insuline)		

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Schéma de la molécule d'insuline	14
Figure 2 : Voie de signalisation de l'insuline, après fixation sur son récepteur, pour augmenter le captage de glucose	15
Figure 3 : Effets pléïotropes de l'insuline (Capeau, 2003)	16
Figure 4 : Schéma de la molécule de glucagon	17
Figure 5 : Classification des sujets selon leur glycémie à jeun	18
Figure 6 : Facteurs impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire intestinale (Vaarala, 2000) .	19
Figure 7 : Les trois niveaux d'altérations de l'intestin impliqués dans le DT1 (Vaarala, 2008)	21
Figure 8 : Evolution chronologique du diabète de type 1 selon la sécrétion en insuline	24
Figure 9 : Rappels des effets pléïotropes de l'insuline (Capeau, 2003)	24
Figure 10: Conséquences systémiques et cellulaires de l'insulinopénie dans le diabète de type 1.....	25
Figure 11 : Mécanismes de déshydratation intracellulaire induite par l'hyperglycémie(Lefèvre, 1999)	26
Figure 12 : Mécanismes à l'origine de l'acido-cétose.....	26
Figure 13 : Les principales complications macro et microangiopathiques à long terme du diabète (d'après L'Atlas du Diabète de la FID, 2011)	31
Figure 14 : Influence du contrôle glycémique pré-exercice sur l'évolution de la glycémie pendant un exercice sous-maximal (d'après Vergano, 2010).....	38
Figure 15 : Formation en cascade des différentes espèces oxygénées réactives à partir du radical superoxyde (Koechlin-Ramonatxo, 2006)	46
Figure 16 : Principales voies de signalisation activées et/ou modifiées par les ERO/ERN dans le muscle squelettique (Barbieri and Sestili, 2012).....	47
Figure 17 : Mécanismes d'action de la streptozotocine (adaptée de Szkudelski, 2001)	50
Figure 18 : Mécanismes à l'origine du SO induit par l'hyperglycémie (Bonfont-Rousselot, 2000).....	60
Figure 19 : Réactions à l'origine de la production d'ERO par autoxydation du glucose (d'après Ahmed, 2005).....	61
Figure 20 : Mécanismes de formation des AGE (Aronson, 2008)	62
Figure 21 : Formation des AGE et Stress Carbonylé (Singh et al., 2001)	63
Figure 22 : Génération d'ERO lors des différentes de la réaction de glycation.....	64
Figure 23 : Mécanismes d'induction du SO par la voie des polyols (Chung et al., 2003) .	66
Figure 24 : Voies de production des ERO/ERN impliquées dans les complications vasculaires induites par le diabète de type 1 (Cai and Harrison, 2000).....	66
Figure 25 : Le complexe NOX (Shen, 2010)	67
Figure 26 : Découplage de la NOS à l'origine de la production de peroxy-nitrites(Rasmusen et al., 2005) 68	

Liste des figures et tableaux

Figure 27 : Liaison AGE-RAGE et activation du NF-kB, conduisant à un SO, une vasoconstriction et un état procoagulant (Singh, 2001).....	71
Figure 28 : Mécanismes et conséquences de l'activation de la voie des PKC par l'hyperglycémie (adaptée de Brownlee, 2005).....	73
Figure 29 : Mécanismes de l'inflammation et son amplification dans la cellule (Dandona et al., 2007)	75
Figure 30 : Effets du diabète (induit par streptozotocine, après 12 semaines) puis du traitement à l'insuline (les 4 dernières semaines du protocole) sur le système antioxydant dans différents tissus.	79
Figure 31 : Effets de l'exercice sur le SO chez les sujets sains et diabétiques (Villa-Caballero et al., 2000)	83
Figure 32 : Représentation des trois principales formes glycosides et aglycones des isoflavones - schéma de la génistéine (Turner et al., 2003)	87
Figure 33 : Le concept de prébiotique (Tuohy et al., 2005).....	95
Figure 34 : Représentation schématique de l'importance du métabolisme du microbiote intestinal sur l'activité pharmacologique des isoflavones (Turner et al., 2003).....	97
Figure 35 : Effets du PFS sur la production d'anion superoxyde et l'activité de la myéloperoxydase (Efstathiou, 2010)	100
Figure 36 : Effets démontrés des composés de la graine de soja et du PFS.....	100
Figure 37 : Répartition des animaux dans les différents groupes.....	181
Figure 38 : Déroulement du protocole.....	181
Figure 39 : Liaison de l'acide boronique (aminophénylboronate) fixé sur la colonne au groupement cis-diol d'une protéine glyquée, par formation d'un complexe aromatique	182
<hr/>	
Tableau 1 : Arguments en faveur du rôle du système immunitaire intestinal dans le développement du DT1 chez l'Homme et l'animal (Vaarala, 2002).....	20
Tableau 2 : Facteurs de risques d'hypoglycémie chez le DT1 (Ardigo and Philippe, 2008).....	29
Tableau 3 : Profils pharmacocinétiques des différentes insulines	34
Tableau 4 : Règles à respecter pour la pratique d'une activité physique par un sujet traité à l'insuline (De Feo et al., 2006)	36
Tableau 5 : Principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote avec leurs caractéristiques (d'après Devasagayam et al., 2004).....	45
Tableau 6 : Les modèles animaux de diabète de type 1 spontané (Rees, 2005)	49
Tableau 7 : Marqueurs des dommages oxydatifs dans le DT1	56
Tableau 8 : Evolution des systèmes antioxydants dans le DT1.....	57
Tableau 9 : Evolution de différents éléments du système antioxydant selon le tissu analysé (d'après Wohaieb and Godin, 1987).....	58

Liste des figures et tableaux

CADRE DU PROJET DE RECHERCHE

Introduction

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plus de 200 millions de personnes sont aujourd'hui touchées par des troubles du métabolisme glucidique regroupés sous le terme de "diabète". Cette pathologie est devenue un véritable problème de santé publique, considérée comme une pandémie par l'OMS. Le nombre de personnes atteintes à travers le monde¹ était estimé à 171 millions en 2000, à 265 millions en 2010, et pourrait atteindre 366 à 440 millions d'ici 2030 (Wild et al., 2004). En France, les personnes souffrant de diabète sont environ 3 millions de personnes, soit 4,4% de la population. Ce chiffre a quasiment doublé en à peine 10 ans, puisque les personnes diabétiques ne représentaient que 2,3% de la population en 2001 (Ricci et al., 2010).

Ces chiffres regroupent en réalité différentes formes de diabète, les deux principales étant le diabète de type 1 et le diabète de type 2. Le premier se déclare essentiellement chez l'enfant et le jeune adulte, et la survie nécessite une insulinothérapie quotidienne. Le second survient plutôt chez l'adulte, et est associé à l'âge, au surpoids, et à l'inactivité. Ces deux derniers facteurs survenant de plus en plus tôt, on observe également une augmentation du nombre de diabétiques de type 2 dès l'adolescence et chez l'adulte jeune.

Dans cette période de sédentarisation, d'augmentation de l'obésité, et de vieillissement de la population, les problèmes liés au diabète de type 2 accaparent les services sanitaires et les politiques de santé publique, faisant parfois oublier le diabète de type 1. Or, si ce dernier ne représente que 5 à 10% des cas de diabète, il constitue un désordre métabolique sévère, commençant bien plus précocement dans la vie, ayant surtout des conséquences et des complications à long terme bien plus graves. La prévalence du diabète de type 1 est estimée par l'OMS à 10 millions de personnes à travers le monde, dont plus de 200 000 personnes en France (0,38% de la population). Son incidence connaît également une augmentation constante, de l'ordre de 3% en 2011 (FID, 2011). Par ailleurs, son poids économique est également conséquent, puisque le montant annuel moyen versé par l'Assurance Maladie à une personne diabétique de type 1 représente quasiment le double de la somme versée à une personne diabétique de type 2². De plus, la moitié de cette somme est versée à une minorité de patients (10%), les plus touchés par les complications diabétiques. Une prise en charge ciblée de ces patients sujets à complications pourrait donc soulager à la fois les personnes les plus atteintes et le budget de l'Etat. Si la production synthétique d'insuline et le développement à grande échelle de l'insulinothérapie ont permis le maintien en vie des personnes diabétiques insulino-dépendantes, il n'en reste pas moins que leur espérance et surtout leur qualité de vie sont grandement altérées, notamment en raison de graves complications liées à l'hyperglycémie (amputations, cécité, ou encore insuffisance rénale). C'est pourquoi, les scientifiques et les médecins recommandent, en plus du traitement insulinique classique, une prise en charge globale intégrant notamment un "régime" alimentaire et/ou la pratique d'une activité physique. Ces prises en

¹ Ces chiffres ne prennent en compte que les personnes dont le diabète a été diagnostiqué. Or, on estime que 50% des diabétiques s'ignorent.

² En 2009, cela représentait 7228€ par an et par personne en moyenne pour les diabétiques de type 1, contre "seulement" 4289€ pour une personne diabétique de type 2. Le montant total des remboursements liés au diabète s'élevait à 8,2 milliards d'euros.

Introduction

charges additionnelles constituent un atout thérapeutique intéressant en complément de la prise en charge classique.

Il est aujourd'hui bien admis par la communauté scientifique que l'hyperglycémie est l'une des causes majeures de stress oxydant¹ (SO), qui contribue lui-même de façon importante à l'évolution des complications diabétiques. Or, ce SO peut être modulé par l'alimentation (apport en molécules antioxydantes) ainsi que par l'activité physique. Des composés naturels à fort pouvoir antioxydant pourraient ainsi présenter un intérêt dans la prévention du SO impliqué dans le développement de complications² (Grassi et al., 2005). Concernant l'activité physique, plusieurs études récentes indiquent qu'une activité physique modérée, pratiquée de façon régulière, renforce les capacités de défenses antioxydantes de l'organisme (Gomez-Cabrera et al., 2008).

Ainsi, l'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet de différentes prises en charge (complément alimentaire ou activité physique) proposées de manière additionnelle ou alternative au traitement insulinaire classique sur la réduction du SO, dans l'objectif futur de prévenir/retarder les complications associées au diabète de type 1 sur le long terme. Dans notre travail, les prises en charges testées sont 1) un complément alimentaire dérivé du soja, le Produit Fermenté de Soja (PFS) dont l'effet antioxydant et anti-inflammatoire a été démontré *in vitro* par la société qui l'a développé, 2) un programme d'entraînement aérobie, dont on sait qu'il permet une meilleure régulation de la glycémie, mais également une baisse du SO chez le sujet sain. Notre hypothèse est que l'association de différents types de prises en charge (insulinothérapie, activité physique, complément alimentaire) permettrait de potentialiser leurs effets respectifs en agissant par des mécanismes différents.

Ce travail de thèse est introduit par une revue des données récentes concernant tout d'abord le diabète de type 1 et les altérations qu'il induit, puis le SO et les mécanismes à l'origine de son implication dans le diabète de type 1 et ses complications, et enfin l'effet des différentes prises en charge actuellement proposées aux sujets diabétiques (alimentation et activité physique) sur le statut pro/antioxydant.

La première étude aura pour objectif de déterminer si un composé alimentaire dérivé du soja (le PFS) aux propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires démontrées *in vitro*, peut diminuer de manière efficace *in vivo*, le SO et l'inflammation, chez des rats diabétiques. Cette prise en charge visant à diminuer le SO va également influencer le captage de glucose, ce dernier étant partiellement régulé par le statut pro/antioxydant.

Une seconde étude analysera donc l'impact du PFS sur les stocks de glycogène. De plus, le glycogène musculaire étant un facteur déterminant de l'aptitude physique aérobie (pouvant être altéré dans notre population d'étude diabétique), il est important d'évaluer son stockage avant de proposer une prise en charge du diabète par l'activité physique.

¹ Défini par la rupture de l'équilibre entre la production d'espèces oxydantes et l'activité des systèmes antioxydants

² Le cacao, riche en flavonoïdes, améliore la sensibilité à l'insuline et la pression sanguine chez des sujets hypertendus

Introduction

La troisième étude s'attachera ensuite à déterminer:

- d'une part, si l'insulinothérapie contribue à diminuer le SO par une meilleure régulation de la glycémie,
- d'autre part, si l'activité physique chronique, connue pour activer les systèmes antioxydants chez le sujet sain, exerce des effets similaires chez le sujet diabétique;
- et enfin, si l'association de ces deux prises en charge permet de potentialiser leurs effets respectifs.

Une étude complémentaire analysera les mécanismes sous-jacents mis en jeu par les différentes prises en charge de l'étude précédente (insulinothérapie et activité physique). Cette étude tentera de déterminer dans quelle mesure leurs effets résultent de l'amélioration de la glycémie et/ou du renforcement des défenses antioxydantes.

Enfin, la dernière étude s'intéressera aux voies de production de l'anion superoxyde (principal responsable des complications vasculaires) au niveau de l'aorte, et à l'impact respectif de l'insulinothérapie et/ou de l'activité physique chronique sur ces différentes voies.

REVUE DE LA LITTERATURE

Chapitre 1: Le diabète de type 1

1 La glycémie, un paramètre finement régulé

1.1 Principe général

Pour assurer leur fonctionnement, les cellules du corps humain ont besoin d'énergie, sous forme d'Adénosine Tri-Phosphate (ATP). Celle-ci provient de la dégradation de molécules organiques apportées par l'alimentation, essentiellement les glucides et les lipides. Parmi celles-ci, le glucose constitue l'intermédiaire principal, et toutes les cellules ont la capacité de le dégrader pour fournir de l'énergie.

Si les cellules ont besoin en permanence d'énergie, celle-ci est apportée à l'organisme de manière discontinue par l'alimentation, lors des différents repas. La concentration de glucose dans le sang, ou glycémie, est donc sujette à variation, ce que l'organisme va s'efforcer de corriger.

En période postprandiale, l'augmentation de la glycémie stimule la sécrétion d'une hormone hypoglycémisante, l'insuline. Cette hormone est sécrétée par le pancréas, et plus précisément par les cellules bêta des îlots de Langerhans, qui assurent avec les cellules alpha la fonction endocrine de cet organe. L'insuline va favoriser l'entrée du glucose dans les cellules pour qu'il puisse y être utilisé et/ou stocké, faisant ainsi baisser la concentration de glucose dans le compartiment sanguin.

A l'inverse, en période inter-prandiale, la baisse de la glycémie stimule la sécrétion par le pancréas d'une hormone hyperglycémisante, le glucagon. Celui-ci est également sécrété au niveau des îlots de Langerhans, par les cellules alpha. Il va permettre l'hydrolyse du glycogène en glucose et le relargage de ce dernier dans le secteur sanguin, pour qu'il puisse ensuite être utilisé par toutes les cellules.

1.2 L'indispensable insuline

L'insuline revêt un caractère essentiel dans la régulation de la glycémie, puisque c'est la seule hormone ayant une action hypoglycémisante. Elle est composée de 2 chaînes peptidiques, une chaîne A de 21 acides aminés et une chaîne B de 30 acides aminés. Ces deux chaînes sont reliées entre elles par deux ponts disulfures et un pont disulfure intrachaîne dans la chaîne A (Figure 1).

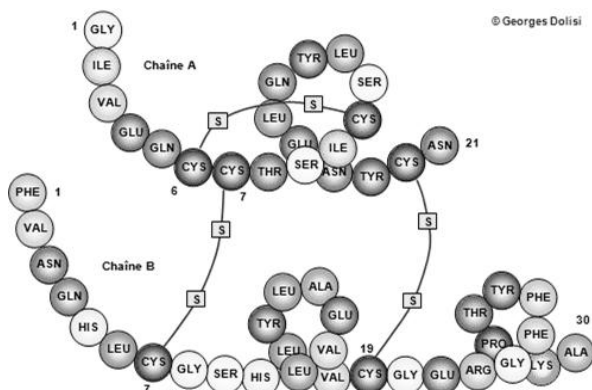


Figure 1 : Schéma de la molécule d'insuline

ALA: alanine; ARG: arginine; ASN: acide aspartique;
 ASP: asparagine; CYS: cystéine; GLN: glutamine;
 GLU: acide glutamique ; GLY: glycine ; HIS: histidine ;
 ILE: isoleucine ; LEU: leucine; LYS: lysine ;
 MET: méthionine ; PHE: phénylalanine ; PRO: proline ;
 SER: sérine ; THR: thréonine ; TRP: tryptophane ;
 TYR: tyrosine ; VAL: valine.

L'insuline exerce son action en se fixant sur son récepteur spécifique, selon une succession de réactions détaillées dans l'encadré 1. Brièvement, l'interaction hormone-récepteur entraîne une cascade de phosphorylations sur des résidus tyrosine, qui commence par l'autophosphorylation du récepteur et l'association avec son substrat majeur (IRS⁵). Il s'ensuit une succession de phosphorylations sur différents substrats, dont la phosphatidyl-inositol 3-kinase (IP3K) et la protéine kinase B (PKB, également appelée Akt), qui stimulent la translocation d'un transporteur membranaire insulino-dépendant (GLUT⁶), permettant l'entrée du glucose dans la cellule (Figure 2).

Le récepteur à l'insuline est présent à la surface de toutes les cellules, mais exprimé essentiellement dans ses tissus cibles (foie, muscle et tissu adipeux).

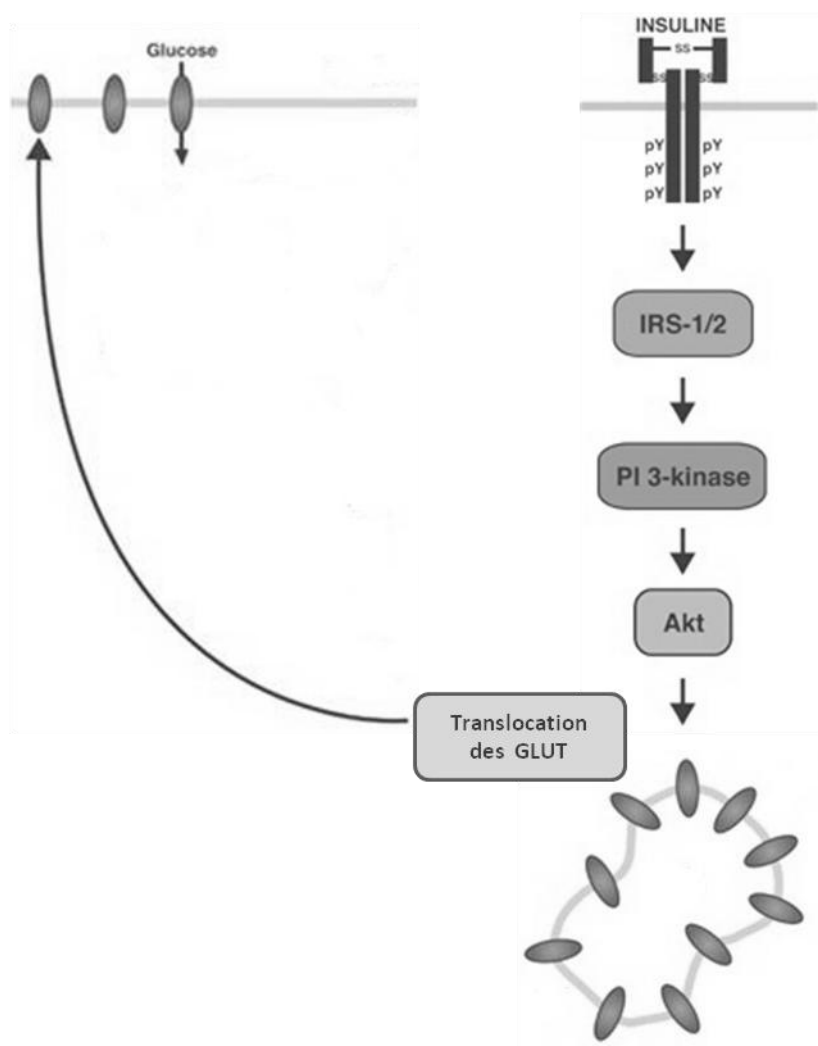


Figure 2 : Voie de signalisation de l'insuline, après fixation sur son récepteur, pour augmenter le captage de glucose

⁵ Insulin Receptor Substrate

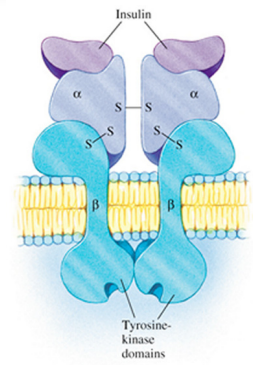
⁶ GLUcose Transporteur

Encadré 1 - Voies de signalisation de l'insuline

FIXATION DE L'INSULINE SUR SON RECEPTEUR

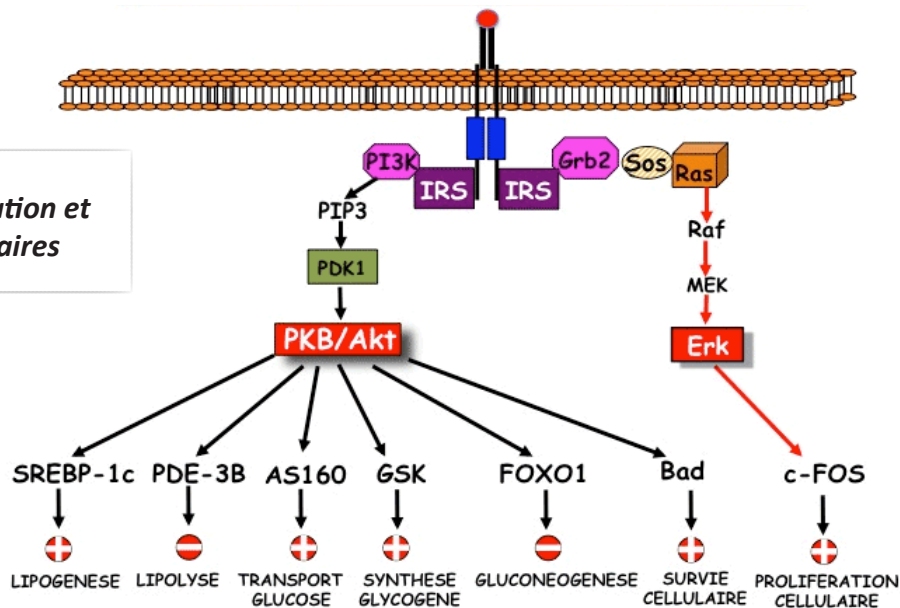
Le récepteur à l'insuline, de type tyrosine kinase, est composé de deux sous-unités alpha (~135 kDa) et de deux sous-unités beta (~95 kDa), le tout lié par des ponts disulfures et formant un hétérodimère (Capeau, 2003).

La liaison de l'insuline à la sous-unité alpha extracellulaire de son récepteur déclenche un rapprochement des deux sous-unités bêta transmembranaires, permettant l'activation du récepteur par son autophosphorylation sur les résidus tyrosines, puis sa liaison avec IRS.



PRINCIPALES VOIES DE SIGNALISATION DE L'INSULINE, APRES FIXATION SUR SON RECEPTEUR

Voies de signalisation et réponses cellulaires



1ère voie de signalisation:
IRS/PI3K/PIP3/PKB

A partir de IRS, la cascade des événements est la suivante:
 a) Liaison de PI3K à IRS (interaction protéine-protéine).
 b) Phosphorylation de PIP2¹, phospholipide de la membrane plasmique, par la sous-unité p110 de la PI3K et conversion en PIP3².
 c) Recrutement de PDK1³ (par PIP3), qui phosphoryle la protéine kinase PKB (Akt). Une seconde PDK (PDK2) phosphoryle aussi PKB.
 d) PKB phosphorylée (activée) va ensuite phosphoryler et activer différents substrats impliqués en priorité dans les effets métaboliques de l'insuline.

¹PIP2 : phosphatidyl 4,5 phosphate

²PIP3 : phosphatidyl 3, 4,5 phosphate

³PDK1 : phosphoinositide dependent kinase

⁴Autre nomenclature: Raf= MAPKK= MEKK = MAPK extra-cellular regulated kinase (ERK) kinases. L'acronyme Raf a été formé à partir d'un résultat expérimental qui montrait qu'une certaine souche de virus induisait une croissance rapide d'un fibrosarcome chez la souris «Rapidly growing fibrosarcoma in mice».

⁵Autre nomenclature: MEK =MAPK/ ERK kinase

⁶Phosphorylation de p42 ERK1 et p44 ERK2. Autre nomenclature : MAPK

2ème voie de signalisation:
IRS/Grb2/ERK (voie des MAP-Kinases)

A partir de IRS/Grb2 la séquence des événements se caractérise par une série d'interactions protéine-protéine suivie par une cascade de phosphorylations.

La cascade des événements est la suivante:

a) interactions protéine-protéine

- la protéine Grb2 qui possède un domaine SH2 interagit avec des sites de phosphorylation de IRS. Cependant, Grb2 peut aussi se lier directement au récepteur et la séquence des événements qui suivent sont les mêmes que ceux décrits ci-dessous.

- mSos (son of sevenless) interagit avec Grb2 qui par son domaine SH3 reconnaît une région riche en proline de mSos.

- Ras-GDP (localisée à la membrane plasmique) est alors convertie en Ras-GTP (forme active) par mSos. Sos est un GEF (Guanine nucleotide exchange factor), il permet l'échange GDP/GTP de l'ensemble des molécules de la super famille Ras (petites protéines G).

b) cascade de phosphorylations

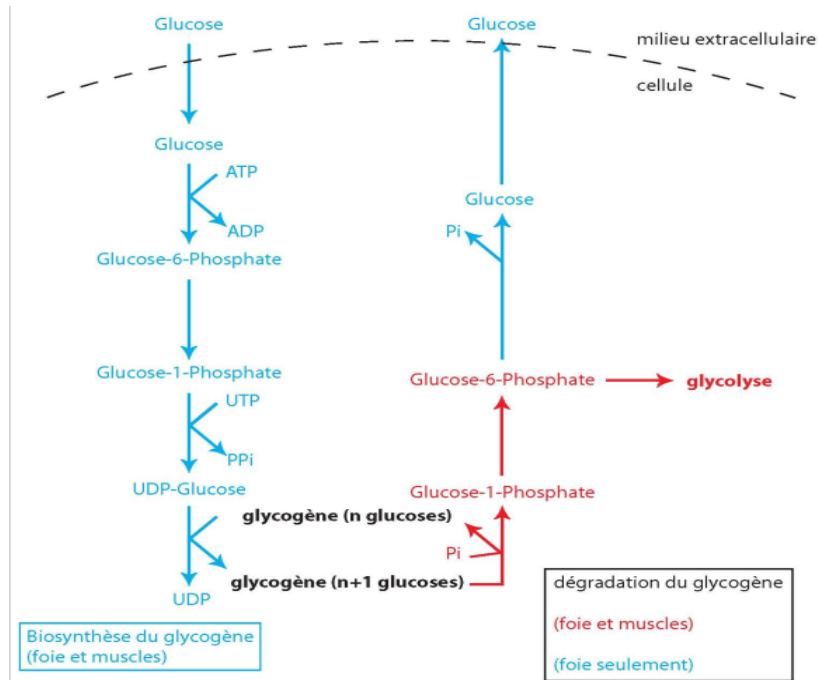
C'est l'activation de la voie classique: Ras/Raf/MEK/MAPK

- recrutement et activation de la protéine (sérine-thréonine kinase) Raf⁴, vers la membrane plasmique, phénomène initié par Ras-GTP.

- phosphorylation/activation de MEK⁵ par Raf

- phosphorylation/activation de ERK⁶ par MEK

Encadré 2 - Synthèse du glycogène à partir du glucose

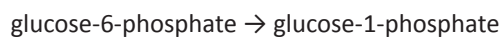


La glycogénogénèse se déroule en cinq étapes, sous l'action de différentes enzymes

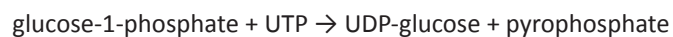
1. Action enzymatique de la glucokinase (dans le foie) ou de l'hexokinase (dans le muscle) :



2. Action enzymatique de la phosphoglucomutase :



3. Action enzymatique de l'UDP-glucose-pyrophosphorylase :



4. Action enzymatique de la glycogène-synthase ou synthétase :



5. Action enzymatique de la glycosyl-4,6-transférase :



Au niveau du foie et du muscle, le glucose va alors être stocké sous forme de glycogène. Dans le muscle, il va tout d'abord être phosphorylé par l'hexokinase pour donner du Glucose-6-Phosphate (G6P), celui-ci pouvant ensuite soit être utilisé directement pour fournir de l'énergie via la glycolyse, soit être stocké sous forme de glycogène. Dans ce dernier cas, le G6P va être converti en différents produits intermédiaires puis transformé en glycogène par la glycogène synthase (GS) (encadré 2). L'activité de cette enzyme est régulée par un rétro-contrôle positif du G6P. Au sein du tissu musculaire, l'insuline va également stimuler les différentes étapes aboutissant à la synthèse du glycogène, c'est à dire l'entrée du glucose dans la cellule, l'activité de l'hexokinase pour le convertir en G6P, et l'activité de la glycogène synthase pour produire du glycogène.

Par ailleurs, au sein du tissu adipeux, l'insuline va favoriser la lipogenèse, et donc le stockage des acides gras.

L'insuline a également des effets hémodynamiques importants qui influencent son action glucorégulatrice. En effet, il est bien admis que l'insuline entraîne une augmentation du débit sanguin total vers les muscles squelettiques (par vasodilatation et augmentation de la densité de capillaires fonctionnels) en situation physiologique (Clark et al., 2003).

Enfin, l'insuline a également des effets pléiotropes⁷ sur la synthèse protéique, l'expression des gènes, ou encore l'apoptose (Capeau, 2003).

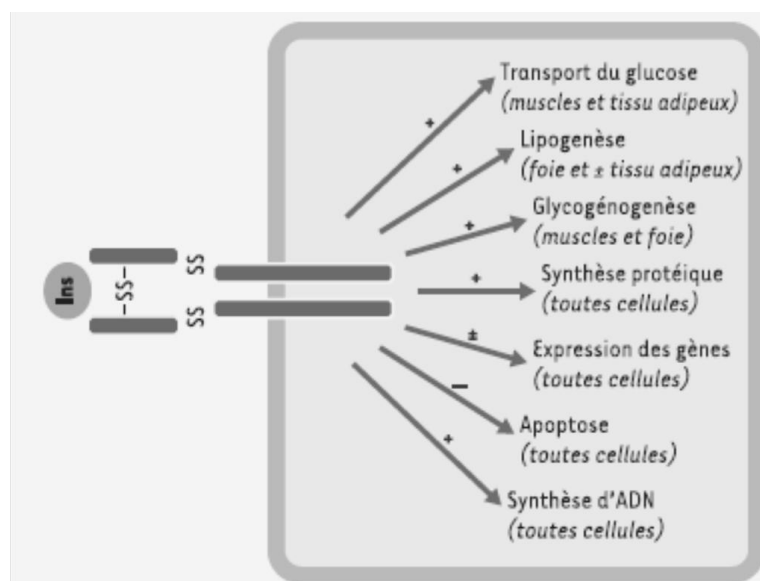


Figure 3 : Effets pléiotropes de l'insuline (Capeau, 2003)

⁷ Effets pouvant agir sur plusieurs cibles et produisant des effets indépendants les uns des autres

1.3 Rôle du glucagon

Le glucagon est un polypeptide composé de 29 acides aminés (Figure 4). Il se fixe ensuite sur ses récepteurs spécifiques que l'on retrouve au niveau de ses tissus cibles (foie, muscle et tissu adipeux, principalement). Son rôle est de faire remonter la glycémie, essentiellement en produisant du glucose à partir du glycogène stocké dans le foie. En se liant à ses récepteurs hépatiques couplés à une protéine G, le glucagon stimule l'adénylate cyclase. Celle-ci déclenche la synthèse d'un second messenger, l'AMPC, qui lui-même active les protéines kinases A. Ces dernières vont phosphoryler, et donc activer, les enzymes impliquées dans la glycogénolyse. Le glycogène est alors hydrolysé en G6P, puis en glucose. Ce dernier est ensuite relargué dans le compartiment sanguin, normalisant ainsi la glycémie. Par ailleurs, le glucagon favorise également la production d'énergie par des voies alternatives : la néoglucogenèse dans le foie (à partir du lactate, du pyruvate, du glycérol ou d'acides aminés), et la lipolyse dans le tissu adipeux.

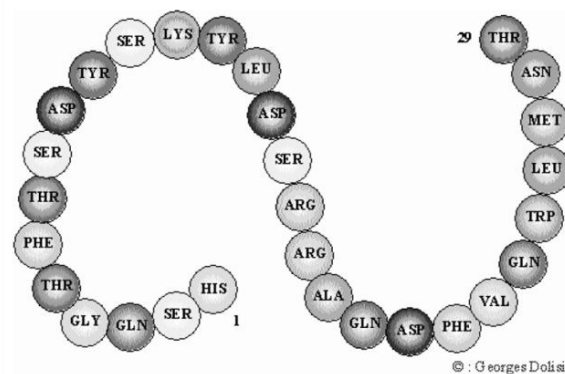


Figure 4 : Schéma de la molécule de glucagon

ALA: alanine; ARG: arginine; ASN: acide aspartique;
 ASP: asparagine; CYS: cystéine; GLN: glutamine;
 GLU: acide glutamique ; GLY: glycine ; HIS histidine ;
 ILE: isoleucine ; LEU: leucine; LYS: lysine ;
 MET: méthionine ; PHE: phénylalanine ; PRO: proline ;
 SER: sérine ; THR: thréonine ; TRP: tryptophane ;
 TYR: tyrosine ; VAL: valine

2 Quand l'insuline vient à manquer : le diabète de type 1

2.1 Définition

Le diabète de type 1 (DT1) représente un désordre métabolique à l'étiologie multiple, caractérisé par une hyperglycémie chronique, résultant d'un défaut de sécrétion en insuline et/ou de son action (Alberti and Zimmet, 1998; Grimaldi, 2009). Le caractère chronique de l'hyperglycémie est déterminé par la répétition de deux mesures successives dépassant les valeurs seuils établies par l'OMS pour diagnostiquer le diabète. A jeun, la glycémie, c'est à dire la concentration de glucose dans le sang total, est dite "normale" lorsqu'elle est inférieure ou égale à 5,6 mmol/L (101 mg/dL), ce qui correspond à une concentration en glucose dans le plasma de 6,1 mmol/L (110 mg/dL), Un individu est considéré comme diabétique lorsque sa concentration plasmatique en glucose, à jeun, est par deux fois supérieure ou égale à 7 mmol/L (126 mg/dL) (Figure 5).

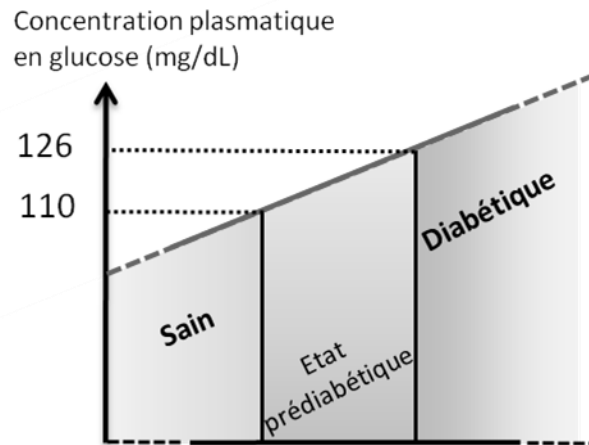


Figure 5 : Classification des sujets selon leur glycémie à jeun

2.2 Les causes du diabète type 1 : une théorie émergente

Le diabète de type 1 est essentiellement une pathologie auto-immune, la destruction des cellules productrices d'insuline résultant d'une attaque des propres cellules de l'organisme. Ainsi, dès lors qu'une hyperglycémie à jeun est détectée, on retrouve chez 85 à 90% des patients, des marqueurs de destruction immune, principalement quatre auto-anticorps (Verge et al., 1996):

- contre les cellules bêta (ICA⁸ et IA-2⁹),
- contre l'insuline (IAA¹⁰)
- contre la décarboxylase de l'acide glutamique (GAD65¹¹), impliquée dans les réactions immunitaires

Plus rarement, la destruction des cellules peut être idiopathique, c'est-à-dire sans étiologie ni pathogenèse particulière (Abiru et al., 2002).

2.2.1 Historiquement, le modèle d'Eisenbarth

Les causes du diabète de type 1 ne sont pas encore aujourd'hui clairement élucidées. Chronologiquement, il semble qu'il y ait **d'abord** une prédisposition génétique¹²(1999), **puis** la maladie ne se déclarera que s'il y a des expositions importantes/répétées/prolongées à des facteurs environnementaux qui vont altérer la fonction immune (Eisenbarth, 1986; Daneman, 2006). Parmi les facteurs, on trouve des virus (virus de la

⁸ ICA : Islet Cell Antigen

⁹ IA-2 (ou ICA512) : Islet Antigen 2

¹⁰ IAA : Insulin Auto Antibody

¹¹ GAD65 : Glutamic Acid Decarboxylase 65

¹² Les facteurs génétiques ne sont pas prépondérants, comme l'atteste le taux modéré de concordance pour le diabète de type 1 chez les jumeaux monozygotes : de 30 à 70% selon les principales études (Redondo et al., 1999)

rubéole, rotavirus, cytomégalovirus (van der Werf et al., 2007), des toxines environnementales (les dérivés de nitrate), ou encore l'alimentation (et particulièrement l'introduction trop précoce de protéines de lait de vache, de céréales ou du gluten) (Akerblom et al., 2002).

L'ensemble de ces facteurs semble être impliqué dans le développement du diabète de type 1 via un seul et même intermédiaire : le système immunitaire intestinal.

2.2.2 Récemment, le rôle central de l'intestin

Physiologiquement, l'intestin est le lieu d'échange entre les facteurs environnementaux (notamment les aliments) et le milieu intérieur de l'organisme, selon des processus complexes détaillés dans l'encadré 3. La muqueuse intestinale est donc constamment exposée à des composés de toute nature, comprenant des microbes, des antigènes d'origine alimentaire, et des toxines. Le rôle des cellules épithéliales de l'intestin est alors de discriminer les organismes pathogènes, des organismes non pathogènes, et des antigènes alimentaires : le système immunitaire intestinal peut répondre par une réaction de tolérance (le composé est reconnu et accepté par l'organisme) ou au contraire par une réaction d'immunisation (le composé est diagnostiqué comme dangereux, et il y a production d'interféron- γ pour déclencher une réponse immunitaire d'élimination). Dans le cadre du diabète de type 1, il existerait un déséquilibre entre les réactions de tolérance et d'immunisation (ces dernières étant exacerbées), ce qui participerait au déclenchement de l'auto-immunité anti-cellules bêta du pancréas (Vaarala, 1999, 2002).

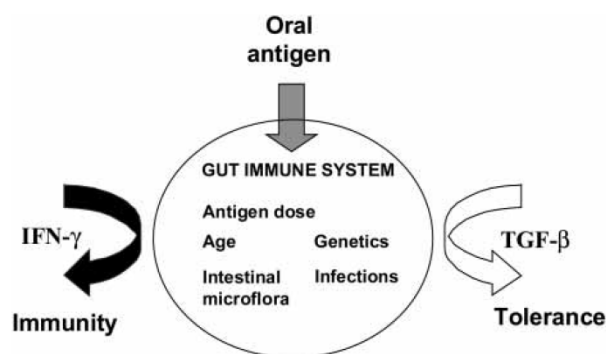


Figure 6 : Facteurs impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire intestinale (Vaarala, 2000)

Le tableau 1 présente l'ensemble des arguments en faveur de cette hypothèse, chez l'Homme et dans les modèles animaux de diabète. Les quatre arguments principaux laissant supposer un rôle du système immunitaire intestinal dans le développement du diabète de type 1 sont les suivants :

- les cellules immunitaires (lymphocytes T) responsables de la destruction des cellules bêta dans le pancréas sont d'origine intestinale (elles présentent le récepteur aux intégrines b7, spécifique de l'intestin)

Encadré 3 - L'intestin : son fonctionnement et son rôle dans l'immunité

Structure de l'intestin

L'intestin grêle est composé de trois couches superposées :

- une enveloppe externe fibreuse péritonéale,
- une enveloppe médiane musculaire, dont les muscles lisses permettent le péristaltisme,
- une enveloppe interne, la muqueuse, au contact de la lumière intestinale et au rôle crucial d'absorption des nutriments. On peut différencier la muqueuse propre, qui comporte de nombreuses villosités et microvillosités destinées à augmenter la surface d'échanges, de la sous-muqueuse, qui est traversée par le système sanguin et lymphatique.

Figure 1 : Organisation générale de l'intestin

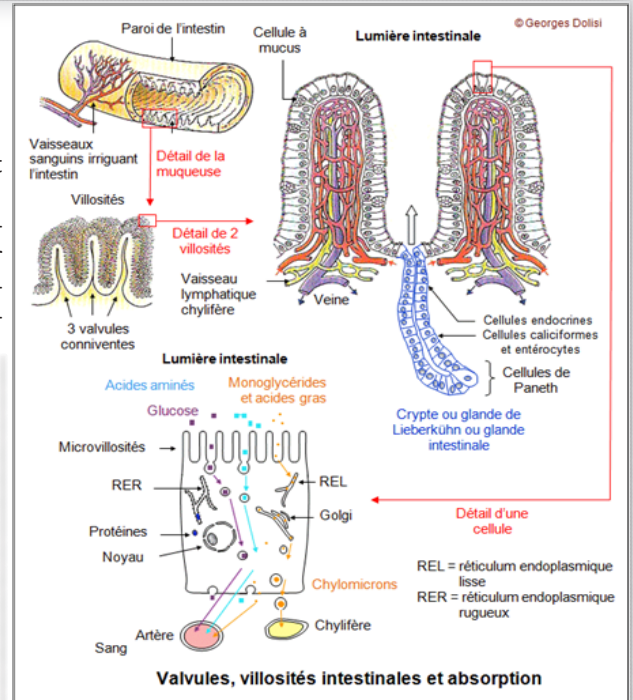
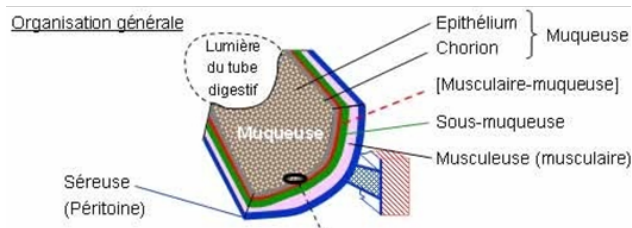


Figure 2 : détails de la structure de l'intestin

Fonctionnement physiologique de l'intestin

Les entérocytes sont les cellules les plus internes de l'intestin grêle. Leur principale fonction est de permettre le transit sélectif des nutriments de la lumière de l'intestin vers le milieu intérieur, en passant par le sang. Ces cellules forment un épithélium dans lequel les cellules sont liées par des jonctions étanches.

Les micronutriments pénètrent la membrane apicale au niveau des microvillosités, puis traversent les entérocytes et sortent au niveau de la membrane basale dans le milieu intercellulaire, où ils passent dans les capillaires sanguins. C'est l'absorption transcellulaire.

A l'état basal, l'absorption paracellulaire (passage des nutriments au niveau des jonctions serrées) est très faible. Les macromolécules (lipopolysaccharides, peptides, certaines protéines) passent la membrane intestinale au niveau des cellules M, qui les présentent aux cellules immunocompétentes. Mais certaines macromolécules peuvent traverser par passage paracellulaire, déclenchant ainsi une réponse immunitaire.

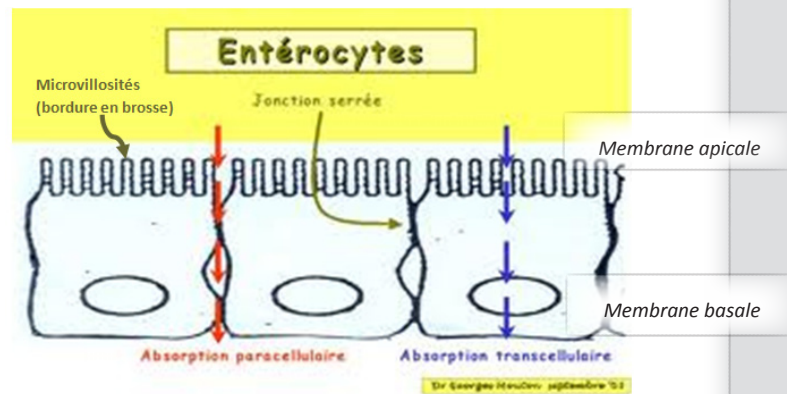


Figure 3 : Fonctionnement des cellules intestinales

Les Toll-Like Récepteurs

Ce sont des protéines transmembranaires comportant un domaine extra-cellulaire, un domaine transmembranaire, et un domaine intracellulaire permettant la transduction du signal

Les cellules épithéliales de l'intestin ou entérocytes

Elles sont reconnaissables par leurs nombreuses microvillosités à leur pôle apical. Leur rôle le plus connu est d'absorber les nutriments présents dans l'intestin, provenant de la dégradation des aliments. Toutefois, elles jouent également un rôle clé dans la transduction de signaux inflammatoires via les TLR. Elles sont reliées entre elles par une jonction étanche et créent une barrière de perméabilité entre les milieux externes et internes du corps. De nombreuses protéines transmembranaires et cytosoliques participent à cette jonction, et leurs interactions avec le cytosquelette d'actine sont un déterminant majeur de cette structure, jouant un rôle dans la régulation de la perméabilité paracellulaire.

Encadré 3 - L'intestin : son fonctionnement et son rôle dans l'immunité

Fonction immune de l'intestin

La muqueuse intestinale est constamment exposée à des composés de toute nature, comprenant des microbes, des antigènes d'origine alimentaire, et des toxines. Le rôle des cellules épithéliales de l'intestin va alors également être, lors du passage de ces composés, de discriminer les organismes pathogènes, des organismes non-pathogènes, et des antigènes alimentaires.

A ce titre, l'intestin est considéré comme un élément à part entière du système immunitaire -voire l'élément le plus important¹ -, et on parle de Système Immunitaire Intestinal (SII). Ainsi, le SII va devoir «tolérer» les protéines étrangères à l'organisme comme les protéines alimentaires et celles des bactéries intestinales, en même temps qu'il devra développer des défenses immunitaires contre les germes pathogènes. Les deux principales fonctions du SII sont:

- la synthèse d'anticorps appartenant à une classe particulière d'immunoglobulines, les IgA

Par la synthèse et la sécrétion d'IgA, le SII protège l'hôte contre les microorganismes pathogènes, bloquant leur adhésion et leur translocation vers le compartiment systémique, freinant la multiplication virale, neutralisant les toxines ou encore bloquant le passage de macromolécules en les enfermant dans des complexes immuns.

- la tolérance orale.

A l'inverse, la tolérance orale consiste à développer des réponses immunes de type «suppressif», empêchant l'induction, aux niveaux intestinal et systémique, de réponses immunes spécifiques aux protéines alimentaires et bactéries résidentes.

Pour que le SII détermine la nature des composés présents dans la lumière intestinale et adapte sa réponse, ces composés doivent interagir avec la muqueuse intestinale, selon deux modalités possibles :

1. les composés se fixent sur les Toll-Like Récepteurs, qui assurent la transduction du signal à travers les entérocytes, puis traversent eux-mêmes la barrière intestinale épithéliale (par voie transcellulaire, paracellulaire, ou au niveau des cellules M)
2. les composés influencent d'autres cellules possédant la capacité de traverser la barrière intestinale (par exemple, les lymphocytes intra-épithéliaux ou les cellules dendritiques).

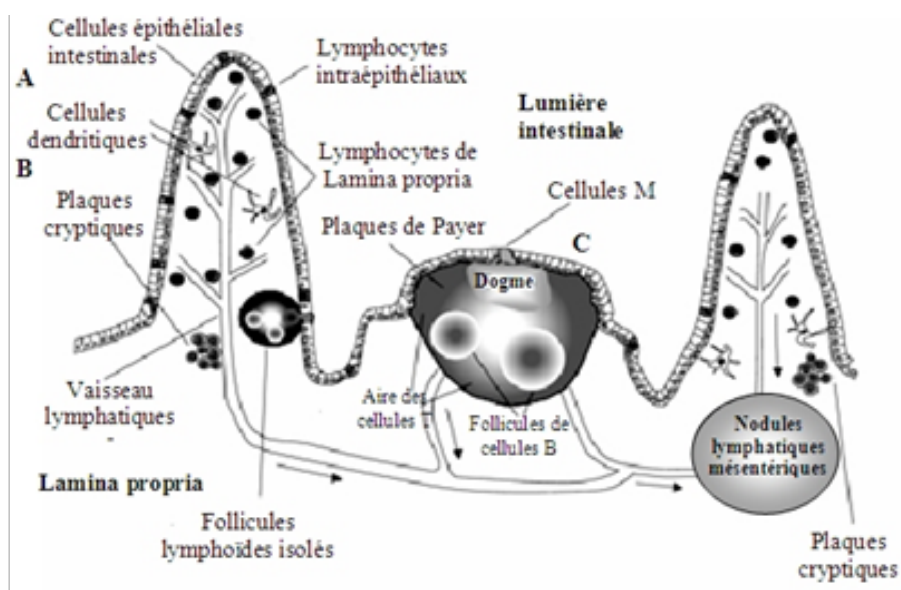


Figure 4 : Eléments de la barrière intestinale impliqués dans la réponse immunitaire

- 1 La muqueuse de l'intestin grêle et du côlon contient un nombre de cellules immunes supérieur au nombre total existant dans tout le reste de l'organisme. L'intestin est ainsi le premier organe lymphoïde de l'organisme.

Les cellules-M

Contrairement aux entérocytes, les cellules-M n'ont pas de microvillosités très développées, permettant ainsi le transport de macro-molécules. Elles sont spécialisées dans la présentation des antigènes étrangers et des micro-organismes aux tissus lymphoïdes, au niveau de la muqueuse intestinale.

Les lymphocytes intraépithéliaux

Ils sont situés sur le côté basolatéral de la couche épithéliale, où ils sont exposés à un large éventail d'antigènes alimentaires et microbiens. L'une de leur fonction est de protéger l'hôte contre l'invasion par des microorganismes qui pénètrent à travers le tractus gastro-intestinal. Un sous-type, les lymphocytes épithéliaux intestinaux, sont également à l'interface de la muqueuse et semblent jouer un rôle clé dans le maintien de la tolérance périphérique.

- si on transfère les cellules immunitaires intestinales de souris NOD¹³ à des receveurs sains, ces derniers développent un diabète de type 1
- l'administration d'auto-antigènes (notamment d'insuline) par voie orale influence le développement de la maladie chez les souris NOD: selon les cas, ce traitement peut retarder le développement du diabète (Zhang et al., 1991), ou au contraire l'exacerber (Blanas et al., 1996).
- Chez des souris ou des rats BB, divers éléments du régime alimentaire¹⁴ peuvent modifier l'incidence du diabète, en modulant les processus inflammatoires observés dans les cellules bêta du pancréas (Scott et al., 1997).

In patients

Enhanced humoral and cellular immunity to several food proteins
 Mucosal homing of lymphocytes derived from human diabetic pancreas
 Expression of gut homing receptor on GAD-reactive lymphocytes
 Markers of immune activation in the gut immunohistology
 Increased permeability of the gut
 Association of celiac disease with type 1 diabetes

In animal models

Diet modifies the development of autoimmune diabetes in BB rats and NOD mice
 Diets with low diabetogenicity induce Th2 type cytokine profile in the islet-infiltrating T cells
 The islet-infiltrating T cells express the gut-associated homing receptor $\beta 7$ integrin
 Mesenteric lymphocytes from a young NOD mice transfer diabetes to healthy recipients
 Feeding autoantigen may prevent or accelerate autoimmune diabetes

Tableau 1 : Arguments en faveur du rôle du système immunitaire intestinal dans le développement du DT1 chez l'Homme et l'animal (Vaarala, 2002)

Si l'implication du système immunitaire intestinal dans la pathogenèse du diabète de type 1 est évidente, les mécanismes sous-jacents sont encore peu compris. Il y aurait une succession d'altérations au niveau de l'intestin, à l'origine du déséquilibre de la réponse immunitaire, et donc de l'attaque auto-immune des cellules bêta du pancréas (Figure 7). Ces altérations pourraient se situer à trois niveaux:

1. une altération de la flore intestinale (de sa composition)
2. cette altération provoque des fuites au niveau de la barrière intestinale (au niveau de la muqueuse)

¹³ NOD : non-obèse diabétique. Les souris NOD développent spontanément un diabète insulino-dépendant et servent de modèle pour le diabète de type I humain, tout comme les rats BB (Bio-Breeding).

¹⁴ Source et forme des protéines (animales ou végétales, hydrolysées ou non), type de céréales (avec ou sans gluten).

- ces fuites sont à l'origine d'une réponse immunitaire altérée (réaction immunitaire au lieu d'une réaction de tolérance), qui déclenche une réaction auto-immune se propageant au pancréas.

Ces trois niveaux d'altération impliqués dans la pathogenèse du diabète représentent des éléments clés, car ils offrent des cibles potentielles d'intervention thérapeutique, visant respectivement à restaurer et maintenir une flore intestinale non diabétogène, à resserrer les jonctions épithéliales, et à prévenir la propagation de l'inflammation et de l'auto-immunité par des agents pharmacologiques ou nutritionnels.

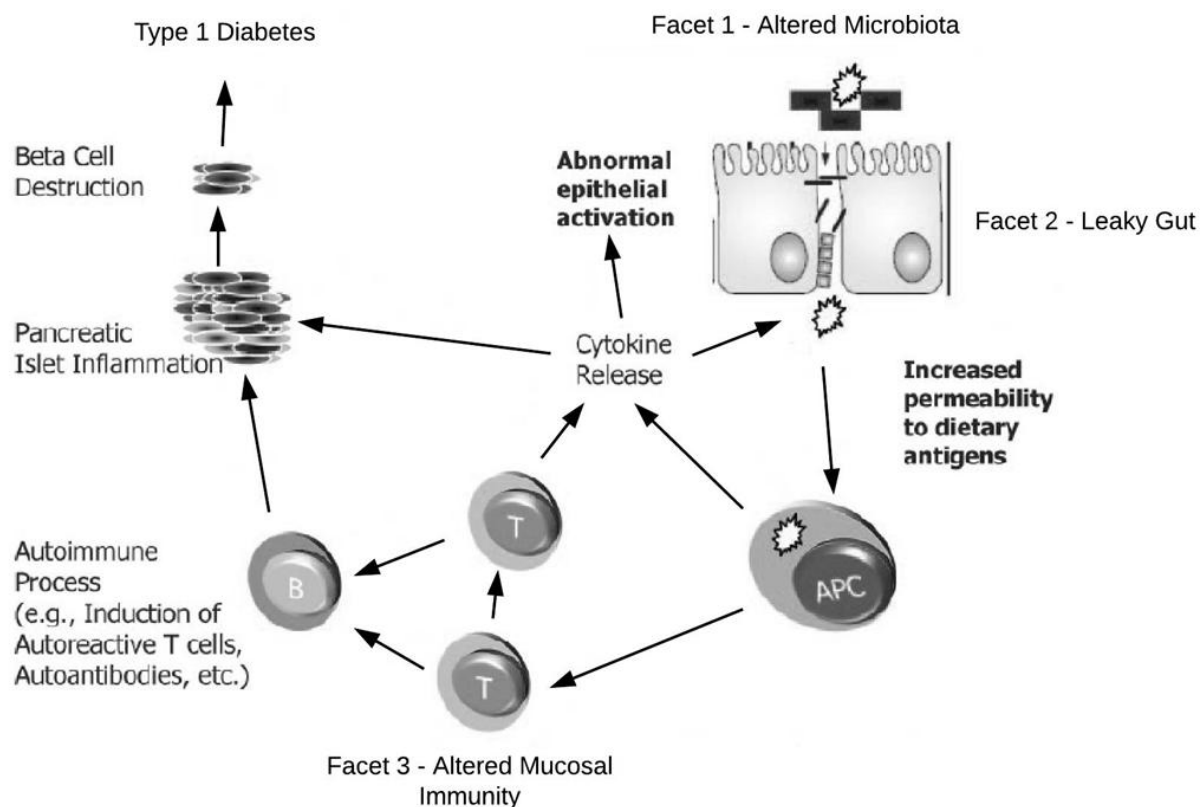


Figure 7 : Les trois niveaux d'altérations de l'intestin impliqués dans le DT1 (Vaarala, 2008)

2.2.2.1 Altération de la flore intestinale.

Le microbiote¹⁵ intestinal peut être modulé par de nombreux éléments, et notamment certains antibiotiques capables de renforcer son action. Chez des souris NOD et des rats BB, l'administration des ces antibiotiques permet de réduire la fréquence de survenue du diabète (pour revue, Vaarala, 2008). Si les mécanismes sous-jacents sont encore mal connus, le rôle prépondérant du microbiote intestinal semble certain, notamment dans la réduction de l'inflammation. Ainsi, l'administration de prébiotiques

¹⁵ Le microbiote est l'ensemble des micro-organismes (bactéries, levures, champignons, virus) dans un environnement spécifique (appelé microbiome). Le microbiote intestinal, anciennement appelé flore intestinale, constitue l'ensemble des microorganismes vivant dans l'intestin (environ 100 000 milliards, soit au moins deux fois plus que le nombre moyen de cellules de l'organisme).

(ayant également pour propriétés de renforcer le microbiote intestinal) chez ces mêmes modèles animaux stimule la production d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, et prévient le développement du diabète de type 1 (Calcinaro et al., 2005).

Jusqu'à présent, l'étude du microbiote intestinal n'avait pas permis de mettre en évidence une différence entre les sujets diabétiques et non-diabétiques, que ce soit chez l'homme ou l'animal (Vaarala, 2008). Mais cette absence de différences était vraisemblablement attribuable à des facteurs méthodologiques : plus de 500 espèces de microbes colonisent le tractus gastro-intestinal, et l'analyse de cette "flore" se faisait essentiellement par l'analyse des résidus présents dans les selles. De récentes études s'appuyant sur les techniques de métagénomique ont en effet retrouvé un microbiote moins diversifié et moins stable chez des enfants génétiquement à risques pour le diabète de type 1 (Giongo et al., 2011). Plus précisément, les bactéries responsables de la production de butyrate¹⁶ seraient moins nombreuses et moins actives chez ces sujets (Brown et al., 2011). Il existerait donc bien un ensemble d'altérations du microbiote intestinal spécifique au diabète de type 1 (Knip and Simell, 2012), ces observations ayant été confirmées chez l'animal -souris NOD- (Sysi-Aho et al., 2011).

2.2.2.2 *Altération de la perméabilité de la barrière intestinale*

Chez des rats BB, il a été démontré que préalablement à la survenue de la maladie, la perméabilité de la barrière intestinale était augmentée et que les taux de claudines (protéines intracellulaires majeures de la jonction étanche) étaient abaissés (Neu et al., 2005).

Ces altérations de la perméabilité intestinale, rapportées dans plusieurs études chez l'animal (Meddings et al., 1999; Graham et al., 2004; Neu et al., 2005), précèdent l'insulite¹⁷ et semblent résulter de mécanismes différents de ceux classiquement décrits dans le diabète de type 1. Ces altérations sont également retrouvées chez l'homme : des sujets à risques pour le diabète de type 1 ou d'autres maladies auto-immunes montrent une barrière intestinale anormale, désignée par le terme "intestin fuyant". Cette perméabilité intestinale accrue est associée à des jonctions inter-épithéliales défectueuses, permettant le passage de nombreux composés normalement retenus par la barrière intestinale, ce qui augmente l'exposition du système immunitaire intestinal aux antigènes alimentaires.

Bien que les mécanismes à l'origine de "l'intestin fuyant" soient encore mal connus, des études sont en cours pour trouver des moyens permettant de renforcer les jonctions épithéliales et diminuer la perméabilité excessive de l'intestin. Dans ce sens, les pré et probiotiques pourraient jouer un rôle dans la modulation de la perméabilité intestinale (Vaarala, 2008).

¹⁶ Le butyrate est utilisé comme substrat énergétique par les cellule épithéliales de l'intestin, et joue également un rôle majeur dans la régulation de leur processus de prolifération et de différenciation cellulaires (Mortensen et al., 1996; Litvak et al., 1998).

¹⁷ Processus auto-immun de destruction des cellules B des îlots de Langerhans

2.2.2.3 *Altération de l'immunité intestinale et inflammation*

Chez les sujets diabétiques de type 1, on constate une élévation anormale de nombreux marqueurs d'activation du système immunitaire (molécules présentatrices d'antigènes HLA classe II, molécules d'adhésion intracellulaire ICAM-1, intégrines $\alpha 4\beta 7$). A ces marqueurs d'activation du système immunitaire s'ajoute une élévation des cytokines inflammatoires (IL-4 et IL-1 α), ainsi que du nombre de cellules exprimant l'interféron- γ (responsable de la réaction d'immunité au lieu de la réaction de tolérance)(Vaarala, 2004).

L'origine de l'altération du système immunitaire intestinal pourrait se trouver dans les métalloprotéinases de la matrice (MMP), une classe d'enzymes relâchées en réponse à l'inflammation. Chez des enfants diabétiques de type 1, les niveaux de MMPs sont plus élevés et associés à une apoptose des cellules de la muqueuse intestinale (Bister et al., 2005).

2.2.2.4 *Bilan*

Les relations entre le microbiote intestinal, le concept "d'intestin fuyant" et la tolérance immunitaire sont encore peu comprises. Dans le cadre du diabète de type 1, il semble qu'une "flore" fragilisée, associée à une perméabilité accrue de l'intestin, permette un passage inapproprié du contenu intestinal vers le milieu intérieur. Ce phénomène va engendrer un dérèglement de la tolérance immunitaire (Vahasalo et al., 1996) et une réaction inflammatoire (Vaarala, 2008).

Il reste cependant difficile, à l'heure actuelle, de déterminer le lien de cause à effet entre l'augmentation de la perméabilité intestinale et l'inflammation d'une part, et la réponse altérée aux aliments et aux antigènes provenant de la flore intestinale d'autre part. Néanmoins, plusieurs études ont mis en évidence que l'exposition précoce à certains produits alimentaires (notamment le blé et le lait de vache) augmentait le risque de réactions auto-immunes contre les cellules bêta du pancréas, en induisant une inflammation de l'intestin (pour revue, Vaarala, 2006). Il semble donc que ce soit tout d'abord une exposition alimentaire qui déclenche une inflammation avec augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale, puis une réaction immunitaire anormale face aux antigènes provenant de l'alimentation, cette réaction immunitaire se propageant au pancréas.

L'inflammation apparaît dans cet enchaînement comme l'un des mécanismes initiateurs, que l'on aurait tout intérêt à contenir. C'est la théorie des "vieux amis" : elle consiste à maintenir une flore commensale stimulant le développement des lymphocytes T, qui produisent une cytokine limitant les processus pro-inflammatoires, l'IL-10. Ce phénomène permettrait de plus de maintenir une tolérance immunitaire correcte. Dans cette théorie, les pré et probiotiques occupent une place de choix, puisqu'ils pourraient permettre de modifier favorablement la flore intestinale afin d'obtenir les effets recherchés.

2.3 Physiopathologie

La destruction progressive des cellules bêta du pancréas, qui survient dans le diabète de type 1, aboutit à une carence partielle puis totale en insuline. Les signes de la maladie apparaissent lorsque la masse des cellules bêta est déjà réduite de 70 à 80% (Kloppel et al., 1985), et si une sécrétion résiduelle peut persister, l'insulinopénie est totale environ 5 ans après le début de la maladie.

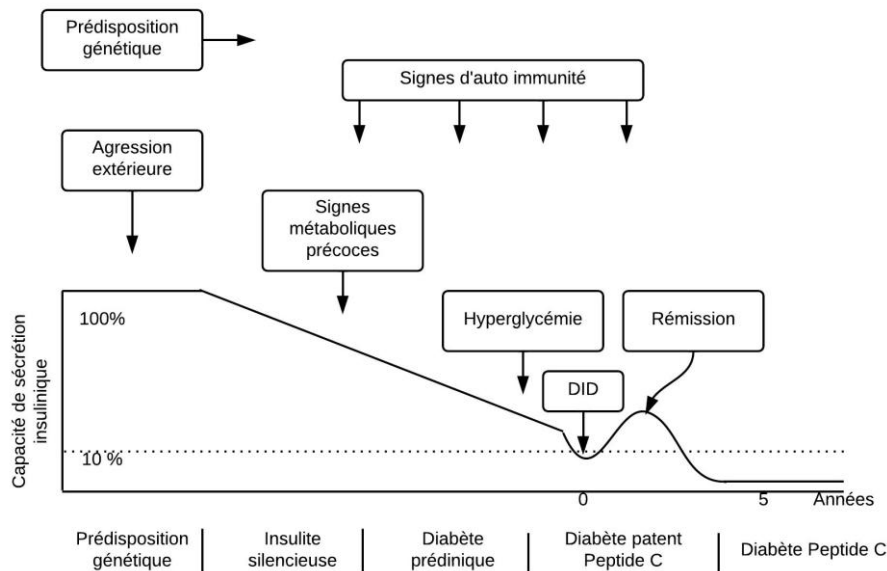


Figure 8 : Evolution chronologique du diabète de type 1 selon la sécrétion en insuline

Par conséquent, le glucose ne peut plus entrer dans les cellules par des mécanismes insulino-dépendants, et s'accumule dans le compartiment sanguin : c'est l'hyperglycémie. Il faut noter qu'une faible quantité de glucose continue à entrer dans les cellules par un phénomène de diffusion passive, selon un gradient de concentration renforcé par l'hyperglycémie (Vaag et al., 1992).

Par ailleurs, les nombreux processus régulés par l'insuline (rappelés dans la Figure 9) vont également être perturbés par l'absence de celle-ci.

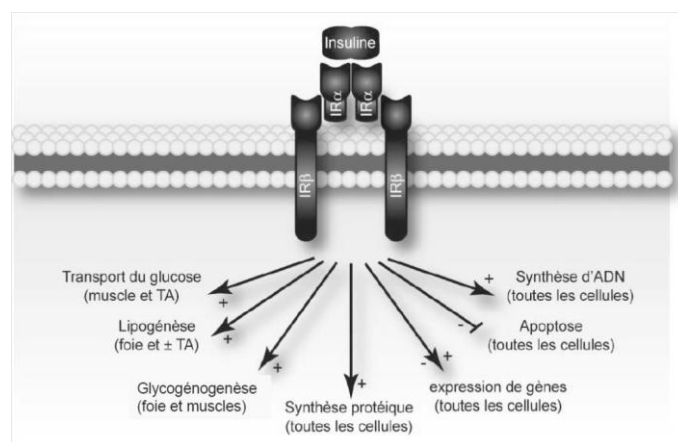


Figure 9 : Rappels des effets pléiotropes de l'insuline (Capeau, 2003)

2.4 Signes cliniques et diagnostic

Le diabète de type 1 est caractérisé par une insulinopénie partielle, puis totale, qui engendre d'importantes perturbations du métabolisme glucidique, avec des conséquences opposées au niveau systémique et cellulaire (Figure 10). En effet, au niveau systémique, le glucose qui ne peut plus entrer dans les cellules s'accumule dans le secteur sanguin: c'est l'hyperglycémie. Au niveau cellulaire, c'est l'inverse: les cellules sont privées de glucose, et doivent trouver d'autres sources d'énergie, via la protéolyse et la lipolyse. Cette dernière est renforcée par l'absence d'insuline, seule hormone anti-lipolytique.

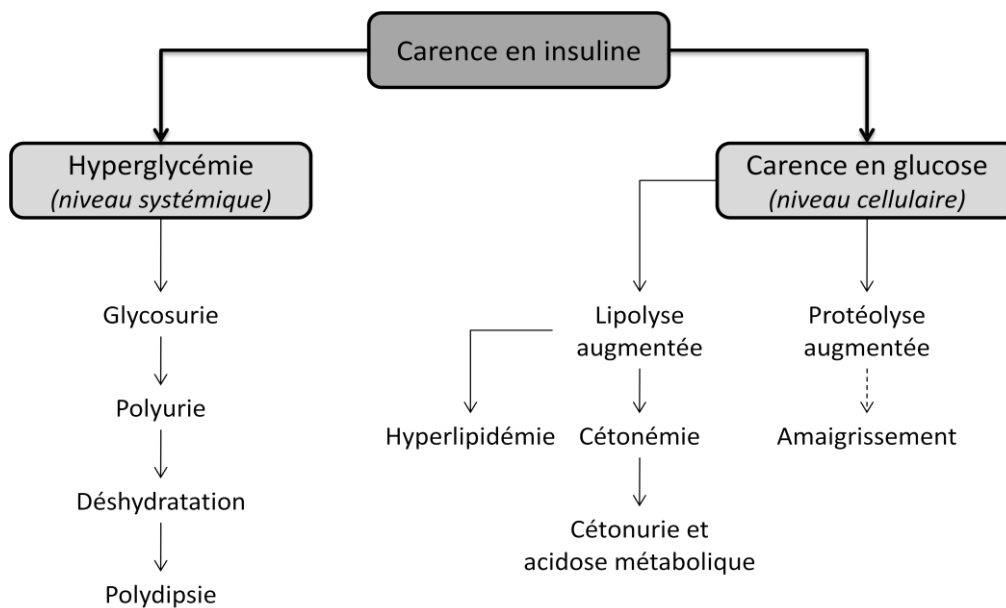


Figure 10: Conséquences systémiques et cellulaires de l'insulinopénie dans le diabète de type 1

2.4.1 L'hyperglycémie

Chez le diabétique non traité, l'hyperglycémie aiguë est à l'origine de nombreux troubles. Lorsque la concentration en glucose dépasse 1,8 gr/L, seuil de réabsorption rénal, il est retrouvé dans les urines et on parle alors de glycosurie. Cette dernière s'accompagne d'une polyurie¹⁸ osmotique conduisant à une déshydratation non compensée, malgré une soif importante associée (polydipsie) et une grande consommation de boisson. Elle peut s'accompagner de troubles du comportement (sommolence, confusion, vertiges), de nausées et/ou de vomissements (Alberti and Zimmet, 1998). De plus, l'hyperosmolarité résultant de l'hyperglycémie provoque une déshydratation intracellulaire, via une fuite d'eau et de potassium depuis les cellules vers le compartiment sanguin (Figure 11). L'ensemble de ces déséquilibres aboutit, en l'absence de traitement, à un coma puis à la mort en quelques heures (Kitabchi et al., 2009).

¹⁸ Elévation du volume des urines

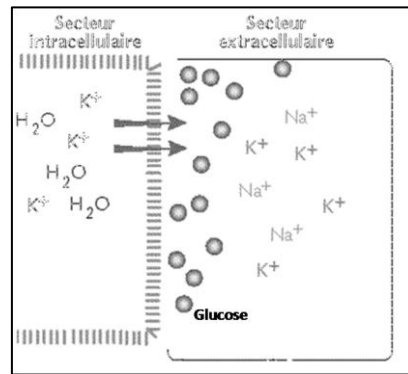


Figure 11 : Mécanismes de déshydratation intracellulaire induite par l'hyperglycémie (Lefèvre, 1999)

2.4.2 L'acidocétose

Malgré l'abondance du glucose dans le secteur sanguin, celui-ci ne peut quasiment plus rentrer dans les cellules qui sont privées de leur principale source d'énergie, et doivent donc trouver un substrat énergétique alternatif. Elles vont alors se tourner vers les acides gras libres et les acides aminés, avec pour principal danger la formation de corps cétoniques, ceux-ci diminuant le pH sanguin et créant une acidocétose (Figure 12). En effet, la levée d'inhibition de la lipolyse en l'absence d'insuline aboutit à une libération importante d'acides gras libres. Au niveau du foie, ceux-ci sont oxydés et aboutissent à la formation de corps cétoniques, principalement l'acide acétoacétique et l'acide β -hydroxybutyrique. Ces corps cétoniques, qui sont des acides forts, vont libérer des ions H^+ dans le plasma, contribuant ainsi à une acidose métabolique (Rosenbloom, 2010), elle-même à l'origine d'une hyperventilation. L'augmentation de l'acétonémie va également avoir pour conséquences l'apparition de corps cétoniques dans les urines, et une élévation de la pression partielle en oxygène résultant du métabolisme de ces corps cétoniques dans certains tissus comme le cœur.

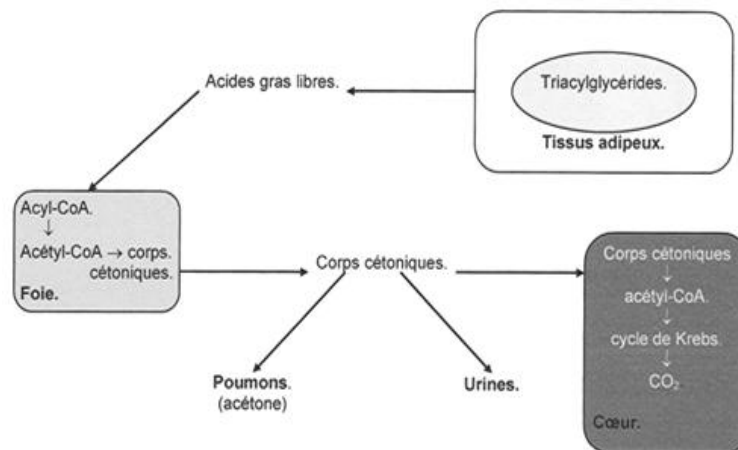


Figure 12 : Mécanismes à l'origine de l'acidocétose

C'est l'ensemble de ces signes cliniques, que l'on nomme la triade (polyurie/polydipsie/perte de poids inexpliquée résultant de la lipolyse), qui va amener au diagnostic, via notamment une analyse d'urines à la recherche d'une glycosurie et d'une cétonurie.

Le diabète de type 1 : en bref...

La glycémie est un paramètre faisant l'objet d'une régulation physiologique très fine, par deux principales hormones glucorégulatrices aux effets opposés, l'insuline et le glucagon. Dans le cadre du diabète de type 1, la sécrétion d'insuline diminue jusqu'à devenir nulle, provoquant une hyperglycémie majeure associée à diverses complications mettant en jeu le pronostic vital en l'absence de traitement. De nouvelles théories impliquant les facteurs environnementaux dans le déclenchement de la pathologie pourraient expliquer l'augmentation de son incidence ces dernières décennies. Chez les personnes ayant un profil génétique à risque, l'exposition de la muqueuse intestinale à différents composés (toxines, virus, protéines de lait) va altérer celle-ci et perturber la réponse immunitaire qu'elle contrôle (Vaarala, 2008). Une réaction inflammatoire et auto-immune se produit alors, et se propage jusqu'au pancréas où elle déclenche la destruction des cellules bêta, productrices d'insuline. La perturbation du microbiote intestinal est retrouvée tout au long du diabète, et contribue à l'inflammation permanente observée chez les DT1. Ces découvertes récentes constituent autant de cibles à explorer pour la prévention et/ou la prise en charge précoce du DT1, avant que des complications au long cours ne se développent.

3 Le diabète de type 1 : des conséquences multiples, des complications lourdes

La gravité des signes cliniques aboutissant au diagnostic du diabète impose la mise en place rapide d'une insulinothérapie, assurant la survie des patients. Toutefois, ce traitement ne permet pas de reproduire strictement la physiologie naturelle du métabolisme glucidique, dont les diverses perturbations vont entraîner des complications ubiquitaires chez le sujet DT1.

3.1 Des perturbations multiples du métabolisme glucidique

3.1.1 *La persistance des épisodes hyperglycémiques*

L'importance des épisodes hyperglycémiques (fréquence et durée) est évaluée chez le patient diabétique par son taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c). Elle constitue le paramètre de référence dans la surveillance de l'équilibre glycémique des patients diabétiques. L'HbA1c est formée par une réaction non enzymatique lorsque l'hémoglobine est exposée de façon prolongée à des hauts niveaux de glucose. Sa valeur augmente si les périodes d'hyperglycémie sont fréquentes et diminue lorsque la glycémie a été correctement équilibrée. Ainsi, meilleur est le contrôle glycémique, plus basse est l'HbA1c. Sa valeur normale se situe entre 4 à 6% de l'hémoglobine totale, et reflète le contrôle glycémique sur les trois mois précédents¹⁹ (Saudek and Brick, 2009).

Si l'un des avantages de la mesure de l'HbA1c est de refléter les variations de la glycémie à long terme tout en s'affranchissant des variations ponctuelles (par exemple, l'augmentation de glycémie postprandiale), il peut exister entre ces deux paramètres (HbA1c/glycémie) une très grande variabilité selon l'efficacité du contrôle glycémique. Ainsi, Kilpatric et al. (2007) ont montré que l'HbA1c ne diffère pas significativement entre deux groupes de patients, l'un sous insulinothérapie classique et l'autre sous insulinothérapie intensive, alors que la concentration plasmatique moyenne de glucose²⁰ dans le second groupe est plus faible, montrant un meilleur contrôle glycémique. De plus, la mesure de l'HbA1c peut être affectée par des anomalies touchant les globules rouges (anémie hémolytique²¹, par exemple), conduisant à des valeurs d'HbA1c faussement faibles.

Un autre paramètre est donc utilisé en routine clinique : l'évaluation de la fructosamine, qui résulte de la glycation de l'albumine, et reflète la concentration plasmatique de glucose sur une période plus courte (trois semaines), indépendamment de l'hémoglobine (Youssef et al., 2008).

¹⁹ Cela correspond à la durée de vie des globules rouges, qui est d'environ 100 jours.

²⁰ Etablie à partir de mesures répétées à différents moments de la journée (sept mesures au total), notamment en période préprandiale, postprandiale, et au coucher.

²¹ Destruction anormale des globules rouges

3.1.2 A l'inverse, l'apparition d'épisodes hypoglycémiques

L'insulinothérapie, notamment intensive, constitue le facteur de risque principal des épisodes hypoglycémiques chez le DT1. Ceux-ci résultent de l'interaction de nombreux éléments comme l'âge, la durée du diabète, la durée et l'intensité du traitement à l'insuline, les erreurs de dosage, l'insulino-sensibilité, les interactions médicamenteuses, l'activité physique, l'état nutritionnel ou encore la présence de complications associées (Tableau 2).

Avec excès d'insuline
<ul style="list-style-type: none"> • Erreur au niveau du : <ul style="list-style-type: none"> - Dosage - Type d'insuline - Moment de l'injection • Absorption inadéquate : <ul style="list-style-type: none"> - Absorption augmentée par injection au niveau d'un membre en exercice ; dans une région de lipodystrophie ou dans le muscle • Accumulation : <ul style="list-style-type: none"> - Clairance diminuée (insuffisance rénale) • Augmentation de l'insulino-sensibilité <ul style="list-style-type: none"> - Exercice physique ; perte pondérale ; amélioration du contrôle glycémique ; introduction d'un sensibilisateur à l'insuline
Sans excès d'insuline
<ul style="list-style-type: none"> • Métabolisme de base augmenté <ul style="list-style-type: none"> - Exercice physique • Gluconéogenèse diminuée <ul style="list-style-type: none"> - Hépatopathie ; alcool ; insuffisance rénale • Manque d'apport exogène <ul style="list-style-type: none"> - Repas retardé ou jeûne prolongé

Tableau 2 : Facteurs de risques d'hypoglycémie chez le DT1 (Ardigo and Philippe, 2008)

Pour lutter contre l'hypoglycémie, il existe un système dit "de contre-régulation", dont les effets sont opposés à ceux de l'insuline. L'axe sympatho-adrénergique joue un rôle majeur dans ce système chez le sujet diabétique : la sécrétion de catécholamines vise à corriger la glycémie et à maintenir un apport énergétique suffisant aux cellules en stimulant la glycogénolyse, la gluconéogenèse et la lipolyse. Elle permet de plus au sujet, de prendre conscience de son hypoglycémie, en déclenchant un ensemble de symptômes tels que palpitations, sueurs, tremblement, faim ou anxiété (Schwartz et al., 1987). Toutefois, en cas d'atteinte du système nerveux autonome (neuropathie diabétique) ou d'antécédents d'hypoglycémies répétées, on observe une altération de la réponse sympatho-adrénergique, à la fois dans le déclenchement du système de contre-régulation et dans l'apparition des symptômes d'hypoglycémie, rendant difficile la détection de cette dernière.

A court terme, les conséquences des hypoglycémies chez le diabétique de type 1 sont liées à une morbidité accrue par accidents (chute, fracture, accident de la circulation). Les effets à long terme sont secondaires au mauvais contrôle métabolique lié à la crainte des hypoglycémies.

En ce qui concerne la fonction cognitive, une grande étude de cohorte, la Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) n'a pas démontré de détérioration chez les patients soumis à une insulinothérapie intensive, malgré des épisodes hypoglycémiques récurrents; alors qu'une détérioration modérée de cette fonction a été mise en évidence dans le groupe sous insulinothérapie classique, en lien avec la présence d'atteintes microvasculaires et macrovasculaires résultant d'un moins bon contrôle glycémique (Jacobson et al., 2007).

3.1.3 Une conséquence paradoxale : l'insulinorésistance

Si la régulation de la glycémie est altérée dans le DT1 par l'absence d'insuline endogène, ces perturbations du contrôle métabolique peuvent, de plus, être aggravées par la résistance des tissus périphériques à l'action de l'insuline exogène. On parle alors de "double diabète", associant les facteurs de risques cardiovasculaires du diabète de type 1 et de type 2 (Kilpatrick et al., 2007). L'insulinorésistance résulte essentiellement d'une insulinothérapie inadaptée. Ainsi, l'insuffisance d'insuline et l'hyperglycémie associée sont à l'origine du phénomène de glucotoxicité²². Celui-ci cause des altérations qui réduisent l'action de l'insuline, générant ainsi un cercle vicieux où l'hyperglycémie et l'insulinorésistance se renforcent mutuellement.

Chez des rats diabétiques, il a ainsi été démontré que le captage musculaire de glucose, en réponse à l'insuline, est diminué. De plus, cette diminution est en lien avec la durée du diabète: diminution de 36% et 60%, respectivement 2 et 4 semaines après l'induction du diabète (Maegawa et al., 1986).

Chez l'homme, l'évaluation de l'insulinosensibilité et la mise en évidence de l'insulinorésistance font appel à des techniques invasives (encadré 4), donc peu pratiquées, et notamment le clamp euglycémique hyperinsulinémique²³. Cette technique a toutefois permis d'objectiver, dans plusieurs études, le phénomène d'insulinorésistance chez des sujets DT1 (DeFronzo et al., 1982; Pang and Narendran, 2008).

Plus récemment, un score d'insulinorésistance basé sur des facteurs cliniques, l'eGDR²⁴, a été validé chez l'adulte diabétique de type 1, permettant d'évaluer ce phénomène à grande échelle. Plus ce score est bas, plus le patient présente une insulinorésistance (Williams et al., 2000). La prévalence de l'insulinorésistance dans le diabète de type 1 a été ainsi évaluée à environ 20% (Pang and Narendran, 2008). Les données de grandes études épidémiologiques (Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study, et Diabetes Control and Complications Trial) ont également été analysées

²² La glucotoxicité, qui résulte de l'hyperglycémie chronique, représente les dommages structuraux et fonctionnels qui touchent les tissus cibles de l'insuline.

²³ Une perfusion intra-veineuse d'insuline à débit constant permet d'obtenir un plateau d'insulinémie, tandis qu'une perfusion simultanée de glucose à débit variable maintient la glycémie à son niveau basal. La sensibilité à l'insuline est appréciée par le débit de perfusion du glucose, exprimée en mg de glucose/kg de poids du sujet/min, que l'on peut rapporter au niveau d'insulinémie atteint.

²⁴ eGDR : estimated Glucose Disposal Rate (estimation du taux d'élimination du glucose)

Il est exprimé en mg de glucose/kg de poids du sujet/min, et obtenu par l'équation $24,31 - (12,22 \times \text{rapport taille/hanche}) - (3,29 \times \text{hypertension [mmHg]}) - (0,57 \times \text{HbA1c [\%]})$. L'hypertension est caractérisée par une pression artérielle systolique supérieure à 140mmHg ou diastolique supérieure à 90mmHg.

rétrospectivement avec cet outil, et ont démontré qu'un score bas, témoin d'une insulino-résistance, était associé à une augmentation des risques de complications micro- et macro-vasculaires (pour revue, Pang and Narendran, 2008).

En complément de ce score, des besoins accrus en insuline exogène (supérieurs à 1U/kg/jour pour un contrôle métabolique correct) sont également considérés comme marqueur d'une insulino-résistance (Wallace and Matthews, 2002). Toutefois, cette insulino-résistance peut être présente et associée à des complications plus fréquentes, sans que les doses d'insuline injectées ne doivent être augmentées (Chillaron et al., 2009).

3.2 A long terme, des complications ubiquitaires

Les épisodes hyperglycémiques engendrés par le diabète de type 1 s'accompagnent à long terme, de complications microvasculaires, neurologiques, et macrovasculaires (Figure 13). Le traitement à l'insuline a largement permis d'améliorer le pronostic des malades, évitant une issue fatale à court terme. Depuis son introduction, ce sont les complications, parmi lesquelles les rétinopathies, néphropathies, neuropathies, ou maladies cardiovasculaires, qui sont devenues la cause principale de la mortalité diabétique. Elles sont également à l'origine des conséquences les plus sévères du diabète, parmi lesquelles l'insuffisance rénale chronique, la cécité ou l'amputation.

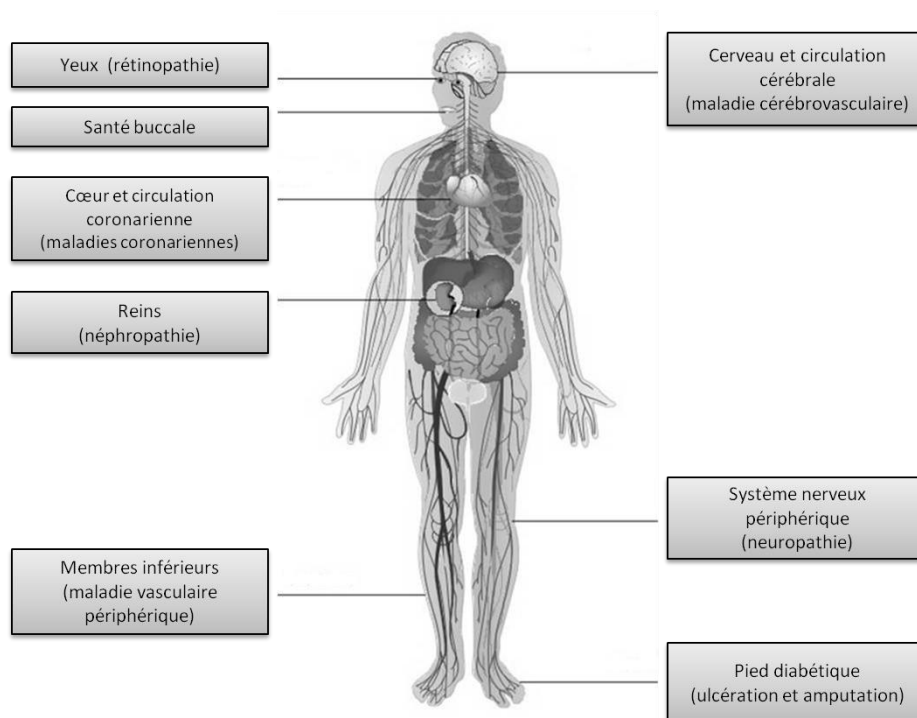


Figure 13 : Les principales complications macro et microangiopathiques à long terme du diabète (d'après L'Atlas du Diabète de la FID, 2011)

Encadré 4 - Méthodes d'évaluation in vivo de l'insulinosensibilité

(d'après Raynaud et al., 1998)

Il n'existe pas, actuellement, de méthode d'exploration de l'insulino-sensibilité répondant au double souci de précision et de simplicité. On peut distinguer plusieurs approches, qui correspondent à des niveaux de difficulté croissants, à la fois sur le plan conceptuel et technique : évaluation biologique à l'état basal, évaluation biologique après administration d'insuline exogène, ou après stimulation de la sécrétion insulino-endogène

ÉVALUATION BIOLOGIQUE À L'ÉTAT BASAL

Rapport insuliniémie/glycémie

- ✓ Une diminution de la sensibilité à l'insuline entraîne un hyperinsulinisme compensatoire, afin que l'homéostasie glucidique soit maintenue. La mesure de l'insuliniémie à jeun, comparativement à la glycémie correspondante, apparaît donc comme un index simple de la sensibilité à l'insuline.
- ✓ La principale limite de ce test réside dans le fait que la corrélation négative entre l'insuliniémie basale et la sensibilité à l'insuline n'est satisfaisante que chez les sujets dont la tolérance au glucose est normale.

Index obtenus à partir des mesures d'insuliniémie et de glycémie à jeun

- ✓ Ces index correspondent à la construction, par modélisation mathématique, d'un abaque montrant la correspondance entre insuline et glycémie de base, pour différents degrés d'insulinorésistance et de déficience beta-pancréatique. Différents index ont été validés (le dénominateur correspond à une normalisation de la glycémie et de l'insuliniémie):
 - le modèle Homa (Homeostasis Model Assessment) à $\text{Insuliniémie(mUI/l)} \times \text{Glycémie(mmol/l)} / 22.5$
 - le Firi (fasting insulin resistance index) à $\text{Insuliniémie(mUI/l)} \times \text{Glycémie(mmol/l)} / 25$
 - le Quicky à $1 / [\log(\text{Insuliniémie}) + \log(\text{Glycémie})]$

ÉVALUATION BIOLOGIQUE APRÈS ADMINISTRATION D'INSULINE EXOGÈNE

Test de tolérance intraveineuse à l'insuline

- ✓ Injection de 0,1U d'insuline/kg de poids on calcule un index correspondant à la vitesse de diminution de la glycémie au cours des 30 minutes suivant l'injection.
- ✓ Inconvénients : risque d'hypoglycémie +++

Test de tolérance à l'insuline modifié ou test court à l'insuline

- ✓ Etude sur 15 minutes seulement, détermination du rapport $[(\text{glycémie basale } G_0 - \text{glycémie à 15 minutes } G_{15})/G_0]$, normalement inférieur à 0,5.
- ✓ Intérêts : absence de contre-régulation hormonale pendant les 15 minutes qui suivent l'injection, diminution du risque hypoglycémique (possibilité de resucrage dès la quinzième minute), méthode simple, peu coûteuse, avec une reproductibilité satisfaisante.

Test de suppression insulémique (dit, technique du SSPG ou Steady State Plasma Glucose)

- ✓ Perfusion simultanée insuline-glucose-adrenaline-propranolol ou insuline-glucose-somatostatine (débits constants). La perfusion d'insuline fixe l'insuliniémie à un plateau, le SSPI ou steady state plasma insulin. On perfuse ensuite du glucose : la glycémie s'élève et atteint un plateau, le SSPG, d'autant plus élevé que le sujet est insulinorésistant. La clairance métabolique du glucose correspond au rapport débit de perfusion de glucose/SSPG, l'index de sensibilité à l'insuline est défini par le rapport clairance métabolique du glucose/SSPI.
- ✓ Intérêts : l'utilisation d'agents pharmacologiques permet de bloquer l'insulinosécrétion endogène.

Clamp euglycémique hyperinsulinémique (Technique de référence)

- ✓ Une perfusion intraveineuse d'insuline à débit constant permet d'obtenir un plateau d'insuliniémie, tandis qu'une perfusion simultanée de glucose à débit variable maintient la glycémie à son niveau basal. Le protocole le plus classique fait appel à un débit d'insuline de 1 mU/kg/min pendant 120 minutes, de sorte que l'insuliniémie s'élève à un plateau voisin de 100 mU/l. La production hépatique de glucose est alors inhibée, le débit de glucose nécessaire pour maintenir la glycémie constante correspond à la quantité de glucose utilisée par les tissus périphériques, principalement les muscles squelettiques. La sensibilité à l'insuline est donc appréciée par le débit de perfusion de glucose à l'équilibre « M », exprimé en mg/kg/min, que l'on peut rapporter au niveau d'insuliniémie atteint (figure 1).
- ✓ Intérêts: méthode fiable, sensible et reproductible
- ✓ Limites : très peu physiologique, coûteux, techniquement lourd et difficile à mettre en œuvre en dehors d'un milieu spécialisé. Ne prend pas en compte l'insulinosécrétion endogène.

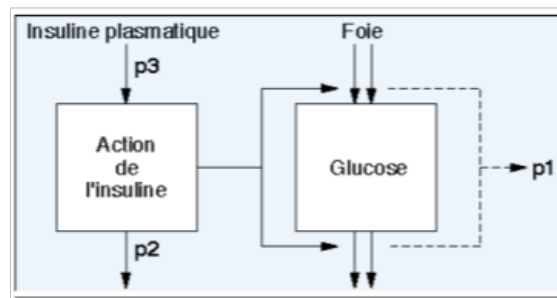
Encadré 4 - Méthodes d'évaluation in vivo de l'insulinosensibilité

(d'après Raynaud et al., 1998)

ÉVALUATION BIOLOGIQUE APRÈS STIMULATION DE LA SECRETION INSULINIQUE ENDOGENE

Hyperglycémie provoquée par voie intraveineuse modélisée selon la méthode du minimal model

- ✓ L'IVGTT (intravenous glucose tolerance test, ou minimal model), correspond à une modélisation mathématique relativement simple de l'épreuve d'hyperglycémie provoquée par voie intraveineuse.
- ✓ Sur le plan pratique, une injection intraveineuse de glucose (solution à 30 %, 0,3 ou 0,5 g/kg) est effectuée afin de stimuler la sécrétion insulinoïque endogène. La réponse insulinoïque est biphasique : une phase précoce, limitée aux dix premières minutes après l'injection, suivie d'une phase tardive, plus prolongée et de moindre amplitude. Des prélèvements sanguins réguliers sont effectués sur 180 minutes pour doser l'insuline et le glucose. Pour augmenter la précision de la méthode, un bolus d'insuline (0,03 U/kg) est injecté par voie intraveineuse, à la vingtième minute. On déduit de cette épreuve trois composantes majeures du métabolisme glucidique :
 - la réponse précoce d'insuline au glucose, mesurée par la somme des valeurs d'insulinémie aux première et troisième minutes ($I_1 + I_3$)
 - la sensibilité à l'insuline (SI)
 - l'assimilation glucidique indépendante de toute variation de l'insulinémie



- *Hypothèse de distribution monocompartimentale du glucose, à l'origine du concept du minimal model. L'efficacité glucidique, c'est-à-dire l'assimilation du glucose indépendante de toute variation de l'insulinémie, correspond à $p1$; la sensibilité à l'insuline correspond au rapport $p2/p3$*
- ✓ Intérêts : c'est, avec le clamp euglycémique hyperinsulinémique, la méthode de référence d'évaluation de l'insulino-sensibilité. Leur reproductibilité est tout à fait satisfaisante et comparable. Le minimal model apparaît donc comme une méthode très séduisante, plus simple et moins coûteuse que le clamp. Il permet la détermination simultanée de la sensibilité à l'insuline (SI) et de la capacité du glucose à promouvoir sa propre utilisation (S_g) : deux clamps distincts seraient nécessaires pour obtenir les mêmes données. Le minimal model fournit donc un panel d'index permettant une approche globale de l'assimilation glucidique, dans des conditions techniques facilement accessibles.
- ✓ Inconvénients : l'indice de sensibilité à l'insuline SI ne distingue pas les effets de l'insuline sur le foie, de ceux exercés sur les tissus périphériques, en particulier les muscles squelettiques. C'est une différence majeure par rapport au clamp. Certains auteurs pensent que l'IVGTT conduit à une surestimation du paramètre d'assimilation glucidique. Plusieurs études rapportent des indices de sensibilité à l'insuline SI proches de zéro, dont la réalité physiologique semble douteuse, chez le diabétique de type 2 ou même le non-diabétique.

Perfusion continue de glucose avec modélisation mathématique Cigma (continuous infusion of glucose with model assessment)

- ✓ Une perfusion continue de glucose par voie intraveineuse (5 mg/kg de poids idéal/min pendant 60 minutes) provoque une hyperglycémie et une réponse insulinosécrétoire jusqu'à obtention d'un état d'équilibre, avec un plateau d'hyperglycémie et un plateau d'hyperinsulinémie. Après transformation mathématique, les valeurs au plateau fournissent une évaluation des degrés de déficit de la sensibilité à l'insuline et de l'insulinosécrétion.

3.2.1 *La macroangiopathie diabétique*

La macroangiopathie diabétique regroupe à la fois l'athérosclérose, semblable à celle survenant chez le sujet non diabétique, et une altération générale moins bien caractérisée des artères, affectant leur structure (prolifération endothéliale, fibrose diffuse, dégénérescence de la media) et leur fonction (vasomotricité) (Grimaldi and Heurtier, 1999).

C'est l'hyperglycémie elle-même, en fonction de sa durée et de son intensité, qui est à l'origine de cette athérosclérose. Celle-ci est aggravée par l'insuffisance rénale et d'autres facteurs de risques cardiovasculaires (hypertension, hyperlipidémie, tendance thrombogène) fréquemment retrouvés chez le patient diabétique (Capron, 1996).

L'athérosclérose peut donner lieu à des complications, aux conséquences plus graves chez le sujet diabétique. Ainsi, la mortalité d'une personne présentant une athérosclérose avec complications est doublée si celle-ci souffre également de diabète de type 1. La macroangiopathie peut causer des accidents vasculaires cérébraux en touchant les artères cérébrales. Elle est également responsable d'ischémie myocardique, voire d'infarctus du myocarde, lorsqu'elle atteint les coronaires. Enfin, l'atteinte des artères situées au niveau des jambes est à l'origine d'artérite, une inflammation obstructive de la paroi des vaisseaux pouvant conduire à une amputation (Capron, 1996).

En France, la prévalence des complications macrovasculaires chez les diabétiques de type 1 est estimée entre 7 et 10%. Par ailleurs, plus de 77% des patients ont déclaré présenter au moins un facteur de risque cardiovasculaire, et 36% deux facteurs de risque associés (Romon et al., 2008).

3.2.2 *La microangiopathie*

Bien que toutes les cellules soient exposées à l'hyperglycémie induite par le diabète, les lésions microangiopathiques se situent essentiellement au niveau des yeux, des reins et des nerfs. En effet, le captage de glucose dans ces cellules n'étant pas dépendant de l'insuline, la concentration élevée de glucose dans le compartiment sanguin se retrouve dans le secteur intracellulaire, dans des proportions tout aussi élevées. Dans les cellules insulino-sensibles, l'insulinopénie limite l'entrée de glucose et donc l'hyperglycémie cellulaire.

Ces lésions se traduisent par des modifications de la paroi des capillaires, qui devient plus épaisse, plus fragile, et plus perméable, augmentant respectivement les risques d'obstruction et d'ischémie, d'hémorragie, et d'exsudat.

➤ La rétinopathie

La rétinopathie est la première cause de cécité acquise chez les adultes de 20 à 74 ans (ADA, 2011). Il s'agit d'une atteinte de la microcirculation rétinienne, évoluant en différents stades. Tout d'abord non-proliférante, caractérisée par de micro-anévrysmes, de micro-hémorragies, et une dilatation du réseau capillaire, elle évolue en rétinopathie proliférante, allant jusqu'au décollement de rétine et au glaucome (Fong et al., 2004).

➤ La néphropathie

La néphropathie touche environ 40% des personnes diabétiques. Elle résulte d'un épaissement de la membrane glomérulaire associé à une atteinte des artères afférentes, qui vont perturber la fonction de filtration du rein. La néphropathie évolue en différents stades d'albuminurie²⁵ et aboutit à une insuffisance rénale, nécessitant une dialyse ou une transplantation rénale (Gross et al., 2005).

Le diagnostic de néphropathie chez les sujets diabétiques est associé à une augmentation du risque de mortalité, principalement d'origine cardiovasculaire (Valmadrid et al., 2000).

➤ Les neuropathies

Les neuropathies diabétiques peuvent affecter différentes parties du système nerveux, avec des manifestations cliniques très variables. Selon les méthodes d'évaluation utilisées, on estime qu'elles touchent de 20 à 90% des patients diabétiques (Boulton et al., 2005).

La polyneuropathie périphérique touche le système nerveux périphérique, entraînant des troubles de la sensibilité et des douleurs, essentiellement au niveau des membres inférieurs. Le principal risque est l'aggravation de plaies bénignes qui peuvent évoluer en escarres, du fait de l'absence de sensibilité du patient, et donc de la non-prise en charge de ces plaies.

La neuropathie autonome concerne le système nerveux autonome, entraînant des troubles au niveau cardiovasculaire, gastro-intestinal et génito-urinaire (Boulton et al., 2005), et renforçant le risque hypoglycémique en perturbant la réponse sympatho-adrénergique.

4 La prise en charge du diabétique de type 1 : une prise en charge globale

Le principal objectif de la prise en charge du diabétique de type 1 est de normaliser la glycémie, afin d'éviter les complications à court et long terme. La prise en charge de l'insulinorésistance constitue également un objectif thérapeutique (Pang and Narendran, 2008). Plusieurs stratégies peuvent être couplées afin de répondre à ces objectifs : un traitement par insuline exogène est obligatoire, et doit être associé à la pratique d'une activité physique, et/ou à une adaptation de l'alimentation. Ces différentes prises en charge permettent également d'améliorer la qualité de vie des patients diabétiques (meilleure aptitude physique, contrôle du poids...) (Heyman et al., 2007).

²⁵ On différencie micro- et macro-albuminurie, selon que l'excrétion urinaire de protéines est inférieure ou supérieure à 300mg/24h.

4.1 Un seul traitement salvateur : l'insulinothérapie

4.1.1 Principe de l'insulinothérapie

Dans la prise en charge du patient diabétique de type 1, l'objectif principal est de pallier à la carence en insuline pour se rapprocher le plus possible d'un état normoglycémique (Waldhausl, 1986). Pour ce faire, diverses insulines de synthèse ont été mises au point. Celles-ci diffèrent par leur vitesse et leur durée d'action, présentées dans le Tableau 3 (Gulve, 2008).

Classe	Type d'insuline	Délai d'action	Pic d'action	Durée d'action
<i>Analogue rapide</i>	Aspart	5 à 20 min	1 à 3h	3 à 5h
	Lispro	5 à 20 min	1 à 2h	3 à 5h
	Glulisine	10 à 20 min	1 à 1,5h	3 à 5h
<i>Humaine rapide</i>	Regular	30 à 60 min	2 à 4h	4 à 8h
<i>Humaine intermédiaire</i>	NPH	1 à 3h	4 à 10h	10 à 18h
<i>Analogue lente (Ultralente)</i>	Detemir	1 à 2h	Aucun	24h
	Glargine	2 à 4h	Aucun	24h

Tableau 3 : Profils pharmacocinétiques des différentes insulines

Ces insulines de synthèse sont injectées selon un schéma dit "basal/bolus", visant à reproduire la sécrétion physiologique d'insuline : une injection d'insuline lente ou deux injections d'insuline semi-lente, associée(s) à des injections d'insuline rapides ou ultrarapides au moment des prises alimentaires.

Le choix des insulines analogues utilisées, ainsi que du schéma d'injections, doit être réalisé en concertation avec le patient. Il est impératif de limiter les risques liés, d'une part à la persistance d'épisodes hyperglycémiques, d'autre part à la survenue d'hypoglycémies, tout particulièrement la nuit. L'éducation du patient et son implication dans le traitement sont les éléments clés d'une bonne gestion de la glycémie. Celle-ci est attestée par un taux d'hémoglobine glyquée inférieur à 7%.

4.1.2 Quelle efficacité pour l'insulinothérapie?

L'efficacité de l'insulinothérapie sur la prise en charge du diabète (régulation de la glycémie) et la survenue/le développement des complications, a notamment été évaluée lors d'une grande étude de cohorte, la DCCT (encadré 5). Celle-ci a mis en évidence qu'une insulinothérapie intensive permettait de retarder l'apparition des complications diabétiques²⁶, puis de ralentir leur évolution (DCCTRG, 1993)²⁷.

²⁶ néphropathie et rétinopathie

Encadré 5 - Le «Diabetes Control and Complications Trial»

Protocole

Le DCCT est une étude multi-centrique incluant 1441 patients diabétiques de type 1 âgés de 13 à 39 ans sur 29 centres aux Etats Unis et au Canada.

L'Etude s'est déroulée sur 6,5 ans en moyenne de 1983 à 1993, et comparait l'effet d'un traitement intensif vs conventionnel dans deux populations de patients DT1 indemnes ou non de rétinopathie diabétique (notés prévention primaire ou secondaire), sur la survenue de complications microangiopathiques.

	Prévention primaire		Prévention secondaire	
	Traitement Intensif	Traitement Conventionnel	Traitement Intensif	Traitement Conventionnel
Rétinopathie Diabétique	non	non	oui	Oui
Nombre d'injections (par jour)	3 à 4	1 à 2	3 à 4	1 à 2
Auto-Surveillance Glycémique (par jour)	> 2	1	> 2	1
Education en Diabétologie	Poussée	basique	poussée	basique
Consultation avec un diabétologue	Mensuelle	Tous les 3 mois	Mensuelle	Tous les 3 mois

Résultats

Paramètres généraux

DCCT et Hypoglycémie

Le nombre d'hypoglycémies sévères (nécessitant l'intervention d'une tierce personne) est majoré dans le groupe traitement intensif (65%vs 35%).

L'antécédent d'un coma hypoglycémique est plus prédictif d'une récurrence d'hypoglycémie sévère, qu'une valeur basse d'HbA1c.

(Diabetes 46(2):271-86;1997)

DCCT et Poids

Les patients du groupe Traitement intensif présentent une prise de poids supérieure de 4,75kg par rapport aux patients du groupe Traitement conventionnel, ce qui représente une majoration de l'IMC de 1,5 pour les femmes et 1,8 kg/m² pour les hommes.

L'analyse des courbes de poids montrent que c'est la première année du traitement intensif que la prise de poids est la plus importante.

(Diabetes Care 24(10) :1711-21; 2001)

DCCT et Qualité de vie

Toutes les analyses de qualité de vie, réalisées sous forme de questionnaires, ne montrent pas de différences entre le groupe Traitement intensif et le groupe Traitement conventionnel.

(Diabetes Care 19(3):195-203; 1996)

Complications spécifiques

DCCT et Rétinopathie

Diminution du risque de rétinopathie diabétique de 76% en prévention primaire, et de 54% de l'évolution en prévention secondaire, dans le groupe Traitement intensif.

Une diminution de 10% de l'HbA1c (soit un passage de 8% à 7,2%), diminue le risque de rétinopathie diabétique de 43% pour le traitement intensif vs 45% pour le traitement conventionnel.

L'étude du DCCT n'a pas montré de valeur seuil d'HbA1c permettant un risque zéro d'apparition de rétinopathie.

(Diabetes 44:968-983,1995)

DCCT et Néphroathie

Dans le cadre du Traitement intensif, le risque d'apparition d'une microalbuminurie est de 34% en prévention primaire et de 43% en prévention secondaire.

Le risque de macroalbuminurie est, quant à lui, réduit de 54% en prévention secondaire.

(Kidney International 47(6):1703-20,1995)

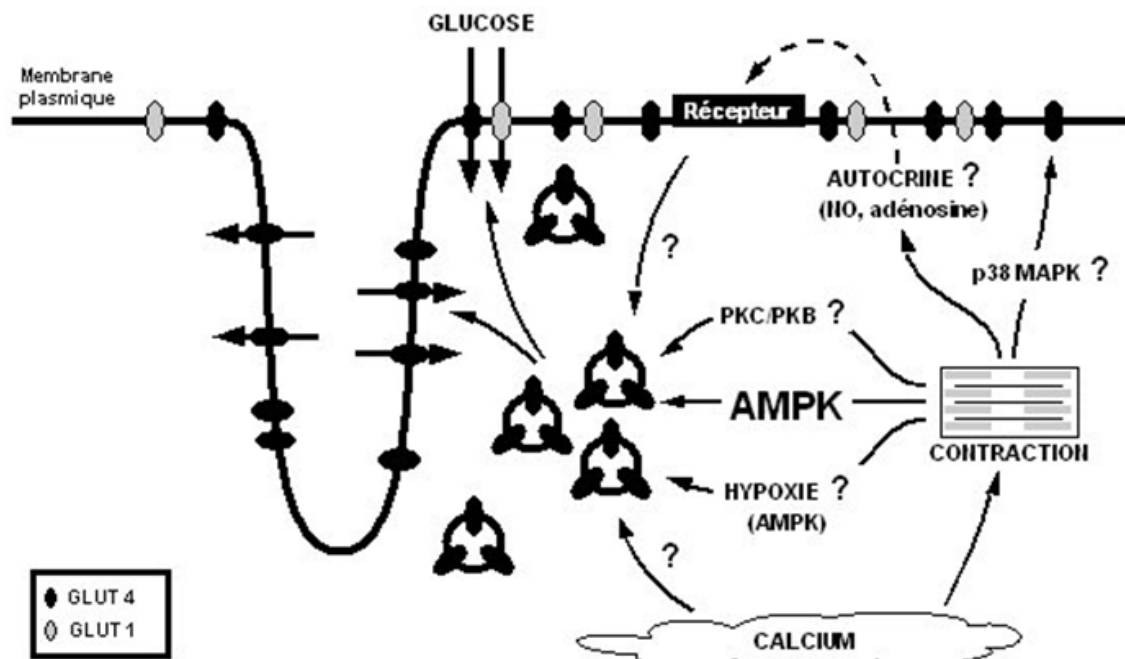
DCCT et Neuropathie

En prévention primaire, le risque de neuropathie est diminué de 69% dans le groupe Traitement intensif, et de 57% en prévention secondaire.

(New England Journal of Medicine 329:977-86,1993)

Encadré 6 - Captage musculaire de glucose stimulé par l'exercice

Depuis quelques années, des progrès considérables ont été réalisés afin de clarifier les mécanismes intracellulaires par lesquels l'exercice ou la contraction musculaire active la captation du glucose et la translocation de GLUT4 dans le muscle squelettique. Il est reconnu que les effets de la contraction musculaire sont tout à fait indépendants de l'action de l'insuline puisque la contraction musculaire de muscles isolés peut stimuler le transport du glucose même en absence d'insuline (Nesher, R, et al. 1985; Ploug, T, et al. 1984; Richter, EA, et al. 1985). Contrairement à l'insuline, il a été rapporté que la PI-3 kinase n'est pas impliquée dans la stimulation du transport du glucose et la translocation de GLUT4 par la contraction musculaire ou par l'exercice. Toutefois, certaines évidences suggèrent que le calcium, les protéines kinases C et B, l'hypoxie, l'adénosine, l'AMPK ainsi que le $^{\circ}\text{NO}$ pourraient intervenir dans le mécanisme d'action liant la contraction musculaire et la captation de glucose.



En plus d'être essentiel au processus contractile, il a été proposé que le calcium libéré par le réticulum sarcoplasmique contribue à l'activation du transport du glucose durant l'exercice (Holloszy, JO, et al. 1986). Le calcium initie ou facilite l'activation des molécules de signalisation impliquées dans la stimulation du transport du glucose par la contraction musculaire, mais ne participe pas de façon directe à cet effet.

Les protéines kinases C (PKC) comptent également parmi les médiateurs intracellulaires sensibles au calcium qui ont été proposés comme jouant un rôle dans l'effet de la contraction sur le transport du glucose, mais les rôles des différents isoformes des PKC ne sont pas clairement définies. La protéine kinase B ou Akt, et plus particulièrement l'Akt 1 interviendrait également dans l'effet de la contraction musculaire sur le transport du glucose.

L'hypoxie constitue un autre facteur pouvant contribuer à l'effet stimulateur de la contraction musculaire sur le transport du glucose. En effet, la disponibilité réduite de l'oxygène lors d'un exercice intense peut conduire au recrutement de différentes voies de signalisation pour activer le transport du glucose, notamment une voie dépendante de l'activation de l'AMPK.

Dans la littérature, il a été décrit qu'en absence d'insuline, l'adénosine produite durant la contraction musculaire pourrait contribuer, par un mécanisme autocrine ou en augmentant le flot sanguin, à l'activation du transport du glucose observée dans le muscle squelettique.

Les protéines MAPK (mitogen-activated protein kinase) sont des enzymes qui ont été proposées comme étant impliquées dans les mécanismes adaptatifs de plusieurs types cellulaires en réponse aux stress, comme ceux qui surviennent dans le muscle squelettique durant l'exercice. Cette famille d'enzymes est impliquée dans trois principales voies de signalisation : la voie ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases), la voie p38 MAPK et la voie JNK (c-jun NH2 terminal kinases). Les MAP kinases ERK1/2 et JNK ne sont pas impliquées dans l'effet stimulateur de la contraction musculaire sur le transport du glucose mais interviennent plutôt dans la régulation des mécanismes adaptatifs à l'exercice, notamment sur la transcription de certains gènes.

4.1.3 Des nouveautés thérapeutiques

La dernière génération d'insuline mise au point est l'insuline glargine. Elle propose de pallier aux principaux inconvénients de l'insuline NPH²⁸, à savoir (Barnett, 2003) :

- une variabilité inter- et intra-individuelle très élevée, liée à l'utilisation d'une suspension pas toujours homogène lors de l'injection,
- la présence d'un pic d'action de l'insuline dans les heures qui suivent l'injection, pouvant conduire à une hypoglycémie, et notamment une hypoglycémie nocturne si l'injection est réalisée au coucher.

L'insuline glargine se présente donc sous forme d'une solution, garantissant un produit homogène, à administrer en une seule injection par 24 heures (contre deux pour les insulines NPH). Elle assure une concentration plasmatique en insuline stable pendant une durée de 20 à 30 heures, sans pic d'action (Ashwell and Home, 2001). En pratique clinique, l'insuline glargine est associée à un contrôle glycémique au moins équivalent, si ce n'est supérieur, aux insulines basales traditionnelles, et à un risque moindre d'hypoglycémie diurne et nocturne (Barnett, 2006).

4.2 L'activité physique : essentielle et pourtant difficile à mettre en place

Historiquement, l'activité physique a toujours fait partie de la prise en charge des patients diabétiques. Dès l'Antiquité, les médecins grecs avaient constaté de manière empirique que l'exercice permettait à ces personnes "traversées par l'eau"²⁹ de voir leurs symptômes s'améliorer (l'issue de cette maladie est à cette époque fatale à court terme). Ces constatations ont par la suite été confirmées, notamment au 19^{ème} siècle par Apollinaire Bouchardat, pharmacien et nutritionniste, considéré comme le père de la diabétologie (Chast, 2000).

Mais suite à la découverte de l'insuline et à la généralisation de l'insulinothérapie, l'exercice a progressivement été délaissé, allant même jusqu'à être proscrit par certains médecins, par crainte d'hypoglycémie ou d'aggravation des complications (Horton, 1988). Les interactions entre ces deux prises en charge sont en effet complexes, et ont nécessité de nombreux travaux scientifiques afin d'être mieux comprises.

Aujourd'hui, l'activité physique fait à nouveau partie intégrante de la prise en charge des patients diabétiques. Elle présente, en effet, l'avantage unique d'exercer un effet dit "insulin-like": l'exercice permet, tout comme l'insuline, l'entrée du glucose dans les cellules, mais par des mécanismes différents ne nécessitant pas la présence de celle-ci (Hayashi et al., 1997) (encadré 6). A ce titre, elle contribue à une

²⁷ DCCTRG : The Diabetes Control and Complications Trial Research Group

²⁸ L'insuline de type NPH est la principale utilisée dans la prise en charge du diabète de type 1, sous forme de deux injections quotidiennes.

²⁹ Ce qualificatif provient du fait que les malades buvaient continuellement, et urinaient tout autant, semblant ne pouvoir retenir aucun des liquides ingérés.

meilleure régulation de la glycémie, et permet, de plus, une amélioration de l'insulinosensibilité (Holloszy, 2005). Elle augmente également l'aptitude physique des sujets DT1, améliore leur profil lipidique et permet un maintien du poids corporel. A long terme, l'activité physique est corrélée positivement à un meilleur contrôle glycémique (Valerio et al., 2007) et diminue même la mortalité. Une étude de cohorte réalisée auprès de patients diabétiques de type 1 a ainsi montré une diminution de 50 % de la mortalité sur 7 ans chez les sujets dont la dépense énergétique hebdomadaire était d'au moins 2000 kcal (équivalent à au moins 7 heures de marche rapide), comparés à ceux ayant une dépense inférieure à 1000 kcal (Moy et al., 1993).

4.2.1 Des risques à connaître, des précautions à prendre

Dès lors que les patients diabétiques ne présentent pas de complications et ont un contrôle glycémique correct, tous les types d'activités physiques leur sont permis. Il convient néanmoins de respecter un ensemble de bonnes pratiques (Tableau 4), regroupées dans une Prise de Position de l'American Diabetes Association (ADA), qui recommande notamment un examen médical approfondi avant d'entreprendre un programme d'activité physique, ainsi qu'un ajustement strict de l'insulinothérapie et de l'alimentation (Zinman et al., 2004).

Les 10 commandements du sujet diabétique traité à l'insuline "physiquement actif"
1. Injection d'insuline rapide ou intermédiaire en sous-cutané dans la zone abdominale
2. Diminution de 10 à 40% de la dose d'insuline avant l'exercice, selon la durée et l'intensité de l'effort
3. Planification des efforts 3 à 4 heures après l'injection d'insuline intermédiaire ou 2 heures après l'injection d'insuline rapide
4. Vérification de la glycémie avant le début de l'activité
5. Ingestion de 20 à 60 grammes de glucides simples si la glycémie est inférieure à 120mg/dL avant le début de l'activité
6. Différer l'activité si la glycémie est inférieure à 80 mg/dL avant le début de l'activité
7. Différer l'activité si la glycémie est supérieure à 250 mg/dL avant le début de l'activité
8. Ingérer 20 à 60 grammes de glucides simples toutes les 30 minutes, dans le cadre d'un effort modéré à intense (60 à 75% de FC max ³⁰)
9. Vérifier la glycémie au bout de 30 minutes d'exercice
10. Après l'exercice, diminuer de 10 à 30% la dose d'insuline rapide ou intermédiaire en préprandial

Tableau 4 : Règles à respecter pour la pratique d'une activité physique par un sujet traité à l'insuline (De Feo et al., 2006)

³⁰ Fréquence Cardiaque maximale

4.2.1.1 *Le risque d'hypoglycémie*

L'exercice aigu chez le diabétique de type 1 peut entraîner des risques hypoglycémiques, s'il n'est pas réalisé dans de bonnes conditions.

En effet, l'insuline circulante étant d'origine exogène, sa production ne peut être inhibée lors de l'exercice, contrairement à ce qui se passe chez le sujet sain. L'insuline va donc bloquer la production hépatique de glucose qui survient normalement à l'exercice, alors que dans le même temps, le captage musculaire de glucose va augmenter. Il en résulte une baisse progressive de la glycémie pouvant aller jusqu'à l'hypoglycémie. De plus, si l'injection d'insuline a été réalisée dans un territoire musculaire actif, son absorption au niveau du site d'injection va également être plus importante (Koivisto et al., 1984), en raison de l'augmentation de la vascularisation périphérique lors de l'exercice.

Par ailleurs, la consommation élevée de glucose par les territoires musculaires se poursuit plusieurs heures après l'exercice, afin de reconstituer les stocks de glycogène. Si le sujet diabétique présente un bon contrôle glycémique, avec des valeurs proches de la normale, ces dernières vont chuter jusqu'à l'hypoglycémie, qui surviendra cette fois à distance de l'exercice (Steppel and Horton, 2003).

C'est pourquoi, les injections d'insuline doivent nécessairement être adaptées pour éviter cet état hypoglycémique susceptible d'intervenir pendant et après l'exercice: site des injections d'insuline à distance des territoires musculaires sollicités, ainsi que diminution de la dose injectée en fonction du sujet et du type d'exercice réalisé (Zinman et al., 2004; De Feo et al., 2006). De plus, la prise de suppléments glucidiques doit être envisagée, dès lors que la diminution de la dose d'insuline n'a pas été anticipée ou que la glycémie pré-exercice est faible, voire en systématique pour des efforts d'intensité élevée.

4.2.1.2 *Le risque d'hyperglycémie*

A l'inverse, la réalisation d'un exercice d'intensité élevée stimule la sécrétion de catécholamines et d'hormones de la contre-régulation, qui accélèrent la production hépatique de glucose (Kjaer et al., 1993), et élèvent ainsi la glycémie. Chez le sujet sain, à l'exercice, la glycémie reste constante, la production hépatique de glucose s'adaptant au captage musculaire de glucose (le CMG est augmenté à l'exercice, malgré la baisse de l'insulinémie, en raison d'une amélioration de la sensibilité musculaire à l'insuline et de l'effet insulin-like de la contraction musculaire). Mais chez le diabétique, lorsqu'un tel exercice est réalisé dans des conditions d'hypoinsulinémie, l'augmentation de la glycogénolyse hépatique n'est pas compensée par une augmentation suffisante du captage musculaire en glucose (l'effet insulin like de l'exercice ne compensant pas la faible concentration d'insuline), ce qui peut faire craindre une hyperglycémie (Mitchell et al., 1988).

De plus, l'hypoinsulinémie va favoriser la production de corps cétoniques lors de l'exercice physique, en limitant le captage musculaire de glucose, et en favorisant la lipolyse et la cétogenèse (Hagenfeldt, 1979).

Il est donc primordial pour les diabétiques souhaitant pratiquer une activité physique de s'assurer d'une insulinémie suffisante (évaluée par une glycémie proche des valeurs normales).

4.2.2 Comment améliorer la glycémie par un exercice physique?

Les effets de l'exercice aigu sur la glycémie et son contrôle ont été largement étudiés (Vergano et al., 2010). Il semble que les bénéfices sur la glycémie dépendent largement de la qualité du contrôle glycémique pré-exercice, ainsi que du type d'exercice réalisé (durée et intensité). Ainsi, un exercice modéré (contrôlé par une fréquence cardiaque constante de 110 bpm) et prolongé (180 minutes) réalisé chez le sujet diabétique avec une glycémie de pré-exercice correcte permet une baisse de la glycémie, alors que chez le même sujet présentant dès le départ une hyperglycémie associée à une acidocétose, l'hyperglycémie va au contraire être renforcée (Figure 14) (Berger et al., 1977). Ce paradoxe résulte de la mise en jeu des mécanismes présentés ci-dessus, lorsque l'hypoinsulinémie est un facteur de risque pour l'hyperglycémie à l'exercice. De même, un exercice de haute intensité et continu engendre une hyperglycémie persistante, alors qu'un exercice intense mais bref va faire baisser la glycémie (Harmer et al., 2007).

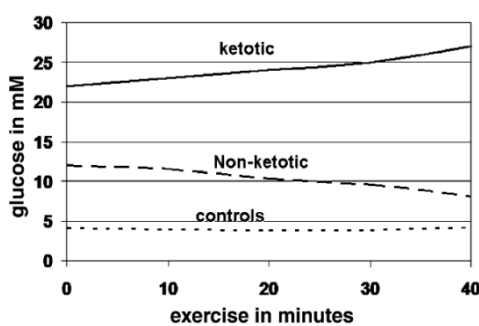


Figure 14 : Influence du contrôle glycémique pré-exercice sur l'évolution de la glycémie pendant un exercice sous-maximal (d'après Vergano, 2010)

Lorsqu'un exercice adéquat est réalisé dans des conditions correctes de glycémie et d'insulinémie, il semble que les bénéfices sur la glycémie soient clairement établis. Laaksonen et al. (1996) et Atalay et al. (1997), ont ainsi montré que la glycémie de sujets diabétiques de type 1 passait de 10 mmol/L à 8 mmol/L suite à un exercice de 40 minutes à 60% de sur bicyclette ergométrique. Davison et al. (2002) ont également noté une baisse de la glycémie chez des patients diabétiques, après qu'ils aient réalisé un exercice triangulaire maximal sur ergocycle. L'enchaînement d'exercices sous-maximaux sur tapis roulant (quatre sessions de 15 minutes, avec cinq minutes de récupération, à une fréquence cardiaque de 140 bpm) permet lui aussi de faire baisser la glycémie chez des adolescents diabétiques de type 1. Toutefois, une hypoglycémie peut survenir si la glycémie de départ est trop faible³¹, et elle n'est que difficilement corrigée par un apport de glucose alimentaire (Tansey et al., 2006). La prise de 15 grammes de glucose permet en moyenne d'augmenter la glycémie de 56 à 77 mg/dL (de 3,08 à 4,23 mmol/L), soit juste au-dessus du seuil hypoglycémique (70 mg/dL - 3,85 mmol/L), et un tiers des sujets a

³¹ L'exercice n'est débuté que si la glycémie est supérieure à 80 mg/dL

dû consommer une seconde ration glucidique pour normaliser sa glycémie. Ce résultat met bien en évidence la nécessité d'un contrôle glycémique pré-exercice strict, afin de pouvoir profiter des bénéfices de l'exercice.

Plus récemment, des études se sont intéressées à la réalisation d'exercices intermittents de haute intensité³², fréquemment rencontrés dans la pratique de sports collectifs, par exemple. Si une baisse de la glycémie est également retrouvée suite à ce type d'exercice (- 2,9 mmol/L après 30 minutes d'exercice à 40% de $\dot{V}O_2$ représentant un léger footing, entrecoupé de sprints maximaux de 4 secondes toutes les 2 minutes), elle est toutefois moins importante que lorsque les mêmes sujets réalisent un exercice continu d'intensité modérée (- 4,4 mmol/L après un exercice similaire de 30 minutes sans sprints) (Guelfi et al., 2005; Guelfi et al., 2007). Ces études ont par ailleurs permis d'écarter le risque d'hypoglycémie post-exercice lié à la pratique d'HIE (Guelfi et al., 2005). Iscoe et Riddell (2011) ont même démontré que, chez des sujets entraînés, les hypoglycémies post-exercice sont moins importantes lorsque des exercices d'intensité élevée sont associés à des exercices d'intensité modérée (comparativement à la réalisation d'exercices d'intensité modérée seuls). Dans le même sens, Bussau et al (2006, 2007) ont montré que la réalisation d'un sprint maximal de 10 secondes à la fin d'une session d'exercices à intensité modérée permettait de réduire le risque d'hypoglycémie post-exercice. Si les bénéfices de l'exercice intermittent de haute intensité sont bien démontrés, il convient néanmoins d'être prudent lors de la phase de récupération. En effet, une mesure du glucose en continu, jusque 20 heures après la session d'exercice, a permis de mettre en évidence une baisse de la glycémie plus importante (avec possibilité d'hypoglycémie nocturne) chez des sujets non-entraînés ayant réalisé un exercice de haute intensité, comparés à des sujets ayant réalisé un exercice d'intensité modéré (Maran et al., 2010).

L'amélioration de la glycémie par l'exercice physique nécessite donc encore des investigations, afin de déterminer les modalités d'exercice les plus bénéfiques et les plus sûres pour les sujets diabétiques. S'il est bien démontré qu'un exercice modéré et prolongé est le plus efficace pour diminuer la glycémie (à condition que le contrôle glycémique pré-exercice soit correct), des exercices intermittents et/ou de haute intensité semblent également intéressants. De plus, ces derniers présentent l'avantage d'être ludiques pour le sujet et de se rapprocher des activités de la vie quotidienne.

³² High-intensity Intermittent Exercise (HIE) en anglais

4.2.3 Retrouver les bénéfices d'un exercice isolé dans le cadre d'un entraînement : des difficultés inattendues

Les effets de l'exercice chronique, le plus souvent un entraînement de type aérobie, sur le contrôle glycémique, ont été largement étudiés dans le DT1.

Chez des rats rendus diabétiques par streptozotocine, les études s'intéressant aux effets d'un entraînement sont unanimes, rapportant une baisse de la glycémie, quelle que soit la durée de l'entraînement. Ainsi, Kutlu et al. (2005) trouvent une diminution de la glycémie dès 3 semaines d'un entraînement modéré, à raison de 5 séances par semaine. Les travaux de Gul et al. (2002; 2003) montrent que cette diminution peut aller jusqu'à 18% après 8 semaines d'entraînement, et est associée à une amélioration de la capacité aérobie³³. Enfin, il a été montré que la baisse de la glycémie à la fin d'un entraînement de nage de 12 semaines était d'autant plus importante que le volume d'entraînement avait été important : pour des séances de 5, 10 ou 15 minutes par jour, la glycémie était respectivement de 232, 203, et 192 mg/dL, contre 322 mg/dL chez des animaux diabétiques non-entraînés (Coskun et al., 2004).

Chez l'Homme, par contre, les résultats sont beaucoup plus divergents, malgré l'efficacité des entraînements proposés sur l'amélioration des qualités physiques³⁴.

Plusieurs études ont conclu à une absence totale d'effets de l'entraînement sur la régulation de la glycémie (Wallberg-Henriksson et al., 1984; Wallberg-Henriksson et al., 1986; Laaksonen et al., 2000), et ce quelque soit le contrôle glycémique -correct ou non- au début de l'entraînement (Roberts et al., 2002). De plus, une méta-analyse sur les programmes d'interventions en activité physique proposés aux patients diabétiques, fait ressortir que la valeur médiane de l'HbA1c dans les groupes pris en charge est de 7,5% au début de l'entraînement, et reste inchangée à la fin de ce dernier. Les caractéristiques générales des entraînements proposés sont des séances d'environ 60 minutes, 3 fois par semaine, sur des périodes d'au moins 12 semaines (Nielsen et al., 2006). Enfin, une étude rétrospective par questionnaire, portant sur plus de 220 sujets de 18 à 45 ans, n'a pas mis en évidence de corrélation entre le niveau d'activité physique sur le long terme et le contrôle glycémique évalué par l'HbA1c (Ligtenberg et al., 1999).

A l'inverse, d'autres études ont mis en évidence une amélioration globale du contrôle glycémique grâce à l'activité physique. Marrero et al. (1988) et Mosher et al. (1998) rapportent une baisse de l'HbA1c chez des adolescentes DT1, suite à un programme d'entraînement de 12 semaines, à raison de 3 séances/semaine (programme basé sur des exercices de fitness motivants, à réaliser à la maison, ou sur du circuit-training). Des résultats similaires sont rapportés par Durak et al. (1990) suite à un entraînement de 10 semaines en musculation et par Salem et al. (2010), suite à un entraînement varié de 6 mois³⁵.

³³Augmentation de 46% du temps de course lors d'un exercice épuisant sur tapis roulant

³⁴ Les différentes études citées rapportent une amélioration de _____ de 6 à 20%, et une augmentation de la force développée de 15 à 90% selon les mouvements réalisés.

³⁵ Une à trois séances par semaines, composées d'exercices aérobie, de force, de coordination, et d'exercices brefs et intenses.

Quelque soit le cadre de la pratique (volontaire ou encadrée), la diminution de l'HbA1c est d'autant plus marquée que le volume hebdomadaire de pratique sportive est important (Bernardini et al., 2004; Salem et al., 2010). Les sujets pratiquant moins de 60 minutes par semaine ont ainsi un taux d'HbA1c supérieur à ceux pratiquant de 120 à 360 minutes d'activité physique par semaine ($8,9 \pm 0,5\%$ vs $8,3 \pm 0,4\%$, $p=0,002$). Les sujets pratiquant un sport en compétition ont également une concentration d'HbA1c inférieure ($7,39 \pm 0,6\%$) lorsqu'ils sont comparés aux autres sujets de l'étude. Cette corrélation inverse entre la quantité d'activité physique et l'HbA1c a été retrouvée dans une étude épidémiologique de grande ampleur, portant sur près de 20 000 enfants de 3 à 20 ans (Herbst et al., 2006).

Toutefois, la grande majorité des études présentent des résultats mitigés, avec souvent une amélioration de la sensibilité à l'insuline, et donc une réduction des doses injectées, sans amélioration de l'hémoglobine glyquée (Wallberg-Henriksson et al., 1982; Yki-Jarvinen et al., 1984; Landt et al., 1985; Ramalho et al., 2006). L'une des hypothèses avancées par Zinman et al. (1984), qui notent une baisse de la glycémie suite à chaque exercice sans amélioration de l'HbA1c à la fin de l'entraînement, est l'augmentation concomitante de la ration calorique les jours d'entraînement, ce qui contrecarre les effets de l'exercice à long terme. De plus, l'adhésion des sujets au programme d'entraînement (motivation et assiduité) sont des éléments clés dans l'interprétation des résultats observés lors des études longitudinales. En effet, un entraînement de trois mois n'entraîne pas de modification du niveau d'HbA1c sur l'ensemble des sujets de l'étude. En revanche, en ne sélectionnant que les sujets ayant participé à plus de onze séances sur les treize proposées, on observe une diminution significative de l'HbA1c après l'entraînement (Huttunen et al., 1989).

Selon Wasserman, il faut donc que l'entraînement soit associé à une insulinothérapie parfaitement adaptée et à des mesures diététiques pour aboutir une amélioration du contrôle glycémique qui se traduirait par une diminution de l'HbA1c (Wasserman and Zinman, 1994).

Depuis quelques années, un autre type d'entraînement s'est développé, basé sur des exercices intermittents plutôt que continus. Si l'efficacité de cette modalité d'exercice est attestée dans le diabète de type 2 et le syndrome métabolique, il n'existe à notre connaissance que deux études qui ont exploré les effets d'un tel entraînement chez des diabétiques de type 1 (Harmer et al., 2007; Harmer et al., 2008). Elles ont permis de démontrer qu'un entraînement de 7 semaines, basé sur la répétition d'exercices intermittents de haute intensité, permet d'une part une meilleure régulation de la glycémie lors de l'exercice³⁶, et d'autre part s'accompagne d'une amélioration des capacités oxydatives du muscle similaire à celle observée pour un entraînement aérobie. Bien que les sujets ne présentaient pas d'amélioration de l'HbA1c à l'issue de l'étude, ces premiers résultats sont prometteurs et devraient ouvrir la voie à de nouvelles études sur ce sujet.

³⁶ L'augmentation de glycémie observée chez tous les sujets (sains ou diabétiques) lors de la réalisation d'un exercice intense (4 sprints maximaux de 30 secondes sur bicyclette ergométrique) est limitée après l'entraînement.

En résumé, la mise en place d'un programme d'entraînement chez l'animal diabétique, non traité à l'insuline, est efficace pour améliorer la régulation de la glycémie. Chez l'Homme, traité à l'insuline, les effets bénéfiques d'une activité physique régulière sur le contrôle métabolique dépendent de nombreux paramètres : la nature des exercices proposés, l'adhésion des sujets au programme d'entraînement, ou encore les modifications spontanées de l'alimentation induites par l'entraînement. Ainsi, l'entraînement exerce pleinement ses effets bénéfiques lorsque les sujets réalisent régulièrement des exercices adaptés, avec une glycémie préexercice correcte, sans pour autant modifier leur régime alimentaire.

4.3 L'alimentation : la "thérapie nutritionnelle médicale"

L'éducation à la nutrition fait partie intégrante de la prise en charge du patient diabétique, et est désignée par l'ADA sous le terme de "thérapie nutritionnelle médicale"³⁷. Son objectif est d'une part, de contribuer à une meilleure régulation de la glycémie, et d'autre part de prévenir, ou tout au moins de ralentir, le taux de développement des complications diabétiques (Bantle et al., 2006).

Dans le cadre du diabète de type 1, il s'agit avant tout de contrôler les apports glucidiques, essentiellement en quantité, mais également en qualité, notamment en prenant en compte l'index glycémique des produits consommés. Le but est d'adapter au mieux les injections d'insuline (dose, type d'insuline et moment d'injection), pour éviter les fluctuations importantes de la glycémie (ADA, 2011). L'importance du contrôle de l'index glycémique est sujette à controverse : l'ADA considère qu'un régime à faible index glycémique n'apporte que des bénéfices modestes par rapport au contrôle de la quantité totale de glucides ingérée. Toutefois, une méta-analyse récente a mis en évidence qu'un régime à faible index glycémique, d'une durée minimum de 4 semaines, permettait de diminuer l'HbA1c et/ou la fructosamine jusqu'à 4%, ce qui est cliniquement significatif³⁸. Les auteurs recommandent donc d'ajouter ce paramètre à la prise en charge nutritionnelle des patients diabétiques (Thomas and Elliott, 2010).

Il a été démontré au cours de l'étude DCCT sur le contrôle du diabète et de ses complications que le respect de la thérapie nutritionnelle médicale permettait de mieux réguler la glycémie, avec un taux d'hémoglobine glyquée significativement plus faible chez les patients suivant un régime alimentaire et insulinique strict (Delahanty and Halford, 1993). Cette amélioration est d'autant plus importante que le suivi nutritionnel est assuré par une diététicienne spécialisée dans la prise en charge des patients diabétiques (Franz et al., 2002). Par ailleurs, une relation entre la consommation de protéines et de lipides, et la survenue/le développement de complications diabétiques (néphropathies) a été mise en évidence (Toeller et al., 1997; Cardenas et al., 2004). Au delà du contrôle des apports glucidiques, il est donc conseillé aux sujets diabétiques de surveiller leurs apports lipidiques et protéiques, en évitant les acides gras saturés au profit des acides gras poly-insaturés, et en régulant les apports protéiques (Mello et al., 2005) : baisse de la quantité totale de protéines ingérées, ou modification des sources de protéines.

³⁷ ou MNT, Medical Nutritionnal Therapy

³⁸ Réduction des risques de complications associées au diabète

Complications et prise en charge du diabète de type 1

Le diabète de type 1, pathologie en constante augmentation, est associé à long terme à de nombreuses complications qui altèrent la qualité et l'espérance de vie des patients. L'objectif principal de la prise en charge est la régulation de la glycémie, ce qui passe nécessairement par des injections d'insuline. Malgré le développement d'insuline nouvelle génération, à l'action constante et prolongée, cette thérapie est insuffisante pour atteindre un contrôle glycémique parfait, et doit être couplée à des prises en charges additionnelles.

Parmi celles-ci, l'activité physique occupe une place de choix. La réalisation d'un exercice adapté permet en effet de diminuer la glycémie, et la répétition d'exercices au cours d'un entraînement bien conduit est associé à un meilleur contrôle métabolique. Une prise en charge nutritionnelle, visant à optimiser les apports alimentaires, permet également d'améliorer ce dernier paramètre.

Malgré ces diverses interventions, la persistance d'épisodes hyperglycémiques est à l'origine de complications, via un mécanisme central que nous allons à présent étudier: le stress oxydant.

Chapitre 2 : Le Stress Oxydant: cause ou conséquence du diabète?

Si l'interrelation entre le diabète et le stress oxydant ne fait aujourd'hui plus de doute, la chronologie des événements reste sujette à controverse : le stress oxydant est-il impliqué dans le développement du diabète (ou même précéderait-il la survenue du diabète), ou apparaît-il plus tardivement, résultant de l'hyperglycémie persistante, et responsable des complications à long terme? (Rosen et al., 2001)

Avant de tenter de répondre à cette question, nous allons revenir brièvement sur la notion de stress oxydant, phénomène majeur en physiologie, dont la définition même est sans cesse remaniée au fil des récentes découvertes scientifiques.

1 Le Stress Oxydant : un concept en perpétuelle évolution

Le Stress Oxydant (SO) est actuellement défini comme "un déséquilibre de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers, conduisant à une perturbation du contrôle et de la signalisation redox des cellules et/ou à des dommages moléculaires" (Sies and Jones, 2007).

Le système prooxydant comprend les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN). Celles-ci sont composées en grande partie de radicaux libres (RL³⁹), et de molécules non-radicalaires mais néanmoins oxydantes, qui comme les RL sont hautement réactives (Tableau 5). Une augmentation de la présence des ERO et ERN est le résultat d'une augmentation de leur production et/ou d'une diminution du système antioxydant chargé de les neutraliser.

³⁹Les RL sont des atomes ou groupement d'atomes porteur d'électrons libres non appariés au niveau de leur orbitale externe (Halliwell et Gutteridge, 1989). Les RL sont des composés très instables et très réactifs car pour réappairer leurs électrons célibataires, ils attaquent les molécules avoisinantes, créant ainsi la formation de nouveaux RL qui partent à leur tour en chasse, générant des réactions radicalaires en chaîne menaçant l'intégrité de l'organisme.

Espèces réactives	Symbole	Demi-vie (sec)	Réactivité/Remarques
Espèces Réactives dérivées de l'Oxygène (ERO)			
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$	10^{-6}	Produit notamment dans les mitochondries et le système cardiovasculaire
Radical hydroxyle	$^{\circ}OH$	10^{-9}	Très réactif, produit lors d'une surcharge en fer ou dans des conditions similaires pour l'organisme
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	stable	Formé par de nombreuses réactions, il conduit à des ERO puissants comme le radical hydroxyle
Radical peroxyde	ROO°	stable	Formé à partir des lipides, des protéines, de l'ADN, des sucres ... lors des dommages oxydatifs
Hydroperoxyde	$ROOH$	stable	Réagit avec les métaux de transition pour conduire à des espèces réactives
Oxygène singulet	1O_2	10^{-6}	Très réactif. Formé par la photosensibilisation et des réactions chimiques
Ozone	O_3	stable	Présent comme polluant atmosphérique, il peut réagir avec divers composés, conduisant à l'oxygène singulet.
Espèces Réactives dérivées de l'Azote (ERN)			
Oxyde nitrique	$^{\circ}NO$	Stable	Neurotransmetteur et régulateur de la pression sanguine, il peut conduire à de puissants oxydants dans les situations pathologiques.
Peroxynitrite	$ONOO^{\cdot-}$	10^{-3}	Très réactif, formé à partir de l'anion superoxyde et de l'oxyde nitrique.
Acide peroxynitreux	$ONOOH$	Assez stable	Forme protonée du peroxynitrite
Dioxyde de nitrogène	NO_2	stable	Formé par la pollution atmosphérique

Tableau 5 : Principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote avec leurs caractéristiques (d'après Devasagayam et al., 2004)

Les ERO et ERN peuvent être, soit de source exogène, soit de source endogène. Les sources exogènes (non détaillées dans cette thèse) sont surtout d'origines physique et chimique (par exemple les radiations X ou gamma, les UV [315-400 nm], la radiolyse de l'eau, les réactions photochimiques ...). Concernant les origines endogènes, le principal précurseur des ERO et ERN, l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$), provient de différentes sources cellulaires (Figure 15).

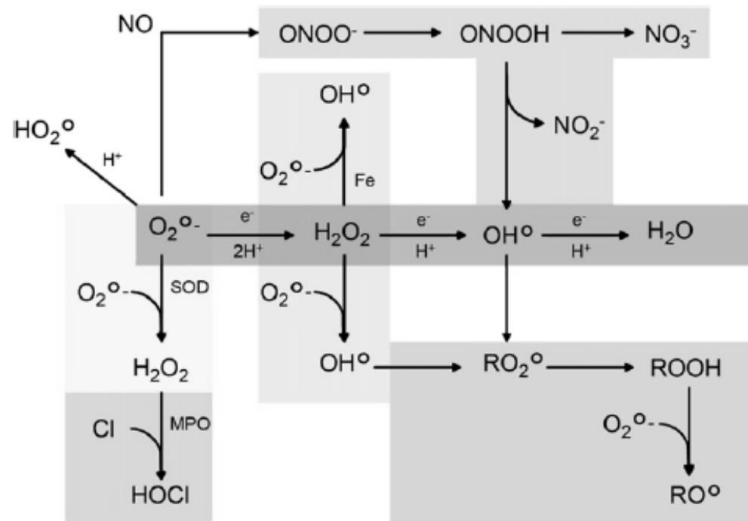


Figure 15 : Formation en cascade des différentes espèces oxygénées réactives à partir du radical superoxyde (Koechlin-Ramonatxo, 2006)

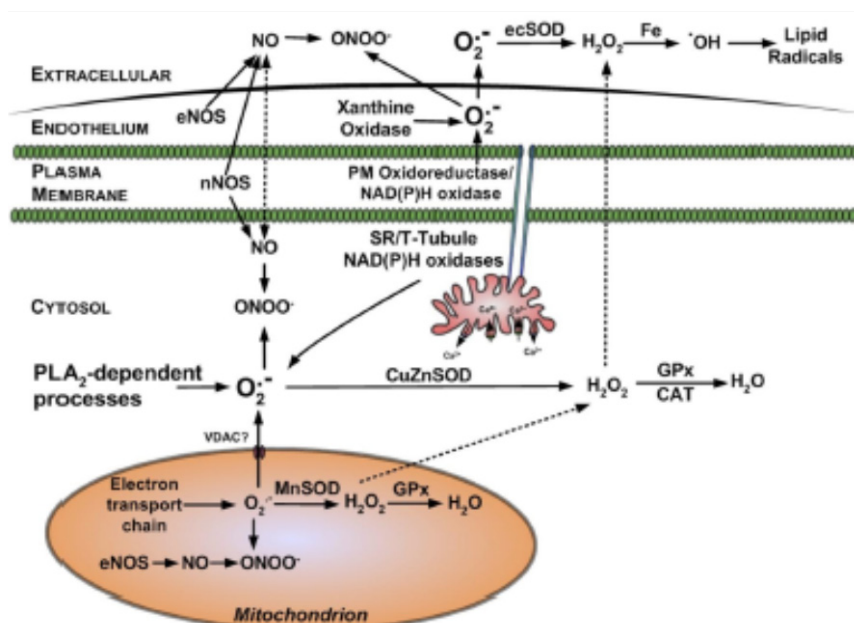
Ces principales sources sont la mitochondrie (chaîne de transport des électrons), et différentes enzymes comme la NADPH-oxydase (NADPHox ou NOX), la xanthine oxydase (XO), les NO-synthases (NOS), la cyclo-oxygénase et les lipoxygénases, ainsi que les enzymes du réticulum endoplasmique (cytochrome P450) (Cai and Harrison, 2000). Leur ordre d'importance varie selon le tissu étudié et les conditions physiologiques ou pathologiques (encadré 7).

De part leur nature instable, les ERO et ERN en excès interagissent avec des molécules cibles comme les protéines, les lipides et l'ADN, et génèrent des dommages oxydatifs importants pouvant menacer l'intégrité de l'organisme (encadré 8). Elles peuvent ainsi oxyder les bases azotées et avoir un effet mutagène ce qui peut, par exemple, conduire à l'arrêt de la réplication de l'ADN (Packer, 1997). Elles sont également susceptibles d'endommager les protéines, de les fragmenter, ou d'altérer les acides aminés les constituant (Gutteridge and Halliwell, 1989). Ces dommages peuvent entraîner une inactivation des protéines. Enfin, elles peuvent oxyder les lipides (situés en grande quantité dans les membranes), selon un processus complexe nommé peroxydation lipidique. Ce phénomène se propage le long des membranes avec pour conséquence la fuite de composés intracellulaires à l'extérieur de la cellule par altération de la membrane plasmique. Plus le déséquilibre de la balance pro/antioxydante est important (c'est à dire plus l'intensité du SO est grande), plus les dégâts cellulaires et leurs conséquences sur le plan fonctionnel seront importants, pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire.

Encadré 7 - Les sources d'Espèces Réactives (ERO/ERN)

Les principales ERO et ERN générées par le muscle squelettique sont respectivement l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le NO^{\cdot} .

Sites de production de l'anion superoxyde et de l'oxyde nitrique dans le muscle squelettique (Powers and Jackson, 2008)



Même si depuis plus d'une dizaine d'années, le rôle prépondérant des NO synthases a été rapporté par de nombreuses études (Stamler et al. 2001), la source la plus citée reste la mitochondrie (Halliwell et Gutteridge, 1989). De plus, les auteurs réitèrent les chiffres des premières études et continuent de rapporter que 2 à 5 % de la quantité totale d'oxygène consommé par les mitochondries peuvent subir une réduction univalente conduisant à la formation de l' $O_2^{\cdot-}$ (Loschen et al., 1974). Or, depuis 2001, l'équipe de Brand a réévalué le taux de production d'ERO par les mitochondries et l'estime au mieux à 0,15% du flux total d'électron (St Pierre et al., 2002). D'autres systèmes enzymatiques interviennent dans la production d'ERO. Les principaux sont la NO synthase, la xanthine oxydase, la NADPH oxydase.

D'autres enzymes mineures interviennent également comme les enzymes de la voie de l'acide arachidonique (cyclooxygénases et lipoxygénases), les enzymes de la famille du cytochrome P450 et les enzymes contenues dans les peroxysomes.

Les NO synthases (NOS)

C'est une famille d'enzymes capables d'oxyder une des bases azotées de l'arginine pour former du NO^{\cdot} et de la L-citrulline. Plusieurs isoenzymes issues de gènes distincts ont été identifiées. Leurs principales différences portent sur leur localisation, leur synthèse constitutive (NOS endothéliale ou eNOS ou NOS-3 et NOS neuronale ou nNOS ou NOS-1) ou inducible (iNOS), leurs propriétés catalytiques et leur mode de régulation.

La xanthine oxydase (XO)

Il s'agit d'une enzyme à molybdène intervenant dans le métabolisme des purines. Comme son nom l'indique, la xanthine oxydase (XO) catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique. Cette réaction peut être assurée par aussi bien par la xanthine déshydrogénase (XDH) que la XO, toutefois cette dernière a la particularité d'utiliser l'oxygène comme donneur accepteur d'électrons, générant ainsi de l'anion superoxyde puis du H_2O_2 , contrairement à la XDH dont l'accepteur

La NADPH-oxydase (NOX)

C'est une enzyme membranaire qui catalyse la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire en anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) par transfert d'un électron du NADPH sur l'oxygène. Le terme de NOX regroupe en réalité de nombreux isoformes, parmi lesquels les NOX1 à 5, les NOX dual oxidase 1 et 2, la NOX organizer 1, et la NOX activator 1. Initialement identifiée dans les cellules leucocytaires impliquées dans la phagocytose (Babior, 1999), la NOX a récemment été identifiée dans le réticulum sarcoplasmique du cœur (Cherednichenko et al., 2004) et du muscle squelettique (Xia et al., 2003) ainsi que dans la membrane plasmique, les triades et les tubules transverses du muscle squelettique (Javesghani et al., 2002 ; Espinosa et al., 2006). La NOX est un complexe multimérique dont la structure est similaire, mais non identique, selon qu'il s'agisse de cellules phagocytaires ou non. La NOX musculaire comporte quatre des sous-unités cytosoliques et membranaires qui se trouvent dans les cellules phagocytaires (p91phox, p22phox, p47phox, et p67phox), les 4 étant membranaires.

Encadré 8 - Les marqueurs du Stress Oxydant

L'exploration du statut pro/antioxydant peut se faire selon quatre axes : la mesure de la production d'ERO (statut prooxydant), la mesure des capacités de défense (statut antioxydant), la mesure des dommages oxydatifs, et la mesure de la balance redox. Un grand nombre de marqueurs et de techniques sont actuellement utilisés en recherche pour évaluer ce statut pro/antioxydant.

Espèces oxydantes <ul style="list-style-type: none"> • Anion superoxide • Radical hydroxyle • Peroxide d'hydrogène • Peroxynitrite • Autres radicaux 	Antioxydants <ul style="list-style-type: none"> • Glutathion • Ascorbate • Alpha-tocopherol • Capacité antioxydante totale
Produits d'oxydation <ul style="list-style-type: none"> • Protéine carbonylées • Isoprostanes • Nitrotyrosine • 8-OH-dG • 4-hydroxynonanal 	Balance pro/anti-oxydante <ul style="list-style-type: none"> • Rapport GSH/GSSH • Cystéine • Thiols • Autres ?

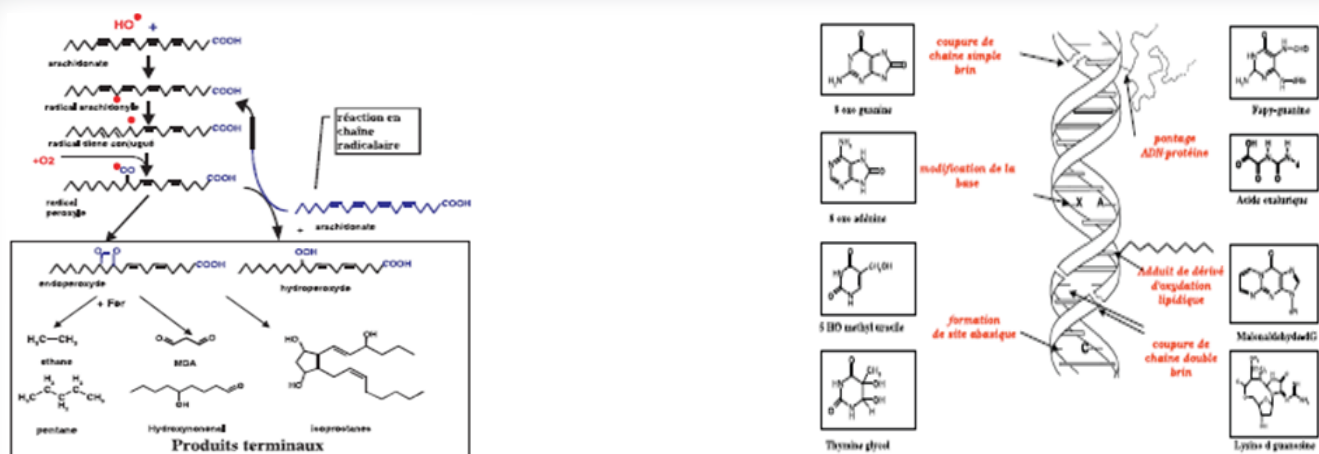
Marqueurs du Stress Oxydant (d'après Powers et Jackson, 2008)

Les critères d'un bon marqueur du Stress Oxydant (Powers et Jackson, 2008)

- 1) être spécifique et détectable
- 2) augmenter ou diminuer lors d'un SO
- 3) posséder une demi-vie suffisamment longue
- 4) ne pas être affectés par d'autres processus cellulaires (cycle cellulaire, métabolisme énergétique...)

Limites et difficultés dans l'évaluation du Stress Oxydant

Les dosages des marqueurs répondant aux critères ci-dessus ne font pas partie des méthodes utilisées en routine, en biologie clinique, ce qui rend l'interprétation des résultats et le diagnostic du SO difficile. Ainsi, pour conclure à un SO, la variation de plusieurs marqueurs des dommages cellulaires (au moins deux) est nécessaire. Toute variation concomitante du système antioxydant est un argument supplémentaire mais ne constitue pas une preuve du SO. De plus, il existe des difficultés qui sont directement liées à ce type d'étude, comme la demi-vie extrêmement courte des ERO et ERN, l'oxydabilité des paramètres redox, ainsi que la localisation de ce stress dans un type donné et un nombre réduit de cellules, dans un tissu sain.



Exemples d'attaques radicalaires des lipides (à gauche) et de l'ADN (à droite).
Les produits formés peuvent être dosés pour évaluer le SO

Plus récemment, grâce aux progrès de la biologie cellulaire et moléculaire, cette vision exclusivement néfaste des ERO et ERN a évolué. De nombreuses études ont en effet montré leur implication dans le bon fonctionnement cellulaire. A faible concentration, sans pour autant engendrer de dommages cellulaires, les ERO et ERN peuvent ainsi intervenir dans certaines voies de signalisation, la régulation de facteurs de transcription et l'expression de certains gènes⁴⁰ (encadré 9 et Figure 16). Cette signalisation redox joue un rôle important dans la survie, la prolifération, ou la protection de la cellule vis-à-vis de différents agents stressants comme l'exercice isolé, et explique également les effets bénéfiques de l'exercice chronique observés sur le long terme. En effet, un exercice isolé d'intensité et/ou de durée suffisante, constitue un stress pour l'organisme, perturbant temporairement l'homéostasie redox. Selon la théorie de l'hormesis, sa répétition induit, au contraire, un processus adaptatif impliquant entre autres, une "up-régulation" des enzymes antioxydantes endogènes. Les ERO produits lors de l'exercice agissent comme un signal intracellulaire, qui active des facteurs de transcription et des voies de signalisation conduisant à l'expression d'enzymes clés de la défense contre les ERO. L'exercice chronique peut donc être considéré comme un "antioxydant naturel" (Gomez-Cabrera et al., 2008).

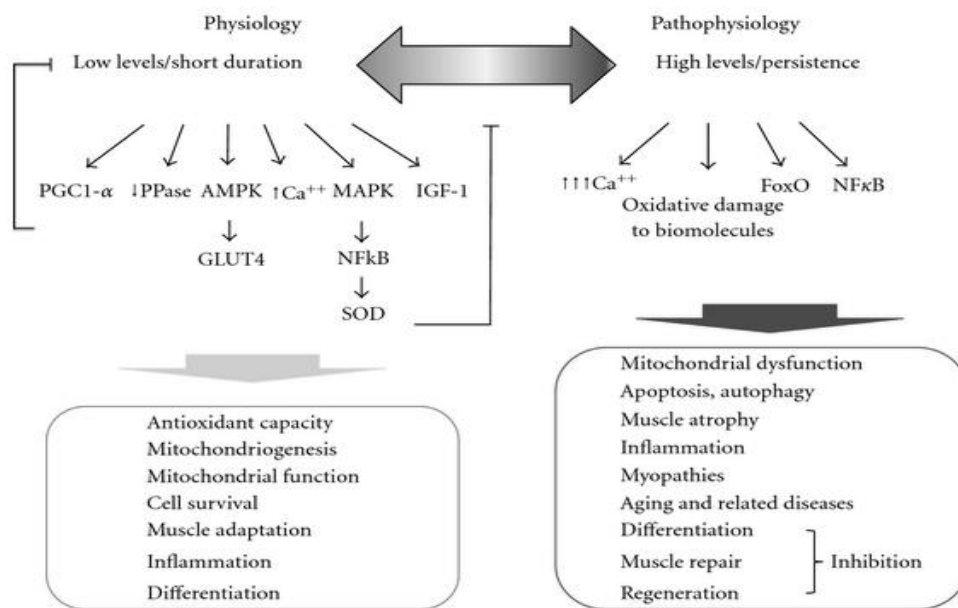
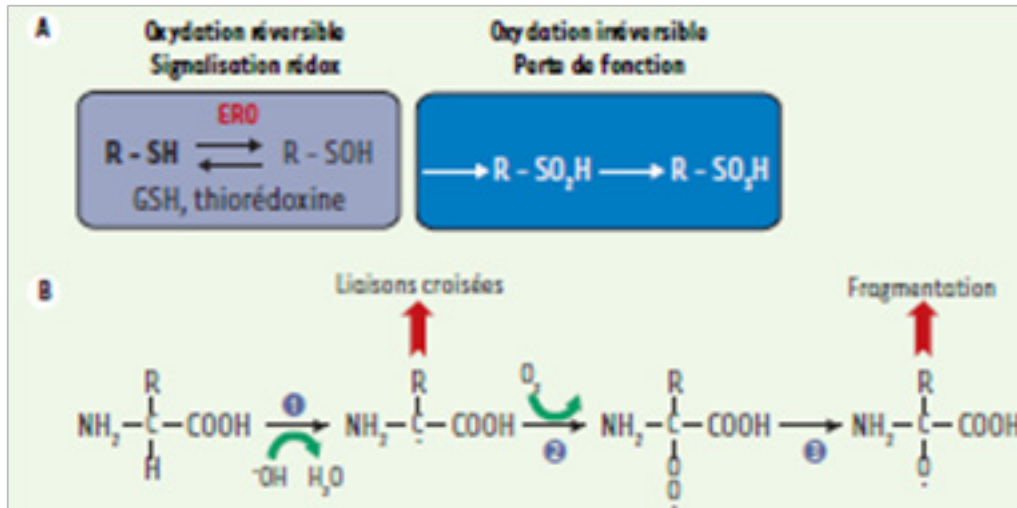


Figure 16 : Principales voies de signalisation activées et/ou modifiées par les ERO/ERN dans le muscle squelettique (Barbieri and Sestili, 2012)

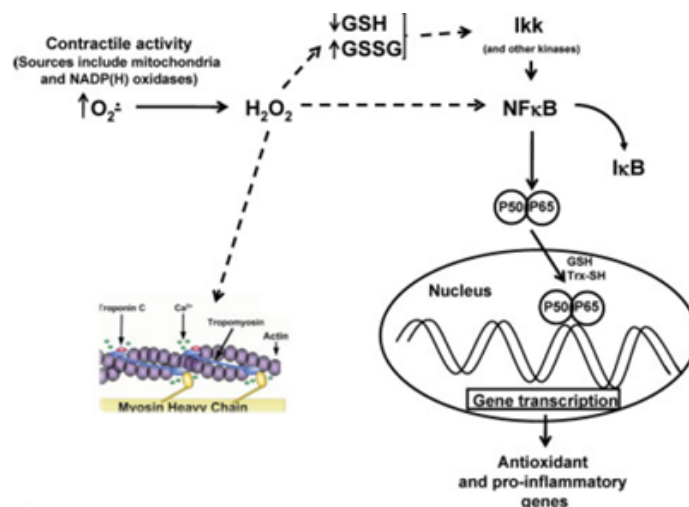
⁴⁰ Par exemple, le NO joue un rôle dans la fonction endothéliale et le captage musculaire de glucose, il intervient également en tant que messager secondaire, tout comme l'H₂O₂. Les ERO et ERN vont intervenir dans la transduction du signal et l'expression des gènes, notamment en inactivant des phosphates, en régulant des kinases et des protéases,...

Encadré 9 - La signalisation Redox



Migdal et Serres, 2011

Depuis quelques années, des études ont mis en évidence l'implication des ERO dans la signalisation cellulaire (Martinon, 2010 ; Bartosz, 2009 ; Rhee, 2006 ; Forman et al., 2002), via l'oxydation de la fonction thiol de résidus cystéine de protéines. Les protéines concernées sont les phosphatases (surtout les tyrosines phosphatases), les protéines G, ainsi que certains canaux ioniques et facteurs de transcription. L'oxydation des cystéines conduit à différents effets selon les protéines concernées : certaines protéines peuvent être activées (récepteurs de la ryanodine), d'autres peuvent être inactivées (les tyrosines phosphatases), certaines peuvent changer leur conformation afin d'induire une dimérisation (protéines chaperones) (Bartosz, 2009). L'oxydation de ces résidus cystéine entraîne la formation d'acide sulfénique (SOH), qui par la suite peut soit former des liaisons disulfure avec d'autres cystéines proches (-S-S-), soit être oxydé en acide sulfinique (-SO₂H) ou sulfonique (-SO₃H) (Ray et al., 2011)(Figure A de l'encadré). La plupart du temps (à l'exception de l'acide sulfonique, et à un degré moindre, l'acide sulfinique), ces modifications redox sont réversibles et modifient le rapport oxydé/réduit d'un couple redox (possédant certains groupements chimiques comme les thiols, la thioredoxine et la peroxiredoxine (Roos et coll. 2001). Ainsi, une production transitoire et limitée d'ERO et d'ERN induisant un stress oxydant non léthal, peut affecter le comportement des protéines possédant des cystéines critiques, et ainsi participer ou interférer avec la signalisation cellulaire et la régulation des gènes. Pour exemple, cette production contribue à transmettre divers stimuli physiologiques (facteurs de croissance, TNF, IL-1...) (Barouki et Morel, 2001) et régule de nombreuses fonctions physiologiques comme la synthèse d'antioxydants (figure B de l'encadré), le tonus vasculaire, l'angiogenèse, la croissance, la différenciation et la migration cellulaire (Martinon, 2010). A l'inverse, une production excessive ou chronique d'ERO et d'ERN entraîne un stress oxydant caractérisé par des dommages oxydatifs sur les constituants cellulaires (peroxydation lipidique, adduits à l'ADN et aux protéines...) pouvant être à l'origine d'une apoptose ou d'une nécrose.



Représentation schématique de la régulation redox survenant en réponse à la génération d'anion superoxyde dans les fibres musculaires squelettiques. Le peroxyde d'hydrogène formé active de multiples voies de signalisation, notamment le NFκB, et oxyde des groupements thiols sur les myofibrilles ; ce qui conduit respectivement à des changements adaptatifs dans l'expression des gènes et à une modification de la sensibilité des myofibrilles au calcium.

A l'état physiologique, les ERO et ERN sont maintenues à un faible niveau grâce aux systèmes de défense que possèdent nos cellules (encadré 10). Ces systèmes antioxydants (leurs caractéristiques et leurs actions) ont été largement décrits dans la littérature (Machlin and Bendich, 1987; Halliwell and Gutteridge, 1990) et sont de deux sortes. Le système antioxydant primaire a pour but de limiter les réactions radicalaires, dont la grande majorité est irréversible. Les composés appartenant à ce système peuvent être définis comme "toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat". Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques ayant pour but d'éliminer les ERO/ERN (superoxyde dismutase [SOD], catalase [CAT], glutathion peroxydase [GPX], couple thiorédoxine/thiorédoxine réductase, hème oxygénase, peroxyrédoxine...), mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles appelées en anglais "scavenger" (caroténoïdes, vitamines C et E, glutathion, acide urique, bilirubine, acide lipoïque, ubiquinone, ...) ayant pour but de piéger les ERO/ERN en bloquant notamment la peroxydation lipidique. Les protéines (ferritine, transferrine, céruloplasmine...) impliquées dans les mécanismes de transport et de séquestration des métaux de transition (qui sont de puissants promoteurs de dommages radicalaires), peuvent également être considérées comme des antioxydants primaires. Ces disparités physico-chimiques rendent possible la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme (intra/extracellulaires, membranaires...). Le système secondaire, quant à lui, répare et/ou élimine les molécules endommagées par les ERO/ERN (Sies, 1993). Ce système de défense est composé de macroxyprotéinases, d'ADN endonucléases et ligases et de phospholipases, qui empêchent respectivement l'accumulation dans la cellule de protéines oxydées, d'ADN, et de lipides, et participent à l'élimination de leurs fragments toxiques. La compartimentation des tissus, qui empêche la diffusion des radicaux libres de la cellule au secteur extracellulaire, peut également être considérée comme un système protecteur.

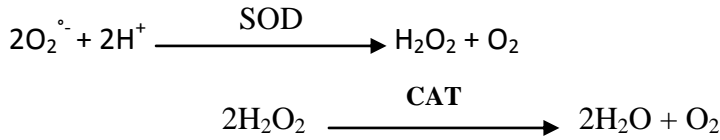
Pour résumer, grâce aux progrès de la biologie cellulaire et moléculaire, le rôle et la vision des ERO/ERN ont totalement évolué ces dernières années. Les scientifiques ont pris conscience de l'importance de l'environnement redox au sein de la cellule, et s'accordent sur le fait qu'un SO transitoire est une condition nécessaire aux processus d'adaptations. A l'inverse, un SO chronique est néfaste, car impliqué dans de nombreuses pathologies chroniques et/ou dans leurs conséquences associées (maladies cardiovasculaires et inflammation pour l'obésité et diabète, cancers...). Dans la suite de cette thèse, nous allons détailler son implication dans la survenue et dans les complications liées au diabète.

Encadré 10 – Les systèmes antioxydants

Les systèmes antioxydant primaires

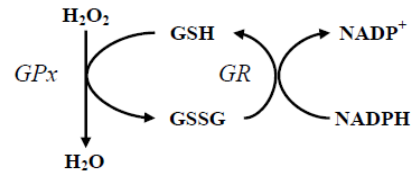
➤ Les systèmes primaires enzymatiques

Les enzymes antioxydantes peuvent être classées en 2 groupes : les dismutases et les réductases.



Les dismutases : elles ne nécessitent pas d'apport énergétique pour leur fonctionnement. Il s'agit de la superoxyde dismutase (SOD), et de la catalase (CAT).

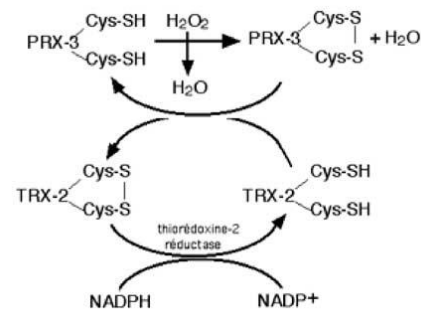
Les réductases : elles consomment des cofacteurs réducteurs devant être régénérés. La glutathion peroxydase (GPx) représente l'enzyme la plus importante de ce groupe. Elle travaille en synergie avec la glutathion réductase (GR).



Elimination du H₂O₂ par les réactions enzymatiques combinées de la GPx et de la GR.

Ces trois enzymes (des métalloprotéines) constituent les clés de voûte de la protection antioxydante.

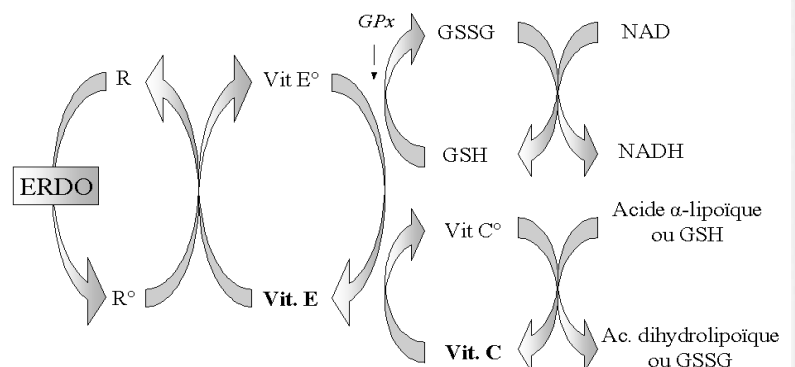
Plus récemment, d'autres enzymes antioxydantes ont été identifiées, comme le couple thiorédoxine (Trx)/thiorédoxine réductase (TrxR) et les peroxyrédoxines (Prx). Associées aux thiorédoxine réductases, les Trx constituent un élément clé de la régulation redox des cellules. Par transfert d'électrons (provenant des molécules de NADPH), la TrxR réduit la Trx, cette dernière pouvant alors réduire à son tour les protéines redox comme les Prx (schéma ci-contre). Les Prx, ou thiorédoxine peroxydases, exercent leur activité antioxydante par leur activité peroxydase (les substrats éliminés sont l'H₂O₂, le peroxy-nitrite, les hydroperoxydes) dans le cytosol, les mitochondries, les peroxysomes, dans le noyau et les membranes (Wood et al., 2003).



Destruction du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par la peroxyrédoxine-3 (Prx-3) et régénération de Prx-3 par le système thiorédoxine-2 (Trx-2) – thiorédoxine-2 réductase

➤ Les systèmes primaires non-enzymatiques

Les enzymes antioxydantes ne constituent pas la seule protection contre les radicaux libres. Un autre type de protection est assuré par des substances capables de neutraliser un unique radical libre par molécule : on les appelle piègeurs stœchiométriques. Si l'activité enzymatique est insuffisante, l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène s'accumulent, des radicaux hydroxyles apparaissent, entraînant des peroxydations en chaîne des lipides membranaires. L'organisme ne possède pas d'enzymes antioxydantes luttant contre les radicaux alcoyles (RO°) et peroxydes (ROO°), mais les réactions de peroxydation lipidique peuvent être stoppées par les piègeurs de radicaux libres. Il s'agit de composés facilement oxydables présents dans le cytoplasme (glutathion, vitamine C) ou dans les membranes cellulaires (vitamine E, β-carotène) qui forment avec ces radicaux des composés plus stables. Notre alimentation comporte de nombreux antioxydants comme les vitamines et certains oligo-éléments. Ces antioxydants sont localisés soit dans la partie aqueuse de l'organisme soit dans la partie lipidique. Parmi les antioxydants lipidiques, on trouve la vitamine E, le coenzyme Q10 ainsi que de nombreux caroténoïdes. Parmi les antioxydants hydrosolubles, la vitamine C est la plus connue. La plupart des ces antioxydants comme la vitamine E, la vitamine C, les thiols et le coenzyme Q10 sont basés principalement sur des réactions redox et agissent en synergie comme le montre la figure ci-contre.



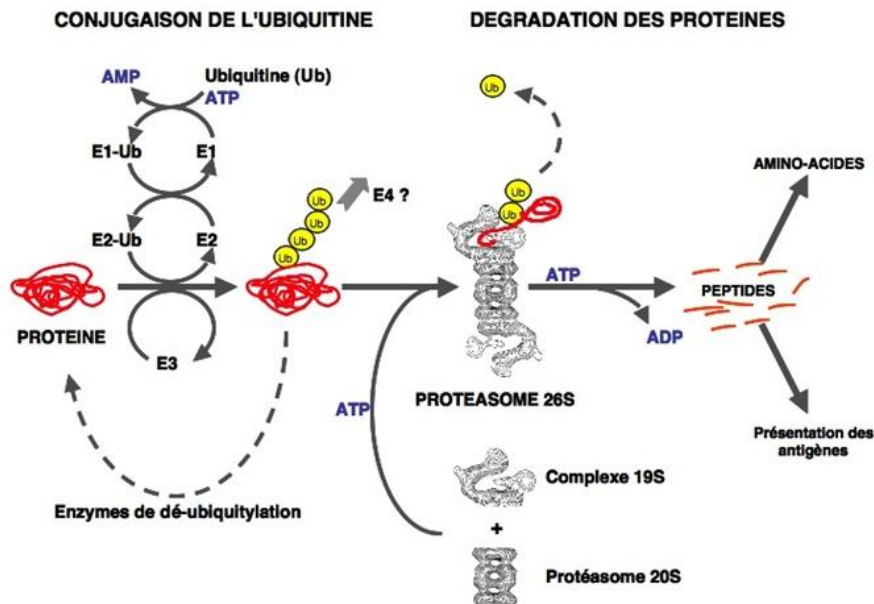
Encadré 10 – Les systèmes antioxydants

Les systèmes antioxydant secondaires

Les systèmes secondaires interviennent lorsque les ERO/ERN n'ont pu être éliminées et ont attaqué les constituants cellulaires entraînant des altérations plus ou moins graves.

Les systèmes réparateurs vont tenter de réparer les lésions induites. Plusieurs grands systèmes se différencient.

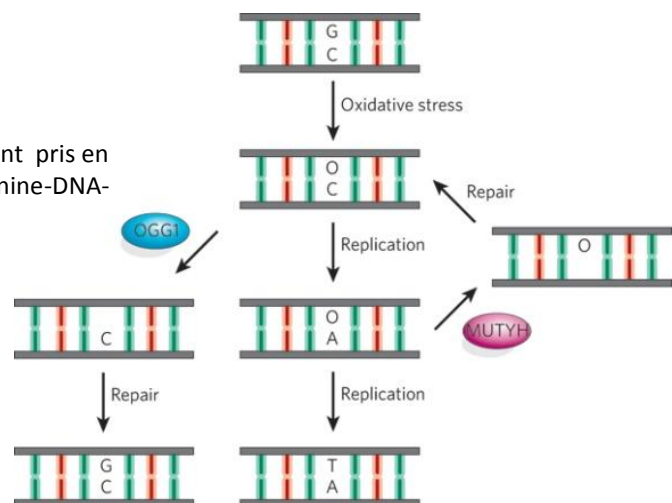
Concernant les protéines, ce sont les **systèmes protéolytiques** et autophagiques qui vont assurer l'élimination des protéines endommagées, de concert avec les protéines de choc thermique (HSP).



Système de prise en charge des protéines endommagées (d'après Coux et al., 1996)

Pour les lipides, le **système lipolytique** répare les lipides membranaires en éliminant les acides gras peroxydés ou en les régénérant. La phospholipase A₂ possède la propriété de couper les acides gras oxydés des phospholipides.

Enfin, les dommages oxydatifs au niveau de l'ADN sont pris en charge par certaines enzymes comme l'oxoguanine-DNA-glycosylase (OGG1) (Bohr et al., 2002).



Systèmes de réparation des bases de l'ADN oxydé (David et al., 2007)

2 Rôle du SO dans la survenue du diabète

2.1 Chez l'animal

Les études visant à analyser le rôle du SO dans le développement du diabète sont basées, chez l'animal, sur des modèles expérimentaux de diabète. Ceux-ci seront brièvement présentés ici, avant d'aborder de manière plus générale l'implication du SO dans la survenue du diabète.

2.1.1 Les modèles animaux de diabète

Il existe deux catégories de modèles animaux du diabète de type 1 : les animaux porteurs d'une mutation génétique qui les conduisent spontanément à une insulino-pénie et l'induction volontaire du diabète par injection d'un produit chimique, qui va s'accumuler au niveau du pancréas et détruire massivement les cellules productrices d'insuline. Dans ce dernier cas, les deux agents diabéto-gènes utilisés sont la streptozotocine et l'alloxane.

2.1.1.1 Les modèles animaux de diabète de type 1 spontané

Dans plusieurs espèces, des souches animales sélectionnées en laboratoire pour leur hyperglycémie, ont été reproduites de manière consanguine sur de nombreuses générations (Tableau 6). Il en résulte une modification de nombreux gènes et du phénotype dans chacune de ces espèces, qui développent une hyperglycémie causée par une insulite.

Souris NOD (Non Obese Diabetic)
Rat BB (Bio Breeding)
Rat LETL (Long Evans Tokushima Lean)
Lapin blanc de Nouvelle Zélande
Chien Keeshond
Hamster Chinois
Macaque noir de Celebes

Tableau 6 : Les modèles animaux de diabète de type 1 spontané (Rees et Alcardo, 2005)

Les modèles les plus utilisés sont la souris Non Obese Diabetic (NOD) et le rat Bio Breeding (BB). Leur avantage est de présenter une étiologie auto-immune et des modifications génétiques similaires à celles mises en évidence chez l'Homme, ce qui en fait des modèles très proches de la pathologie humaine (Rees and Alcolado, 2005). Néanmoins, les souris NOD ne présentent qu'une acidocétose modérée et survivent très bien sans traitement à l'insuline. De plus, le genre a un impact considérable, puisque plus de 90% des femelles développent la pathologie contre seulement 60% des mâles (Atkinson and Leiter, 1999).

2.1.1.2 Les modèles animaux d'induction chimique du diabète

➤ Le diabète induit par streptozotocine

La streptozotocine (ou 2-deoxy-2-(3-méthyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose) est un antibiotique produit à partir de la souche bactérienne *streptomyces achromogenes*⁴¹. Elle est utilisée pour induire un diabète de type 1 ou de type 2, selon les caractéristiques d'injections. Celles-ci sont réalisées en intra-péritonéale, ou en intraveineuse au niveau de la veine de la queue.

Pour induire un diabète de type 1, une injection unique de 40 à 60 mg/kg de poids est généralement réalisée (Szkudelski, 2001). Cette dose peut être supérieure, notamment dans le cas d'animaux âgés, dont la sensibilité à l'effet diabétogène de la streptozotocine est diminuée (Masiello et al., 1979). Elle peut également être inférieure, et dans ce cas, l'induction du diabète se fait par répétition d'injections à faible dose, en faisant intervenir essentiellement des processus immunitaires (Szkudelski, 2001), similaires à ceux décrits dans le chapitre 1 (paragraphe 2.3.2.3 : les causes du diabète, altération de l'immunité intestinale et inflammation).

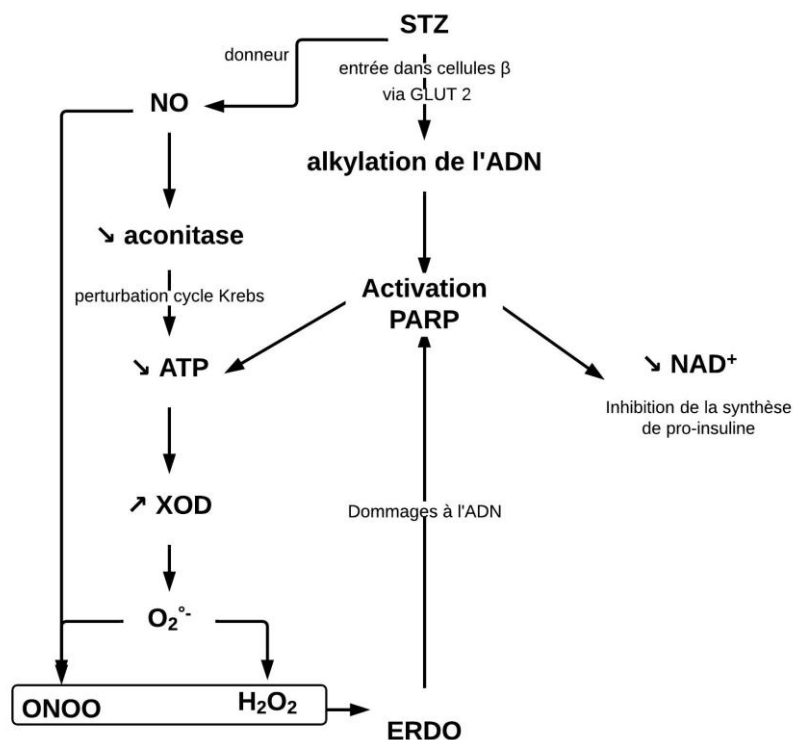


Figure 17 : Mécanismes d'action de la streptozotocine (adaptée de Szkudelski, 2001)

⁴¹ Souche de bactéries non-pathogène appartenant à la famille des streptomyces, couramment utilisée dans la production d'antibiotiques.

Lorsqu'une seule injection de streptozotocine à forte dose est réalisée, celle-ci s'accumule au niveau du pancréas et entre, via les transporteurs du glucose (GLUT2), dans les cellules bêta, où elle va causer une alkylation⁴² de l'ADN. Les dommages ainsi créés activent les PARP⁴³, étape déterminante dans l'action de la streptozotocine, puisque les PARP consomment du NAD⁺ et de l'ATP. La déplétion cytosolique en NAD⁺ inhibe la synthèse de proinsuline, alors que la déplétion en ATP active la voie de la xanthine oxydase (Ohkuwa et al., 1995). Par ailleurs, la streptozotocine se comporte comme un donneur de °NO, qui inhibe l'activité de l'aconitase, perturbe le cycle de Krebs, et donc renforce la déplétion en ATP. De grandes quantités d'anion superoxyde sont alors produites par la voie de la xanthine oxydase, aboutissant à la génération de différentes espèces réactives, et notamment du peroxy-nitrite (produit de la réaction entre l'anion superoxyde et le NO apporté par la streptozotocine) (Matkovics et al., 1997). C'est l'ensemble de ces phénomènes qui va aboutir à la nécrose des cellules bêta.

Quel que soit le protocole d'injection, les conséquences métaboliques sont similaires. Les travaux de Kim et al. (2006) montrent une baisse de l'insulinémie et une élévation de glycémie identiques au bout de trois semaines, que le diabète ait été induit par une seule injection de streptozotocine à 80 mg/kg, ou par cinq injections successives à 20 mg/kg.

➤ Le diabète induit par alloxane

L'alloxane⁴⁴ est le produit résultant de l'oxydation de l'acide urique par l'acide nitrique. Il est utilisé sous forme d'injections pour induire expérimentalement un diabète de type 1.

La dose d'alloxane requise pour induire un diabète dépend de l'espèce animale, de la voie d'administration et du statut nutritionnel, les animaux à jeun étant plus sensibles à son effet. Chez le rat nourri, la dose habituellement utilisée en intra-veineuse est de 65 mg/kg. En intra-péritonéale et en sous-cutanée, cette dose est deux à trois fois plus élevée (Szkudelski, 2001).

La toxicité de l'alloxane sur les cellules bêta du pancréas est le résultat de plusieurs processus complexes, comprenant l'oxydation de groupements thiols, l'inhibition de la glucokinase, des perturbations dans l'homéostasie calcique intracellulaire, et la génération d'ERO et ERN (Cohen and Heikkila, 1974).

Ce modèle présente deux inconvénients majeurs : son manque de sélectivité cause des dommages nécrotiques non seulement au niveau du pancréas, mais aussi au niveau des reins ou du foie, et la forte perturbation de l'insulinosensibilité qu'il engendre (perturbation transitoire, dans les heures qui suivent l'injection d'alloxane) entraîne une hyperinsulinémie sans hypoglycémie associée (Szkudelski et al., 1998).

⁴² Transfert d'un groupement alkyle d'une molécule organique à une autre. Dans le cas de l'ADN, l'alkylation cause une cassure des brins.

⁴³ Poly(ADP-ribose)-polymerases : famille de protéines impliquée dans de nombreux processus cellulaires, et notamment la réparation de l'ADN

⁴⁴ Alloxane : 2,4,5,6-tetraoxypyrimidine; 5,6-dioxyuracil

2.1.2 Arguments en faveur du rôle du SO dans la survenue du diabète expérimental

De nombreuses études soulignent l'implication du SO dans la survenue du diabète expérimental. Comme nous venons de le voir, les drogues utilisées (streptozotocine ou alloxane) déclenchent la production d'espèces radicalaires, responsables de l'apoptose des cellules bêta. De plus, elles provoquent dans le même temps une inhibition de la CuZn-SOD (Crouch et al., 1981), l'isoforme que l'on retrouve essentiellement au niveau des cellules bêta des îlots de Langerhans (Gandy et al., 1981). La SOD injectée dans l'heure qui précède l'administration de STZ peut ainsi protéger de l'induction du diabète. Son rôle protecteur résulte de son activité antioxydante propre, et non d'une liaison avec la STZ qui inactiverait cette dernière, car une pré-incubation de la SOD avec la STZ ne diminue pas l'effet toxique de la STZ (Gandy et al., 1982).

De plus, différents mécanismes de protection radicalaire permettent de prévenir les dommages induits par la STZ, notamment l'exercice physique -sous forme d'entraînement à intensité modérée- (Coskun et al., 2004), et la supplémentation en divers antioxydants -quercitine (Coskun et al., 2005) ; Nigella Sativa⁴⁵(Kanter et al., 2004) ; vitamine E (Vanucchi, 1999) ; CYT⁴⁶ (Papaccio et al., 1986). Chez l'animal, la diminution des dommages induits par les injections de STZ grâce à une prise en charge antioxydante (exercice et supplémentation) suggère donc que cette drogue exerce une partie de son action toxique par des mécanismes radicalaires.

Il semblerait par ailleurs que les cellules bêta du pancréas soient particulièrement sensibles aux attaques des radicaux libres (Coskun et al., 2004), notamment à cause d'une déficience de leur système antioxydant. L'activité des enzymes antioxydantes, dans les îlots du pancréas, a donc été mesurée et comparée à celle d'autres tissus. Pour la SOD, les résultats montrent des variations d'activité allant de 1 à 10, l'activité dans les îlots de Langerhans se situant dans les valeurs moyennes. Concernant la CAT et la GPX, la variation d'activité selon les tissus se fait dans des proportions beaucoup plus importantes (de 1 à 100), les îlots du pancréas faisant partie des tissus où elle est la plus faible. Cette faible activité des enzymes antioxydantes dans le pancréas résulte d'une expression réduite des enzymes dans ce tissu comparé à d'autres, comme le foie (expression plus faible de 30 à 40 % pour la SOD, de 15% pour la GPX, et non détectable pour la CAT) (Lenzen et al., 1996). De plus, l'exposition des cellules bêta à un stress cellulaire (forte concentration de glucose ou d'oxygène) n'y affecte pas l'expression des enzymes antioxydantes. Les cellules pancréatiques ne sont donc pas capables d'adapter leur faible activité antioxydante, en up-régulant l'expression des enzymes correspondantes, face à une situation de stress (Tiedge et al., 1997).

⁴⁵ La nigelle cultivée (*Nigella sativa* L. 1753), ou cumin noir, est une plante annuelle de la famille des Renonculacées, exerçant de nombreux effets pharmacologiques (anti-inflammatoires, antioxydants...).

⁴⁶ Le CYT (acetyl-homocysteine-thiolactone) est un composé organique thiol, piègeur de radicaux libres et stimulant l'activité de la SOD.

2.2 Chez l'Homme

Chez l'Homme, les recherches des dernières décennies se sont focalisées sur les causes génétiques et environnementales du DT1. Par conséquent, peu d'études se sont intéressées au rôle éventuel du SO dans le développement de la pathologie (West, 2000). Pourtant les études chez l'animal ont mis en évidence un rôle clé du SO dans la pathogenèse du diabète, faisant apparaître la possibilité de mesures préventives chez les personnes à risques, en tentant de diminuer le SO et donc d'enrayer/d'éviter le développement de la maladie (Abiru et al., 2002).

De plus, il est méthodologiquement difficile d'analyser l'impact du SO dans le développement du diabète. En effet, lorsque les symptômes d'hyperglycémie apparaissent et que le diagnostic de DT1 est posé, la pathologie est sous-jacente depuis déjà de nombreux mois, voire de nombreuses années. C'est pourquoi les études évaluant le SO, chez les sujets dont le DT1 a été diagnostiqué, seront traitées dans le chapitre suivant (3.2, Le SO comme conséquence du diabète chez l'Homme). Nous aborderons ici les quelques études qui se sont intéressées à des sujets à risques pour le DT1, mais n'ayant pas encore développé la pathologie : les personnes porteuses d'auto-anticorps ou les parents au premier degré de sujets dont le DT1 est survenu de façon sporadique (Matteucci and Giampietro, 2007).

Contrairement aux familles recensant plusieurs cas de DT1, les familles ne comptant qu'un cas isolé ne présentent pas, a priori, une forte prédisposition génétique pour cette maladie. D'autres facteurs suspectés d'intervenir dans la survenue de la pathologie sont donc à identifier, comme par exemple une modification de la balance pro/antioxydante. Il apparaît ainsi que les frères et sœurs d'enfants diabétiques présentent eux-mêmes au niveau plasmatique, une diminution des défenses antioxydantes et une élévation de la peroxydation lipidique (Varvarovska et al., 2003). Les parents (ascendants) des sujets DT1 présentent eux aussi des marqueurs de SO élevés, associés à des marqueurs d'inflammation, malgré un système de défense antioxydant similaire à des sujets contrôles (Matteucci and Giampietro, 2000). Ces anomalies peuvent être corrigées par une prise en charge antioxydante, telle que l'activité physique ou une supplémentation en vitamine C.

Toutefois, les résultats des études s'intéressant aux sujets porteurs d'auto-anticorps, donc à risque pour le DT1, sont beaucoup moins concluantes. Ainsi, la capacité antioxydante plasmatique de ces sujets n'est pas altérée avant la survenue clinique du DT1 (Leinonen et al., 1998). Dans le même sens, des études tentant de déterminer le rôle protecteur d'antioxydants d'origine alimentaire dans la survenue du DT1 chez des enfants génétiquement à risques, n'ont pas mis en évidence de corrélations entre les niveaux sériques de bêta-carotène et de tocophérol, et la survenue du DT1 (Uusitalo et al., 2008; Prasad et al., 2011).

En conclusion, l'induction du diabète chez l'animal résulte à la fois d'une production massive d'espèces radicalaires, associée à une déficience préexistante des systèmes antioxydants enzymatiques au niveau du pancréas. Chez l'Homme, les systèmes antioxydants ne semblent pas affectés préalablement à la survenue du DT1.

3 Le SO, conséquence du diabète :

Le rôle du SO dans le diabète (sa survenue, son développement et ses complications) a commencé à être évoqué dans les années 1980. Dès 1988, Oberley recensait les études mettant en évidence une relation entre le statut diabétique et des modifications de la balance pro/antioxydante (Oberley, 1988). La décennie suivante a été consacrée à l'étude de ces modifications, à la fois l'augmentation de la production d'ERO et ERN et les altérations du système antioxydant chez les sujets diabétiques. Dans la dernière décennie, les études se sont centrées sur la compréhension des mécanismes expliquant ce SO dans le diabète, et son évolution en fonction de la durée du diabète.

3.1 Mise en évidence

Comme nous l'avons vu dans le chapitre consacré au SO, la mesure directe des RL est difficile sur le plan technique. C'est pourquoi la quasi-totalité des études s'attache à évaluer les marqueurs de dommages oxydatifs ou l'évolution des systèmes antioxydants (Tableaux 7 et 8). Néanmoins, la formation de RL a pu être mise en évidence de manière directe par RPE dans le sang, chez des rats rendus diabétiques par STZ. Deux, quatre et huit semaines après l'induction du diabète, la formation de RL était plus importante chez ces animaux comparés à des sains, et était corrélée à la peroxydation lipidique évaluée par la concentration de MDA urinaire (Sano et al., 1998). L'augmentation du radical hydroxyle a également été démontrée dans le plasma, le foie, le cœur et le cerveau, et était corrélée à la dose de STZ injectée (Ohkuwa et al., 1995). Il est intéressant de noter que, la STZ ne pénétrant pas dans le cerveau (Karunanayake et al., 1974), la formation du radical hydroxyle qui y est observée résulte bien de l'hyperglycémie, et non de la STZ elle-même. La production d'anion superoxyde, mesurée *ex vivo*, est également beaucoup plus élevée chez des sujets DT1 (multipliée par trois) (Ceriello et al., 1991).

Plus souvent, ce sont les marqueurs de dommages oxydatifs plutôt que les espèces réactives elles-mêmes qui ont été mis en évidence. En raison de leur implication dans les complications du diabète (voir paragraphe 4), les marqueurs les plus étudiés sont ceux de la peroxydation lipidique (Esterbauer et al., 1992; Heinecke, 1997). Malgré le manque de précision et de spécificité de certaines anciennes techniques (la méthode des TBARS, par exemple), le phénomène d'oxydation des lipides dans le diabète ne fait pas de doute. En effet, les différents marqueurs sont tous élevés chez les DT1 comparés à des contrôles, et ce quelque soit le tissu étudié et la durée du diabète. De plus, le dosage des isoprostanes (marqueur récent beaucoup plus précis et spécifique de la peroxydation lipidique) a confirmé les observations précédentes.

L'oxydation des protéines a été démontrée dans plusieurs études, par la mesure de différents composés résultant de leur attaque par des espèces réactives. Les plus souvent dosés sont les protéines carbonylées et les produits avancés de l'oxydation des protéines, ou AOPP (Advanced Oxidation Protein Products). Ces dernières années, la mesure des produits terminaux de glycation, ou AGE (Advanced Glycation End-products), s'est développée. Les AGE présentent le double avantage d'être spécifiques au SO dans le diabète (puisqu'ils sont formés par l'oxydation de protéines qui ont été préalablement modifiées par

l'hyperglycémie), et d'être par la suite impliqués dans le développement des complications diabétiques. Leur rôle prépondérant sera détaillé au paragraphe 4.

En 1996, Dandona et al. ont pour la première fois mis en évidence que les dommages oxydatifs dans le diabète touchaient également l'ADN, avec des valeurs de 8-hydroxydéoxyguanosine (8-OHdG) lymphocytaires supérieures chez des DT1 comparés à des sujets sains (Dandona et al., 1996). Ce constat a été confirmé par la mesure des cassures des brins d'ADN, plus nombreuses chez les DT1 (Collins et al., 1998). Enfin, il a été démontré *in vitro* qu'un milieu riche en glucose (similaire au diabète) induit des mutations de l'ADN mitochondrial. L'importance de ces mutations est corrélée positivement à la concentration de glucose dans le milieu de culture (Fukagawa et al., 1999).

La mesure des dommages oxydatifs est généralement couplée à celle des systèmes antioxydants, afin d'avoir une vision globale du système pro/antioxydant.

Si la diminution du statut antioxydant total, que ce soit dans le plasma ou les tissus, est bien démontrée dans le DT1, l'évolution des différents antioxydants enzymatiques ou non enzymatiques est beaucoup plus discutée. Les études rapportent ainsi une diminution, une augmentation, ou une absence de changement, dans l'activité des enzymes antioxydantes ou dans les concentrations vitaminiques (pour revue, Szaleczky et al., 1999).

Il semble qu'en réalité, l'impact du diabète sur les différents éléments du système antioxydant soit lié à de nombreux facteurs méthodologiques qu'il convient de prendre en compte dans la lecture des résultats. Ces facteurs sont différents selon le modèle étudié : on notera ainsi le tissu considéré, la durée du diabète et ses modalités d'induction chez l'animal (dose de STZ), alors que chez l'Homme on analysera le contrôle glycémique et la présence ou non de complications.

Marqueurs	Variation (milieu)	Référence
<u>Peroxydation lipidique</u>		
TBARS/MDA	↗ à 1 sem et → à 20 sem (plasma, foie)	Higuchi, 1982
	↗ (plasma, foie, rein, pancréas, cœur, aorte)	Kakkar, 1995, 1996, 1997, 1998
	↗ (plasma)	Griesmacher, 1995
	↗ (plasma)	Wieruz Wysocka, 1995
	↗ (plasma)	Laaksonen, 1996
	↗ (foie, rein, pancréas)	Bastar, 1998
	↗ (plasma)	Dominguez, 1998
	↗ (plasma)	Ruiz, 1999
	↗ (plasma)	Feillet-Coudray, 1999
	↗ (plasma)	Güzel, 2000
	→ (plasma)	Vanderjagt, 2001
	↗ (plasma)	Martin-Gallan, 2003
	↗ (plasma)	Mahesh, 2004
	↗ (foie)	Dias, 2005
↗ (plasma)	Gil-del-Valle, 2005	
Hydroperoxydes	↗ (plasma)	Santini, 1997
	↗ (plasma)	Nourooz-Zadeh, 1997
	↗ (plasma)	Ruiz, 1999
	↗ (plasma, cœur, rein, cerveau) - → (foie)	Elangovan, 2000
	→ et ↗ (plasma)	Telci, 2000
	↗ (plasma)	Marra, 2002
	↗ (plasma)	Martin-Gallan, 2003
	↗ (plasma)	Mahesh, 2004
	↗ (foie)	Dias, 2005
	↗ (plasma)	Gil-del-Valle, 2005
	↗ (plasma)	Martin-Gallan, 2007
↗ (plasma)	Güzel, 2000	
Isoprostanes	↗ (plasma)	Gopaul, 1995
	→ (plasma)	Feillet-Coudray, 1999
	↗ (urine)	Davi, 1999
	↗ (plasma)	Marra, 2002
	↗ (plasma)	Hoeldtke, 2003
	↗ au diagnostic et → 12 mois plus tard (urine)	Davi, 2003
	→ (plasma)	Gleisner, 2006
<u>Dommages de l'ADN</u>		
8-OhdG	↗ (mononucléaires)	Dandona, 1996
Cassures (Comet Assay)	↗ (lymphocytes)	Collins, 1998
<u>Oxydation des protéines</u>		
AOPP	↗ (plasma)	Kalousova, 2002
	↗ (plasma)	Martin-Gallan, 2003
	↗ (plasma)	Gil-del-Valle, 2005
	→ (plasma)	Gleisner, 2006
	↗ (plasma)	Martin-Gallan, 2007
	↗ (plasma)	Kostolanska, 2009
Protéines carbonylées	↗ (plasma)	Dominguez, 1998
	→ et ↗ (plasma)	Telci, 2000
	↗ (plasma)	Martin-Gallan, 2003
AGE	→ (plasma)	Kalousova, 2002
	↗ CML (muscle soléaire)	Snow, 2009
	↗ (plasma)	Kostolanska, 2009

Tableau 7 : Marqueurs des dommages oxydatifs dans le DT1

Marqueurs	Variation (milieu)	Référence
Statut antioxydant total		
	↘ (plasma)	Asayama, 1993
	↘ (plasma)	Tsai, 1994
	↘ (plasma)	Maxwell, 1997
	↘ (plasma)	Santini, 1997
	↘ à 1 sem et ↗ à 4 sem	Feillet-Coudray, 1999
	↘ (plasma, cœur, rein, cerveau) - ↗ (foie)	Elangovan, 2000
	↘ (plasma)	Marra, 2002
	→ (plasma)	Gleisner, 2006
	↘ (plasma)	Martin-Gallan, 2007
Enzymes antioxydantes		
SOD	↘ (cerveau)	Alipour, 2012
	↗ (foie, cœur, pancréas)	Kakkar, 1995
	↗ (foie, cœur, pancréas, aorte, rein, plasma)	Kakkar, 1996, 1997, 1998
	↘ (plasma)	Atalay, 1997
	↘ (lymphocytes)	Vuvic, 1997
	↗ (plasma)	Dominguez, 1998
	→ (plasma)	Ruiz, 1999
	→ (plasma)	Telci, 2000
	↘ (plasma)	Mahesh, 2004
	↗ (foie)	Dias, 2005
	↗ (plasma)	Gil-del-Valle, 2005
	↗ (plasma)	Martin-Gallan, 2007
CAT	↘ (cerveau)	Alipour, 2012
	↗ (foie, cœur, sang)	Kakkar, 1995
	↗ (foie, cœur, pancréas, aorte, rein, plasma)	Kakkar, 1996, 1997, 1998
	↘ (plasma)	Atalay, 1997
	↘ (plasma)	Mahesh, 2004
	↗ (foie)	Dias, 2005
↗ (plasma)	Gil-del-Valle, 2005	
GPX	↘ (cerveau)	Alipour, 2012
	↗ (pancréas, rein)	Kakkar, 1995
	↗ (foie, cœur, pancréas, aorte, rein, plasma)	Kakkar, 1996, 1997, 1998
	↘ (plasma)	Dominguez, 1998
	↘ (plasma)	Ruiz, 1999
	→ (mononucléaires)	Vanderjagt, 2001
↘ (plasma)	Martin-Gallan, 2003	
Antioxydants non enzymatiques		
Vitamine E	↗ (plasma)	Tsai, 1994
	→ (plasma)	Maxwell, 1997
	↘ (plasma)	Nourooz-Zadeh, 1997
	↘ (plasma, cœur, rein, cerveau) - ↗ (foie)	Elangovan, 2000
	→ (plasma)	Vanderjagt, 2001
	↘ (plasma)	Mahesh, 2004
Vitamine C	→ (plasma)	Tsai, 1994
	↘ (plasma)	Maxwell, 1997
	↘ (sérum)	Will, 1999
	↘ (plasma, cœur, rein, cerveau) - ↗ (foie)	Elangovan, 2000
↘ (plasma)	Mahesh, 2004	
Vitamine A	↘ (plasma)	Martin-Gallan, 2003

Tableau 8 : Evolution des systèmes antioxydants dans le DT1

3.1.1 Les facteurs méthodologiques chez l'animal : importance du tissu étudié et de la durée du diabète expérimental

Si les conclusions de la littérature sont relativement univoques en ce qui concerne la présence de dommages oxydatifs chez les DT1, l'effet du diabète sur le système antioxydant est beaucoup plus controversé (Tableau 8). Deux facteurs principaux sont à prendre en compte dans l'interprétation de ces résultats : la durée entre l'induction du diabète et les prélèvements, ainsi que le tissu analysé.

Ainsi, dans le plasma, le statut antioxydant total est diminué une semaine après l'induction du diabète, mais augmenté 4 semaines après (Feillet-Coudray et al., 1999). Cette différence de résultats dans le temps est retrouvée pour les TBARS, qui sont inchangés ou augmentés une semaine après l'induction du diabète, augmentés après 4 semaines, puis reviennent à la normale au bout de 20 semaines (Higuchi, 1982). Dans les tissus (cœur, rein, cerveau), la capacité antioxydante décroît progressivement avec la durée du diabète, parallèlement à l'augmentation de la peroxydation lipidique (Elangovan et al., 2000).

Par ailleurs, Wohaieb & Godin ont examiné spécifiquement l'évolution du système antioxydant (activité de la SOD, GPX, CAT, contenu en GSH) selon les tissus (cœur, pancréas, rein et foie). D'un tissu à l'autre, les éléments du système antioxydant s'adaptent différemment, comme le montre le tableau 9. Les auteurs expliquent ces différences par le fait que le système antioxydant s'adapte en fonction de sa capacité antioxydante initiale.

	CuZn-SOD	CAT	GPX	GSH
Pancréas	↗	↗	→	→
Cœur	→	↗	→	→
Rein	↘	↘	↗	→
Foie	↘	↘	↘	↘

Tableau 9 : Evolution de différents éléments du système antioxydant selon le tissu analysé (d'après Wohaieb and Godin, 1987)

En conclusion, l'induction du diabète chez l'animal s'accompagne d'une élévation brutale du SO, (visible les premiers jours et qui persiste jusqu'à 1 semaine) qui s'atténue progressivement puis augmente à nouveau sur le long terme. En effet, l'augmentation initiale du SO déclencherait une réponse adaptative de l'organisme, qui premièrement consomme les antioxydants non enzymatiques pour lutter contre les ERO/ERN, diminuant ainsi la capacité antioxydante totale, et deuxièmement augmente au fil des semaines l'activité des enzymes antioxydantes. L'ensemble de ces réactions permet de lutter temporairement contre le SO (expliquant les résultats des études ne rapportant pas de SO dans le DT1), avant que la persistance de l'hyperglycémie n'épuise le système antioxydant et que le SO ne resurgisse à nouveau.

3.1.2 Les facteurs méthodologiques chez l'Homme : importance du contrôle glycémique et de la durée du diabète/des complications

Chez l'Homme, l'approche méthodologique diffère du modèle animal, puisque les marqueurs de SO sont étudiés dans le sang, et les analyses sont datées par rapport au diagnostic du diabète, alors que celui-ci intervient après une évolution silencieuse mais déjà durable de la pathologie.

Chez l'enfant diabétique comparé à l'enfant sain, lors du diagnostic et jusqu'à un an après environ, les marqueurs de peroxydation lipidique et les dommages aux protéines sont plus élevés (isoprostanes, hydroperoxydes et AOPP) (Davi et al., 2003), et la capacité antioxydante totale est diminuée (Martin-Gallan et al., 2007). Les différents marqueurs de SO (hydroperoxydes, isoprostanes, protéines carbonylées, AOPP) ainsi que la capacité antioxydante se normalisent ensuite, et restent similaires entre de jeunes diabétiques et des enfants sains du même âge jusqu'à cinq ans après le diagnostic (Telci et al., 2000; Davi et al., 2003; Gleisner et al., 2006; Martin-Gallan et al., 2007). Durant cette période, la mise en place du traitement à l'insuline permet de diminuer le SO, puis les dommages refont surface à long terme jusqu'à l'apparition de complications (Guzel et al., 2000; Telci et al., 2000).

Chez l'adulte, si le système antioxydant ne diffère pas selon la présence ou non de complications (Martin-Gallan et al., 2003; Catakay et al., 2000), les marqueurs de dommages des protéines et des lipides sont plus élevés chez les sujets présentant des complications (Ruiz et al., 1999; Catakay et al., 2000; Bonnefont-Rousselot et al., 2000)

Le rôle du contrôle glycémique est primordial dans la survenue du SO. Ainsi, un bon contrôle glycémique est associé à des marqueurs de dommages moindres et une meilleure activité des systèmes antioxydants, alors qu'un mauvais contrôle glycémique est synonyme de dommages accrus et d'altération des défenses antioxydantes (Griesmacher et al., 1995; Bonnefont-Rousselot et al., 2000; Hsu et al., 2006; Kostolanska et al., 2009). Par ailleurs, une prise en charge visant à améliorer le contrôle glycémique (insuline, régime, activité physique) permet de diminuer le SO en quelques semaines chez des sujets mal contrôlés (Faure et al., 1993; Wierusz-Wysocka et al., 1995). Enfin, il existe, dans de nombreuses études, une corrélation directe entre la concentration en différents marqueurs de SO (TBARS, hydroperoxydes) ou l'activité des enzymes antioxydantes et le contrôle glycémique (évalué par l'HbA1c, la fructosamine ou la glycémie à jeun) (Davi et al., 1999; Ruiz et al., 1999; Kalousova et al., 2002; Gil-del Valle et al., 2005).

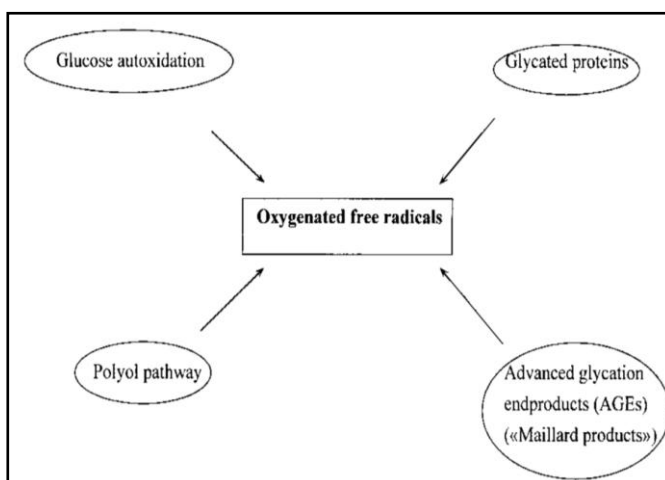
Concernant plus particulièrement le système antioxydant, les apports alimentaires en antioxydants sont également importants à prendre en compte. Ainsi, Will et al. (1999), retrouvent des concentrations sériques plus faibles en vitamine C dans la population diabétique, mais lorsque les données sont ajustées selon les apports alimentaires, cette différence disparaît. L'interprétation d'une diminution des concentrations vitaminiques doit donc être faite avec la plus grande prudence, une diminution ne traduisant pas forcément une consommation par l'organisme pour lutter contre le SO. Les apports alimentaires constituent par ailleurs un élément important dans la compréhension des systèmes antioxydants. En effet, les sujets diabétiques sont souvent astreints à un régime plus ou moins strict, et il a été démontré que ce dernier pouvait induire des carences, notamment dans les apports en antioxydants liposolubles (Rosen et al., 2001).

En conclusion, il semble que l'évolution des désordres métaboliques et le SO soient étroitement liés, un bon contrôle glycémique étant associé à un statut pro-oxydant plus faible, et réciproquement. Toutefois, même lorsque la glycémie est correctement régulée, des épisodes hyperglycémiques persistent et des dommages oxydants (mêmes modestes) continuent de se produire (Bonfont-Rousselot, 2000). Les différents mécanismes impliqués dans ce phénomène seront détaillés dans le chapitre suivant.

3.2 Mécanismes impliqués : comment le diabète augmente-t-il le SO ?

Le SO associé au DT1 résulte essentiellement de l'hyperglycémie, qui subsiste chez le diabétique même bien contrôlé. Cette relation de cause à effet entre hyperglycémie et SO a été mise en évidence *in vitro* : un excès de glucose dans le milieu de culture de cellules endothéliales (30mM vs 5mM en conditions basales) induit une augmentation de la formation des ERO de 250%, et une augmentation de la peroxydation lipidique de 330%. Ces augmentations peuvent être prévenues par l'ajout d'antioxydants (vitamine E, par exemple) dans le milieu de culture (Giardino et al., 1996). De plus, ce type de milieu hyperglycémique stimule l'expression des enzymes antioxydantes (CuZn-SOD, CAT, GPX), laissant supposer une adaptation des cellules à une situation de SO (Ceriello et al., 1996).

Par définition, l'hyperglycémie qui survient chez le DT1 est un excès de glucose dans le compartiment sanguin. Même en l'absence d'insuline, ce glucose se retrouve également en excès dans la cellule (Vaag et al., 1992), où il va être métabolisé par la mitochondrie. L'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale est donc augmentée, et de manière concomitante, la fuite d'électron qui lui est associée, à l'origine de la production d'ERO (Sivitz and Yorek, 2010). Ces derniers vont notamment perturber la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose au niveau des cellules bêta, particulièrement sensibles au SO (Green et al., 2004). Néanmoins, la production d'ERO (O_2 et H_2O_2) par les mitochondries a été rapportée inchangée chez des rats DT1 (Herlein et al., 2009), mais ces résultats étaient associés à une up-régulation des défenses antioxydantes (MnSOD, CAT, GPX) dans les différents tissus considérés (cœur, muscle squelettique, foie).



Plusieurs autres mécanismes sont impliqués dans le développement du SO en présence de concentrations élevées en glucose (Figure 18) : l'autoxydation du glucose, la glycation des protéines et la formations d'AGE, ainsi que la voie des polyols (Bonfont-Rousselot et al., 2000).

Figure 18 : Mécanismes à l'origine du SO induit par l'hyperglycémie (Bonfont-Rousselot, 2000)

3.2.1 Autoxydation du glucose

Dans les conditions physiologiques, le glucose peut subir une oxydation catalysée par les métaux de transition et conduire à un radical anionique ènediol. Ce dernier va réduire l'oxygène moléculaire et former l'anion superoxyde, avec production concomitante de composés carbonylés (céto-aldéhydes) (Thornalley et al., 1984). L'anion superoxyde se dismute et aboutit à la formation d' H_2O_2 et, en présence de métaux de transition, au radical hydroxyle (Figure 19).

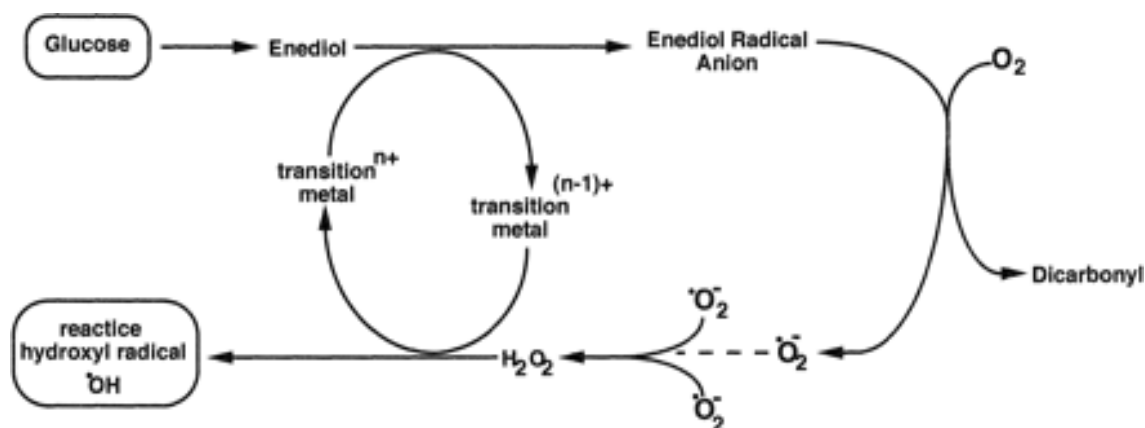


Figure 19 : Réactions à l'origine de la production d'ERO par autoxydation du glucose (d'après (Ahmed, 2005))

Les produits de l'autoxydation du glucose sont à leur tour, précurseurs d'un autre mécanisme impliqué dans l'élévation du SO en cas d'hyperglycémie : la glycation des protéines et la formation des Produits Terminaux de Glycation (PTG), plus communément appelés AGE (Advanced Glycated End-Product).

3.2.2 Glycation des protéines et formation des AGE

3.2.2.1 Mécanismes de formation

La glycation, ou réaction de Maillard⁴⁷, est une réaction chimique survenant *in vitro* et *in vivo*, qui associe par liaison covalente, la fonction aldéhyde d'un ose et une fonction amine libre et accessible d'une protéine (figure 21). La première étape de la réaction (qui survient sur une période de quelques heures), aboutit à la formation d'une base de Schiff instable ; elle est donc facilement réversible. La base de Schiff peut se redissocier en amine et en ose, ou subir une modification de la structure par translocation de la double liaison. Cette seconde étape, appelée réarrangement d'Amadori, aboutit à une céto-amine stable, et est quasiment irréversible. Elle est environ 60 fois moins rapide que la première étape (Ahmed, 2005). Par la suite, les protéines glyquées peuvent subir diverses réactions, notamment des réactions d'oxydation⁴⁸ (Baynes, 1991), pour donner des AGE⁴⁹ (Brownlee et al., 1984). Dans le cadre du diabète, l'hyperglycémie

⁴⁷car initialement décrite par Louis Camille Maillard en 1912

⁴⁸ La formation d'AGE par oxydation des produits d'Amadori est désignée par le terme de glycoxydation

⁴⁹ Egalement connus sous le terme de Produits de Maillard, leur nom provient du caractère irréversible des réactions aboutissant à leur formation.

accélère la formation des AGE. De plus, c'est essentiellement le glucose, un ose peu réactif mais qui est le plus abondant de l'organisme humain, qui va réagir avec les protéines. D'autres sucres intracellulaires, comme le glucose-6-phosphate et le fructose, peuvent également participer à la réaction de glycation, à un taux plus rapide que le glucose (Bierhaus et al., 1998). La glycation des protéines est une réaction spontanée, qui est fonction du degré et de la durée de l'hyperglycémie, de la demi-vie de la protéine, et de la perméabilité du tissu au glucose.

Dans cette succession de réactions, les produits résultants de l'autoxydation du glucose (cf paragraphe 3.2.2) peuvent être impliqués à deux niveaux (encadrés en gris sur la figure 20): lors de la première étape, les céto-aldéhydes⁵⁰ peuvent se lier au groupement lysine des protéines pour former des bases de Schiff à l'origine des AGE (Wolff and Dean, 1987), alors que les ERO (et plus particulièrement le radical hydroxyle) vont intervenir dans la troisième étape, en oxydant les produits d'Amadori pour les transformer en AGE (Hunt and Wolff, 1990). C'est le phénomène de glycosylation autoxydative (glycation à partir de l'autoxydation du glucose).

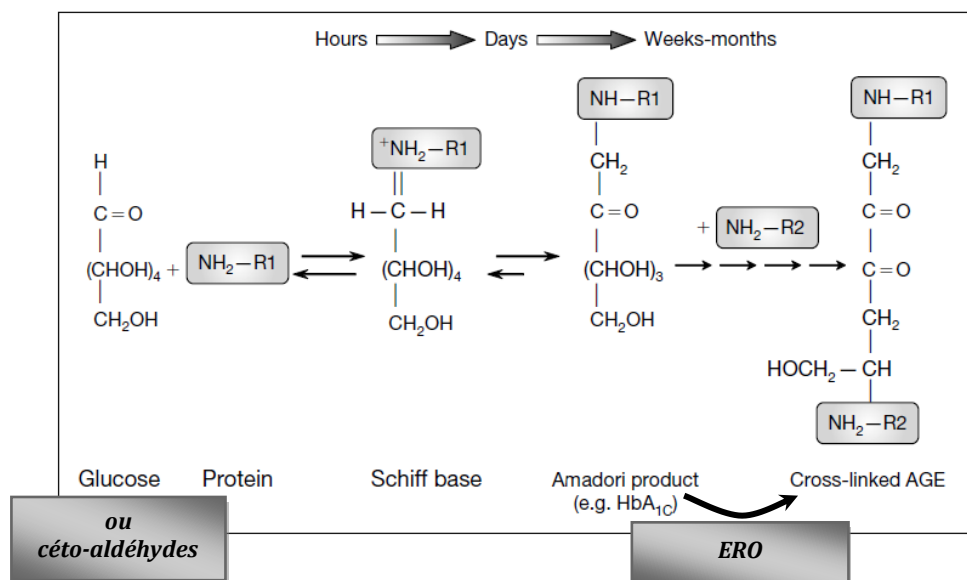


Figure 20 : Mécanismes de formation des AGE (Aronson, 2008)

Un point important dans la réaction de Maillard est la formation, au cours des deux premières étapes, de composés intermédiaires réactifs, les α -dicarbonyles (ou oxoaldéhydes) (Thornalley et al., 1984). Parmi eux, les plus importants sont le glyoxal, le 3-deoxyglucosone (3-DG) et le méthylglyoxal (MGO) (Baynes and Thorpe, 1999). Leur particularité est de pouvoir réagir à nouveau avec une fonction amine, entretenant un cercle délétère dans la formation d'AGE. L'accumulation de ces composés carbonylés précurseurs d'AGE, provenant de différentes sources (réaction de Maillard, voie des polyols, peroxydation lipidique), a été définie par le terme de Stress Carbonylé (voir Miyata et al., 1999) (Suzuki and Miyata, 1999). La distinction entre SO et stress carbonylé vient de la nature des produits carbonylés formés, c'est à dire s'ils proviennent respectivement de réactions oxydatives (cas de la CML, par exemple, à droite sur la

⁵⁰ Aldéhyde de la forme $\text{R}-\text{CO}-\text{CHO}$, porteur de la fonction cétone

figure 21) ou de réactions non-oxydatives (cas du méthylglyoxal, à gauche sur la figure 21) (Baynes and Thorpe, 1999).

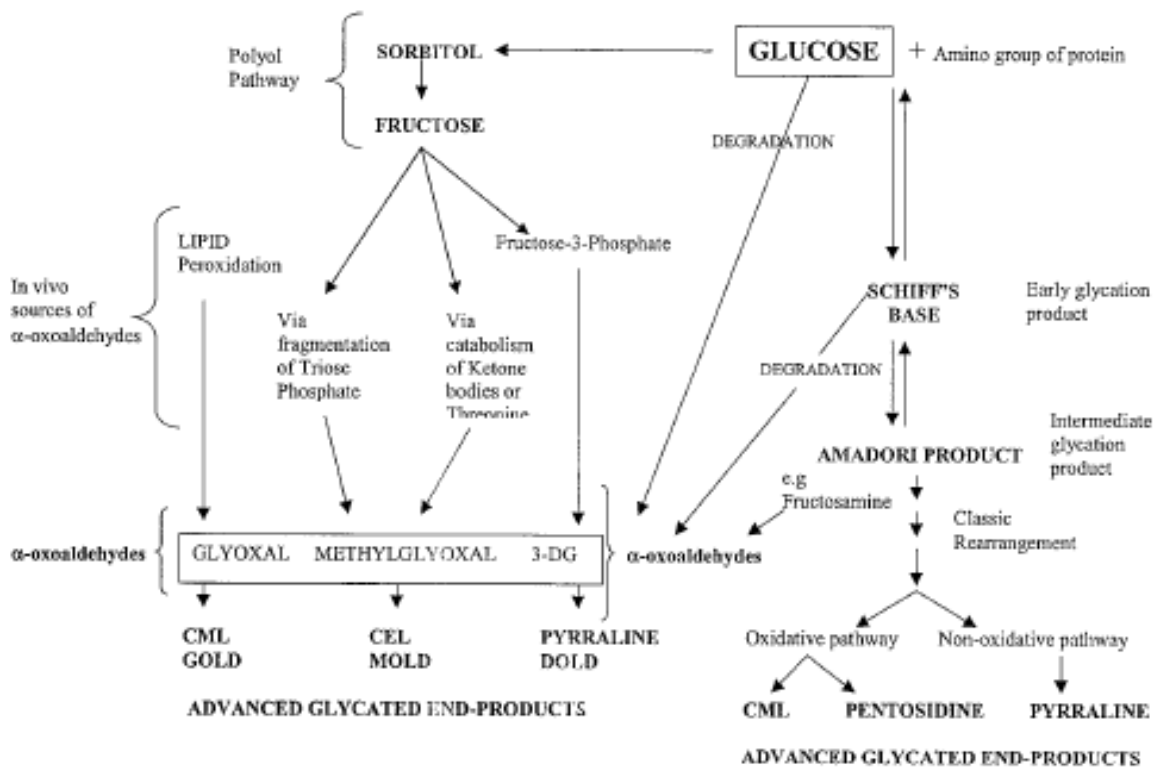


Figure 21 : Formation des AGE et Stress Carbonylé (Singh et al., 2001)

En dehors des phénomènes physiologiques, les AGE peuvent être apportés par l'alimentation, puisque la réaction de Maillard se produit dans les aliments notamment lorsqu'ils sont chauffés (Singh et al., 2001).

3.2.2.1 Les AGE augmentent le SO

Ce n'est pas la glycation des protéines en elle-même qui élève le SO, mais les conséquences ultérieures de cette glycation (Bonnetfont-Rousselot et al., 2000). Les protéines glyquées peuvent notamment donner un électron à l'oxygène moléculaire, formant ainsi des radicaux libres (Gillery et al., 1988; Sakurai and Tsuchiya, 1988). Ceux-ci accélèrent en retour la formation des AGE, par le processus de glycoxydation (Baynes, 1991). Les produits de glycoxydation, tels que la CML ou la pentosidine, sont considérés comme des marqueurs du SO dans le diabète, car ils sont une sous-classe des AGE formée spécifiquement par réaction d'oxydation.

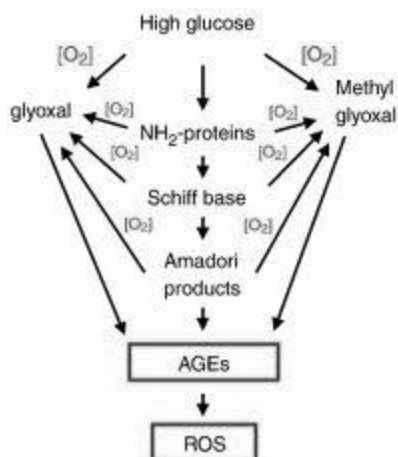


Figure 22 : Génération d'ERO lors des différentes étapes de la réaction de glycation

La glycation des protéines augmente également le SO de manière indirecte, en altérant différents éléments du système antioxydant. Plusieurs études ont rapporté des résultats contradictoires entre l'expression des enzymes antioxydantes et leur niveau d'activité : l'expression des enzymes antioxydantes est augmentée dans le diabète dans différents tissus -notamment le rein (Reddi and Bollineni, 1997; Limaye et al., 2003) ou les cellules endothéliales (Ceriello et al., 1996)-, alors que leur activité est diminuée (Reddi and Bollineni, 1997; Limaye et al., 2003; Sindhu et al., 2004). Ces différences suggèrent l'existence de modifications post-traductionnelles qui inactiveraient les enzymes, et aboutiraient à la diminution de leur activité malgré leur surexpression. La glycation est la principale de ces modifications. En effet, sur une protéine, la fixation de la fonction aldéhyde peut avoir lieu sur deux sites différents : l'acide aminé N-Terminal de la protéine, ou le groupement amine d'un résidu de lysine de la chaîne protéique. Dans ce dernier cas, lorsque la protéine considérée est une enzyme, la modification conformationnelle peut entraîner, par exemple, une perte d'affinité pour son substrat.

Les travaux s'intéressant à la glycation des enzymes antioxydantes ont porté principalement sur la SOD. Quelques uns se sont intéressés également à la GPX. Concernant la GPX, le site de glycation mis en évidence par Baldwin et al. (1995), se situe à proximité du site actif et peut interagir avec ce dernier. L'hypothèse d'une inactivation de l'enzyme a donc été émise et indirectement confirmée par Miranda et al., (2007), qui rapporte une diminution de l'activité de la GPX lorsqu'elle est incubée avec du glucose (diminution proportionnelle à la concentration du glucose dans le milieu).

Concernant la SOD, l'impact de la glycation est différent selon l'isoforme considérée⁵¹. Ainsi, la glycation de la SOD extracellulaire est associée à une diminution de son affinité pour l'héparine (or elle est fixée à l'endothélium via l'héparine) mais sans modifier son activité intrinsèque (Adachi et al., 1991). Toutefois, Ciechanowski et al. (2005) observent chez des patients diabétiques une diminution d'activité de l'EC-SOD

⁵¹ Chez l'Homme, il existe trois isoformes de la SOD : deux sont de type Cuivre-Zinc (SOD1 et SOD3), la troisième de type Manganèse (SOD2). La SOD1 (ou EC-SOD) est une protéine extracellulaire tétramérique, qui se lie à la surface des membranes cellulaires pour protéger les cellules du SO exogène. La SOD2 (ou Mn-SOD) est situé au niveau de la mitochondrie, qu'elle protège du SO généré par la chaîne respiratoire mitochondriale. La SOD3 (ou CuZn-SOD) est un dimère localisé dans le cytoplasme

en réponse à une injection d'héparine. Mais cette diminution apparente résulte en fait d'une proportion plus importante d'EC-SOD sous sa forme glyquée, qui se fixe moins bien à l'héparine. De plus, la diminution d'activité observée n'est pas due à une diminution de synthèse de l'EC-SOD. Cela signifie donc que dans le diabète, il y a moins de SOD fixée à l'endothélium, et que ce dernier est plus exposé aux dommages causés par les ERO produits dans l'espace extracellulaire (Bonnefont-Rousselot et al., 2000). La glycation de la CuZn-SOD, par contre, inhibe son activité catalytique vis à vis de l'anion superoxyde (Arai et al., 1987). Les sites de glycation identifiés se situent au niveau des résidus lysine 122 et 128, localisés dans le site actif (Arai et al., 1987). Chez des enfants DT1, le pourcentage de SOD glyquée a été évalué à 40%, alors qu'il n'est que de 8% chez des enfants ou des adultes sains (Kawamura et al., 1992). La glycation de la CuZn-SOD altère donc considérablement l'activité du système antioxydant, et notamment la neutralisation de l'anion superoxyde. Par ailleurs, il a été démontré que le méthylglyoxal, au même titre que le glucose, pouvait réagir avec la CuZn-SOD en la glyquant et l'inactivant (Kong, 2003). Les composés carbonylés en général (et notamment le glyoxal et le méthylglyoxal) ont une capacité supérieure au glucose à initier une réaction de glycation sur différentes enzymes intracellulaires, et donc à les inactiver (Morgan et al., 2002). Ils sont également capables, même à faible dose, d'entraîner une déplétion du GSH dans le sang, une intolérance au glucose, et une plus faible capacité de défense face au SO (Ankrah and Appiah-Opong, 1999).

3.2.3 Voie des polyols

A des concentrations anormalement élevées, le glucose intracellulaire est préférentiellement métabolisé par la voie des polyols. Le glucose est réduit par l'aldose réductase en sorbitol, qui est oxydé en fructose par la sorbitol-déshydrogénase (figure 24). Cette activation de la voie des polyols contribue à augmenter le SO : elle en est même la première source dans la lentille et les nerfs, tissus fortement touchés par les complications, chez des souris diabétiques. Différents mécanismes, représentés sur la figure 23, contribuent en effet à augmenter le SO. L'action de l'aldose-réductase nécessite du NADPH, et par conséquent, l'activation de la voie des polyols aboutit à une déplétion intracellulaire en NADPH (Lee and Chung, 1999). Celui-ci ne peut donc plus être utilisé par la glutathion-réductase pour régénérer le glutathion oxydé en glutathion réduit. Or, ce dernier constitue un facteur de protection important contre les dommages induits par le SO. Par ailleurs, la déplétion en NADPH a pour conséquence une diminution de la synthèse de NO, le NADPH étant co-facteur des NOS (Bonnefont-Rousselot, 2000). A l'inverse, l'augmentation de NADH active la NADPH-oxydase, qui produit des ERO. Enfin, il semble que le principal effet délétère de la voie des polyols soit lié à la formation de métabolites du fructose (le fructose-3-phosphate et le 3-deoxyglucosone). Ceux-ci participent en effet à la formation des AGE, mais sont, dans ce cadre, beaucoup plus réactifs que le glucose lui-même, amplifiant largement le phénomène de glycation (Chung et al., 2003).

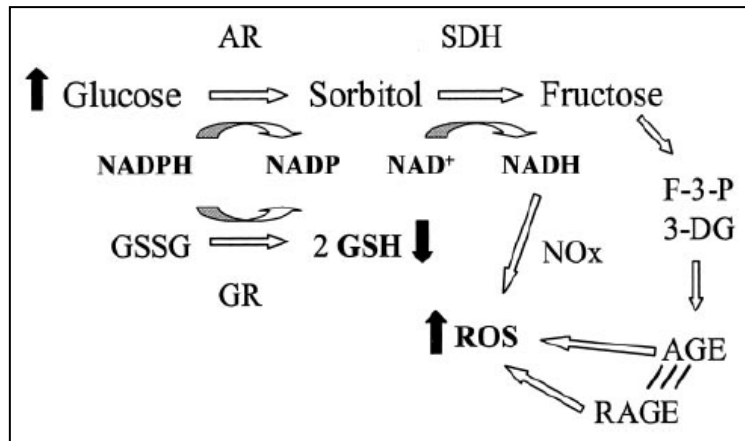


Figure 23 : Mécanismes d'induction du SO par la voie des polyols (Chung et al., 2003) .

3.2.4 Les sources d'ERO/ERN dans les cellules vasculaires

Il existe de nombreuses sources d'espèces réactives qui ont été abordées en détail dans le paragraphe 1 de ce chapitre. En plus des mécanismes spécifiques au diabète présentés ci-dessus, trois sources sont particulièrement importantes dans le cadre des complications vasculaires (figure 25), assurant à ce niveau l'essentiel de la production des ERO/ERN inactivant le NO. Il s'agit des enzymes NADPH-oxydase, NO-Synthase, et xanthine oxydase, dont le fonctionnement a été présenté dans l'encadré 7 (les sources d'espèces réactives), et dont l'activité est stimulée dans le cadre du DT1.

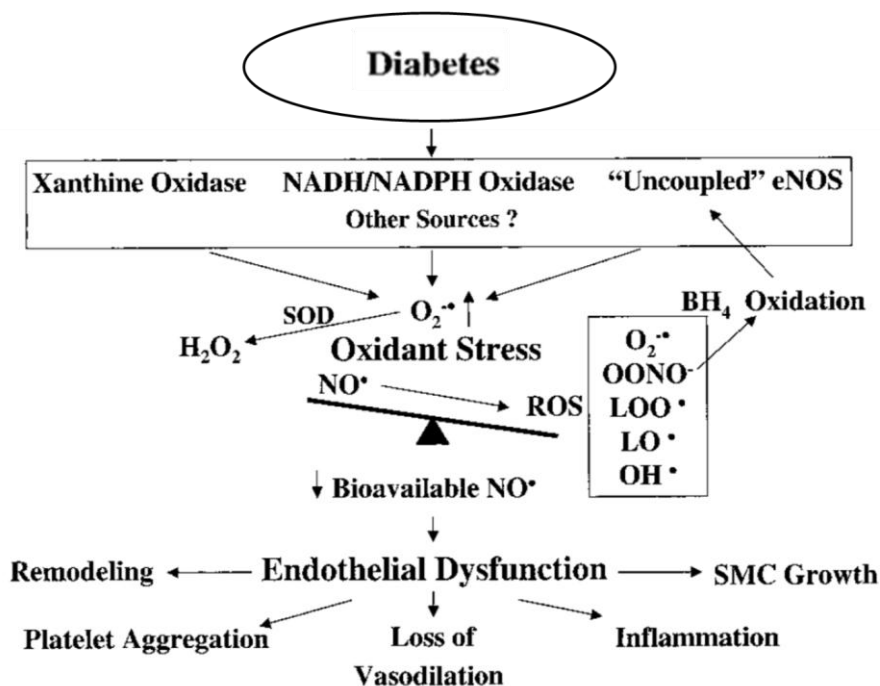


Figure 24 : Voies de production des ERO/ERN impliquées dans les complications vasculaires induites par le diabète de type 1 (Cai and Harrison, 2000)

3.2.4.1 La NADPH-oxydase

La NADPH-oxydase (NOX) vasculaire est une enzyme transmembranaire située dans les organites intracellulaires. Lorsqu'elle est activée, elle transloque vers la membrane, où elle forme avec ses sous-unités p22^{phox}, p67^{phox}, p47^{phox} et p40^{phox}, le complexe NOX. Celui-ci a pour rôle de prendre en charge, à travers la membrane des organites, les électrons provenant du NADPH, et ce faisant génère de l'anion superoxyde dans le cytosol (Sumimoto, 2008).

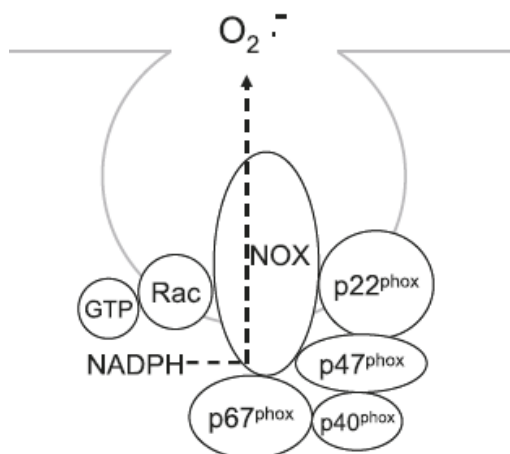


Figure 25 : Le complexe NOX (Shen, 2010)

La NOX joue alors un double rôle selon son niveau d'activation. Une activation transitoire, responsable d'une production basale d'ERO, participe à la signalisation redox en up-régulant les systèmes de défenses antioxydants, notamment en stimulant la voie Keap1-Nrf2⁵². Mais à l'inverse, une activation prolongée de la NOX (comme dans le diabète), s'accompagne d'une surproduction d'ERO, associée à des dysfonctions mitochondriales, une déplétion en NADPH et un découplage de la eNOS (Gao and Mann, 2009). Chacun de ces trois phénomènes va lui-même être à la cause d'un renforcement du SO, générant un cercle vicieux : les dysfonctions mitochondriales augmentent les fuites d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, et donc la production d'ERO; la déplétion en NADPH bloque la régénération du GSH, perturbant le bon fonctionnement du système antioxydant; et le découplage de la eNOS favorise la production d'anion superoxyde au détriment du NO, selon des mécanismes détaillés dans le chapitre suivant. De plus, la NOX est soupçonnée d'intervenir dans la stimulation du NF-kB et des voies de signalisation pro-oxydantes qui lui sont associées (Shen, 2010).

L'hyperglycémie associée au diabète augmente l'activation et/ou l'expression de la NOX et de ses cofacteurs dans les cellules endothéliales, par différents mécanismes. Les AGE, notamment, mais également les LDL oxydés (Zhao et al., 2009) activent la NOX dans les cellules endothéliales et stimulent

⁵² Nrf2 est un facteur de transcription qui, en se fixant sur « l'Elément de la Réponse Antioxydante » (Antioxidant Response Element [ARE] en anglais), active l'expression de gènes codant pour des protéines antioxydantes. En conditions basales, il est maintenu inactif par sa liaison avec Keap1 dans le cytosol, inhibition levée par les ERO résultant de l'activité de la NOX.

ainsi la production d'espèces oxydantes (Li and Renier, 2006). L'activité de la NOX est également stimulée par la protéine kinase C (PKC), spécifiquement activée dans le diabète (cf 4.2.2).

3.2.4.2 La NOS

La NO-synthase (NOS) est l'enzyme responsable de la production du NO à partir d'arginine. Tout comme pour la NOX, il existe différentes isoformes de NOS présentées en détail dans l'encadré 11. La NOS endothéliale (eNOS), qui fonctionne spécifiquement au niveau vasculaire, se présente sous la forme d'un homodimère, et a pour particularité de fonctionner selon deux modes : couplé (mode physiologique, figure 26A) ou découplé (mode pathologique, figure 26B). On parle alors du découplage de la NOS (Vasquez-Vivar et al., 2003). En mode couplé, si l'apport en tétrahydrobioptérine (BH4) et en arginine est suffisant, les deux sous-unités oxygénases de l'enzyme fonctionnent ensemble et produisent du NO à partir de l'arginine, grâce au flux d'électrons. Mais en mode découplé (en absence de BH4 et/ou d'apport suffisant en arginine), les deux sous-unités oxygénases de la eNOS fonctionnent indépendamment et produisent simultanément du NO et de l'anion superoxyde. Ces deux entités réagissent ensemble pour former de l'ONOO-, puissant pro-oxydant.

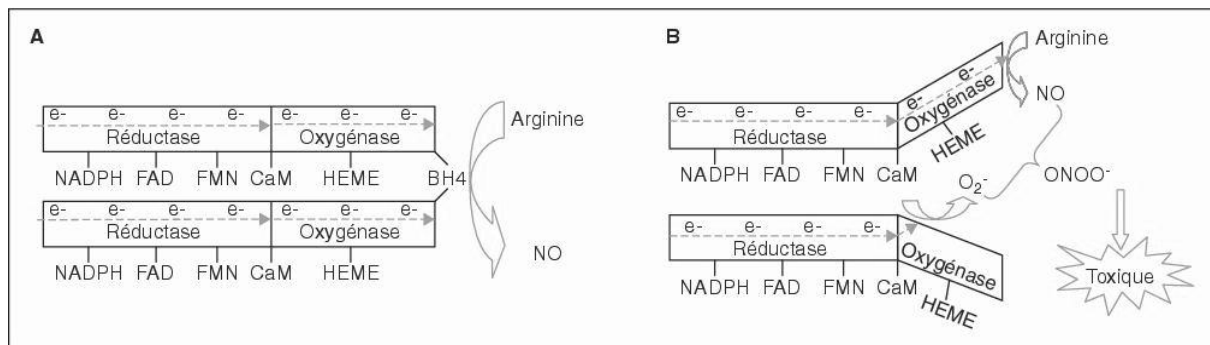


Figure 26 : Découplage de la NOS à l'origine de la production de peroxynitrites (Rasmussen et al., 2005)

Dans le cadre du DT1, le découplage de la NOS est notamment causé par l'activation de la NOX. Si cette activation constitue l'élément déclencheur de la production d'ERO/ERN dans les cellules vasculaires, c'est d'ailleurs la stimulation concomitante de la NOS qui assure en réalité l'essentiel de la production d'O₂⁻ (Oak and Cai, 2007). La surproduction d'ERO/ERN résultant initialement de l'activation de la NOX est en effet associée à un découplage de la NOS endothéliale, qui produit alors d'une part de l'anion superoxyde, et de l'autre du NO, aboutissant immédiatement à des peroxynitrites hautement toxiques (Rasmussen et al., 2005). Les peroxynitrites vont eux-mêmes renforcer le découplage de la NOS, en oxydant le BH4, cofacteur essentiel qui conduit au découplage lorsqu'il est absent (Milstien and Katusic, 1999).

3.2.4.3 La xanthine oxydase

La xanthine oxydase (XO) a pour caractéristique d'utiliser l'oxygène comme accepteur d'électrons, générant ainsi de l'anion superoxyde. Chez des rats DT1, l'activité plasmatique de la XO est augmentée, et est corrélée à la concentration d'O₂⁻ (Matsumoto et al., 2003). Toutefois, les mécanismes à l'origine de

l'activation de la XO dans le diabète ne sont pas clairement établis. L'inhibition de la XO par l'oxypurinol ne permet pas de réduire la production d'O₂^{•-} associée à l'hyperglycémie, suggérant que la XO n'est pas directement impliquée dans la production d'ERO/ERN induite par l'hyperglycémie (Shen, 2010). Son inhibition permet tout de même d'améliorer la vasomotricité endothéliale-dépendante, altérée dans le diabète, à la fois chez l'animal (Inkster et al., 2007) et l'Homme (Dogan et al., 2011).

Le SO associé au DT1 résulte essentiellement de l'hyperglycémie, bien évidemment présente chez l'animal non traité à l'insuline, mais qui subsiste également plus ou moins fréquemment chez l'Homme diabétique, même bien contrôlé. L'hyperglycémie active différents mécanismes producteurs d'ERO/ERN. Dans un premier temps, ces espèces oxydantes vont stimuler l'expression des enzymes antioxydantes, protégeant l'organisme des attaques radicalaires. Mais à long terme, cette réponse adaptative et protectrice semble disparaître, permettant une augmentation des dommages oxydatifs et le développement de complications, dont les mécanismes seront abordés dans le paragraphe suivant. Cette disparition de la réponse adaptative, aspect central dans la physiopathologie des complications diabétiques, résulterait du phénomène de glycation, qui en plus de produire des espèces oxydantes, inactiverait certaines des enzymes antioxydantes. Toutefois, le phénomène de glycation des enzymes antioxydantes n'a été que très peu étudié dans la littérature.

4 Implication du SO dans les complications diabétiques

4.1 Les modifications de la balance pro/antioxydante sont associées à la survenue de complications chez le DT1 : mise en évidence dans la littérature

Les données de la littérature montrent clairement que l'élévation chronique du SO observée chez les diabétiques est associée à la présence de complications. Les protéines carbonylées et les hydroperoxydes lipidiques sont significativement supérieurs chez des DT1 présentant des complications comparés à ceux n'en ayant pas (Cakatay et al., 2000).

Dès l'apparition des complications, les marqueurs de SO sont plus élevés que chez les diabétiques non-complicés, suggérant un rôle du SO dans la survenue de celles-ci. Chez des diabétiques présentant une microangiopathie récemment diagnostiquée (depuis moins de 6 mois), les protéines carbonylées et les AOPP sont déjà élevées, et le rapport α -tocophérol/lipides totaux est diminué (Martin-Gallan et al., 2003). Au premier stade de la néphropathie diabétique (hyperfiltration glomérulaire), les TBARS et les protéines carbonylées plasmatiques sont également déjà augmentées (Hernandez-Marco et al., 2009).

Encadré 11 - Le °NO et les dysfonctions endothéliales

Présentation

Le °NO est un gaz inorganique possédant un électron libre, caractéristique des radicaux libres, et donc très réactif. Sa demi-vie est très courte (quelques secondes), et est rapidement converti en nitrite et nitrate, plus stables. De par son caractère lipophile et son faible poids moléculaire, le °NO diffuse rapidement à travers les parois cellulaires.

Synthèse

Le °NO est synthétisé à partir d'un acide aminé précurseur, la L-arginine, selon une réaction d'oxydation catalysée par la NO synthase (NOS). Il existe trois isoformes de la NOS : la forme endothéliale, la forme neuronale, et la forme inducible.

La **eNOS** est une enzyme constitutive, régulée par le calcium. Elle n'est pas soluble dans le cytosol, mais plutôt liée à la membrane des cellules ou à la paroi vasculaire. L'expression de la protéine eNOS est up-régulée par l'entraînement (Andrew et Mayer, 1999), mais diminuée par l'hypoxie, le TNF-alpha et une forte concentration de LDL oxydées (Wheatcroft et al., 2003).

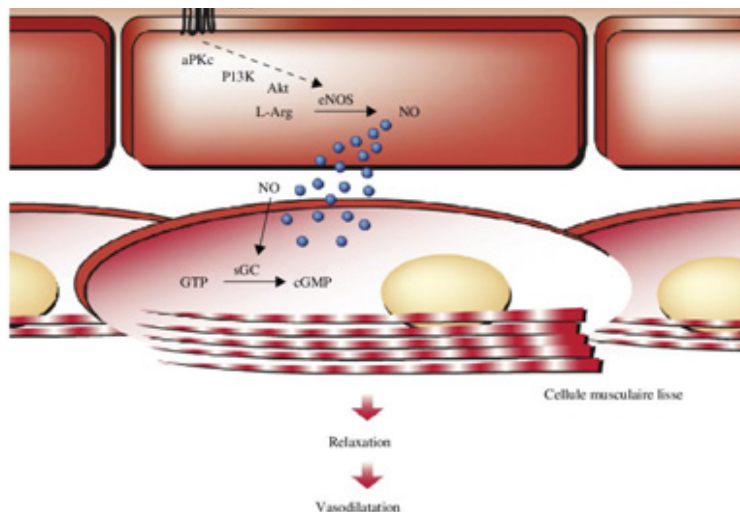
La **nNOS**, forme neuronale constitutive et dépendante du calcium comme la eNOS, est soluble dans le cytosol des cellules neuronales. L'enzyme nNOS diffère des autres isoformes par sa rapidité à catalyser l'oxydation du NADPH, causant ainsi le découplage de l'enzyme, qui produit alors de l'anion superoxyde.

La **iNOS** est soluble dans le cytosol des cellules. Contrairement aux deux autres isoformes, elle n'est pas constitutive mais inducible par différents stimuli, notamment par les cytokines dans le cadre de la réaction inflammatoire. Elle peut aussi être induite par des AGL à longues chaînes, ou par de fortes concentrations de glucose. A l'inverse, l'entraînement diminue l'expression et l'activité de la iNOS dans le muscle (Song et al., 2009).

Fonctionnement physiologique des NOS

La formation de NO diffère selon l'isoforme de NOS activée et provoque des effets différents selon le tissu impliqué. Ainsi, le NO produit par la nNOS a un rôle de neurotransmetteur, et interviendrait dans le développement des neurones. Le NO produit en grande quantité par l'isoforme iNOS agit quant à lui comme agent cytotoxique et antimicrobien.

Le rôle principal du NO dans l'organisme est toutefois la régulation du tonus vasculaire, via l'endothélium, que l'on nomme relaxation endothélium-dépendante. Le NO est dans ce cas produit par la eNOS. Une fois synthétisé, le NO diffuse librement à travers les membranes cellulaires. Au niveau des cellules musculaires lisses (responsables de la vasomotricité), il se lie à la guanylate cyclase, qui produit alors de grandes quantités de GMPc (guanosine 5'-monophosphate cyclique), aux propriétés vasorelaxantes.



Voie de synthèse du NO par l'enzyme NOS dans la cellule productrice et activation du GMPc dans la cellule réceptrice

Par ailleurs, le NO inhibe la production et la libération de plusieurs facteurs endothéliaux vasoconstricteurs, et notamment le plus puissant, l'endothéline-1. Il diminue également la perméabilité endothéliale.

Son rôle dépasse cependant son potentiel vasoactif et modulateur du débit sanguin, puisqu'il contrôle par ailleurs l'agrégation des plaquettes, l'adhésion des leucocytes, la prolifération cellulaire des muscles lisses, la transmission synaptique, les actions cytotoxiques des macrophages, l'apoptose des cellules endothéliales, les thromboses ainsi que l'angiogénèse (Taddei et al., 2003 ; Aliev et al. 2000).

Encadré 11 - Le °NO et les dysfonctions endothéliales

Les dysfonctions endothéliales

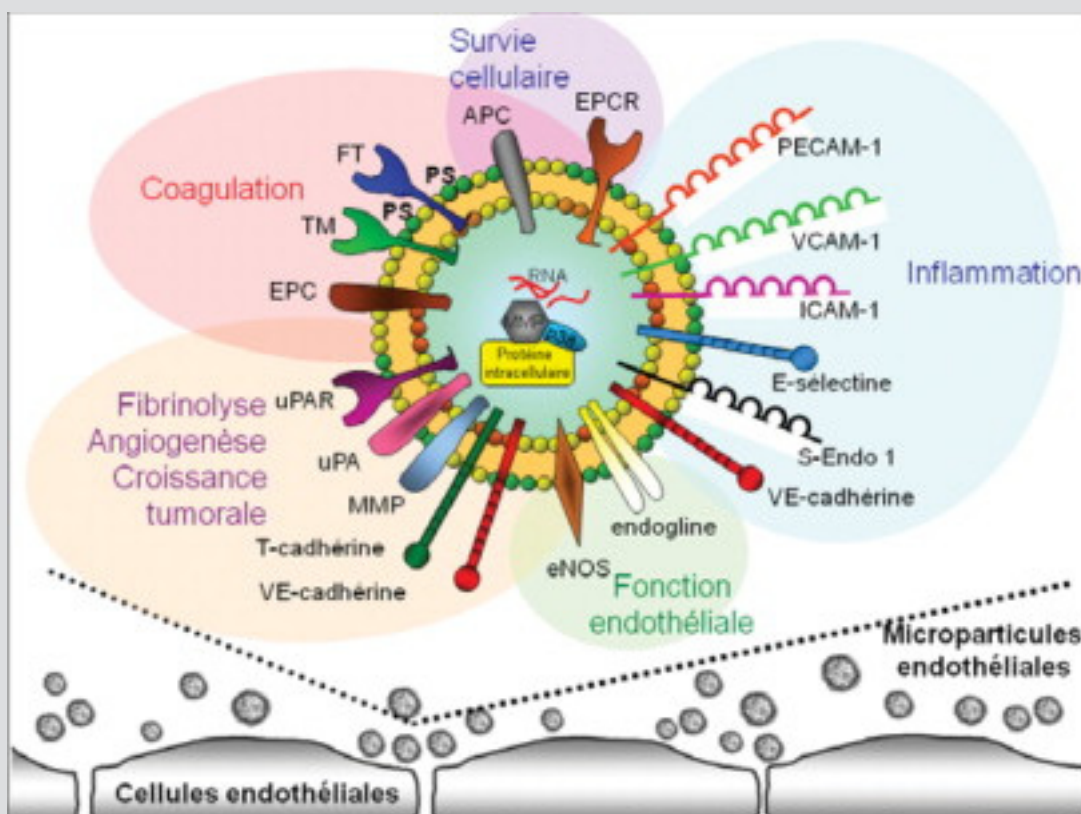
L'expression «dysfonctions endothéliales» est un terme plus ou moins bien défini qui fait référence à une perte des fonctions régulatrices normales de l'endothélium. Elle traduit un déséquilibre entre les facteurs relaxants et contractants, les facteurs pro-coagulants et anticoagulants et les médiateurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires.

Toutefois, dans la littérature, ce terme est utilisé le plus souvent pour désigner une altération de la vasorelaxation endothélium-dépendante, résultant d'une diminution de la biodisponibilité du °NO dans la paroi vasculaire. Cette forme de dysfonctions endothéliales a une forte valeur pronostic, car elle prédit la survenue à long terme d'accidents cardiovasculaires.

La réduction de la biodisponibilité du °NO résulte de deux mécanismes qui surviennent simultanément dans le DT1 : une diminution de sa production et une augmentation de sa dégradation. La baisse de la production de °NO peut notamment résulter soit d'une réduction de l'expression et/ou de l'activité de la eNOS, soit d'une réduction de la disponibilité de son substrat et/ou de cofacteurs essentiels à sa production. L'augmentation de sa dégradation, à l'inverse, résulte essentiellement de sa liaison avec l'anion superoxyde, ce qui inactive le °NO en produisant des peroxy-nitrites. L'anion superoxyde réagit, en effet, trois fois plus vite avec le °NO qu'avec la SOD, qui doit normalement le prendre en charge.



De part les nombreux autres rôles du °NO, une baisse de sa biodisponibilité s'accompagne également de nombreuses altérations qui vont mener à l'athérosclérose (encadré 12 - l'athérosclérose). Le °NO interfère en effet avec plusieurs événements clés du développement de l'athérosclérose, dont l'adhésion et l'agrégation des plaquettes, l'adhésion des leucocytes et des monocytes à la surface des cellules endothéliales des parois vasculaires et dans l'expression des molécules pro-inflammatoires, telles que les protéines d'adhésion cellulaires vasculaires (VCAM-1, Vascular cell adhesion molecule-1) et la protéine chimioattractante monocytaire-1 (MCP-1, Monocytaire chemoattractant protéine-1).



4.2 Rôle du SO dans les complications vasculaires

Le DT1 est associé, sur le long terme, à de nombreuses complications, notamment des complications cardiovasculaires (chapitre 1, paragraphe 3). Celles-ci débutent par des dysfonctions endothéliales qui conduisent progressivement à l'athérosclérose, dont les mécanismes sont détaillés dans les encadrés 11 et 12.

Ces mécanismes sont activés essentiellement par un seul et même facteur résultant de l'hyperglycémie : le SO. Ce dernier est à l'origine des complications en augmentant la production d'AGE, en activant la PKC, et en augmentant la voie des hexosamines.

L'anion superoxyde serait le dénominateur commun à tous ces mécanismes, puisque qu'une injection de SOD inhibe le signal enregistré par RPE de façon dose-dépendante, chez des rats diabétiques (Sano et al., 1998).

4.2.1 L'implication des AGE dans les complications

La formation d'AGE, dont on a vu précédemment qu'elle était augmentée dans le diabète, cause des dommages aux cellules par trois mécanismes principaux (Brownlee, 1995) : la glycation de protéines impliquées dans la régulation des facteurs de transcription, une altération du collagène composant la matrice extracellulaire, ce qui va modifier les propriétés physiques des vaisseaux, et la fixation des AGE sur des récepteurs spécifiques, les Récepteurs aux AGE (RAGE).

Au niveau intracellulaire, la glycation peut toucher des protéines impliquées dans la régulation de la transcription de gènes participant au fonctionnement physiologique des vaisseaux. Il a ainsi été démontré, au sein des cellules endothéliales, que l'hyperglycémie induisait la glycation des facteurs de croissance du fibroblaste (Fibroblast Growth Factor - FGF), ce qui diminuait leur activité mitogénique (Giardino et al., 1994). Or, le rôle des FGF est de réparer les dommages cellulaires. Une diminution de leur activité suite à leur glycation pourrait donc se traduire par une hypersensibilité des cellules endothéliales aux différents stress, ce qui précipiterait leur mort (Baynes, 1994).

Les AGE peuvent ensuite diffuser à l'extérieur de la cellule et interagir avec la matrice extracellulaire, notamment avec le collagène qui la compose. Le collagène étant la protéine la plus importante quantitativement dans l'organisme, elle est particulièrement touchée par la glycation. Or, le phénomène de réticulation⁵³ va perturber les propriétés physiques du collagène, notamment ses propriétés élastiques. Cela entraîne une rigidité accrue des membranes vasculaires et un épaississement de la membrane basale, participant à la survenue de l'athérosclérose (Singh et al., 2001).

Enfin, les AGE circulant dans le compartiment extracellulaire peuvent se lier à leurs récepteurs spécifiques. Différents types de récepteurs aux AGE ont été identifiés : les récepteurs de type I et II, les récepteurs aux AGE (RAGE), la transférase⁴⁸ oligosaccharyle (AGE-R1), la phosphoprotéine 80K-H (AGE-

⁵³ Création de liaison entre différents groupements ou atomes d'une molécule, donnant une structure tridimensionnelle à cette dernière. La réticulation est une caractéristique structurale des AGE.

R2) et la galectine-3 (AGE-R3) (Stitt et al., 1997). Ces récepteurs sont exprimés par diverses cellules, incluant les macrophages et monocytes, les cellules endothéliales ou les cellules musculaires lisses, et leur expression est augmentée dans le diabète (Bierhaus et al., 1998). Le récepteur le plus étudié est le RAGE, localisé dans les cellules endothéliales, et notamment dans les zones d'athérosclérose (Schmidt et al., 1996). Le rôle des RAGE dans les complications diabétiques a été démontré par l'utilisation d'un inhibiteur du récepteur : cela permet de réduire la perméabilité vasculaire et de supprimer la formation des lésions vasculaires, sans modifier par ailleurs le métabolisme glucidique ou lipidique (Schmidt et al., 1999). La liaison AGE-RAGE au niveau des macrophages induit un SO et active le facteur de transcription NFkB. Ce dernier déclenche une cascade de réactions présentée sur la figure 27 (Singh et al., 2001).

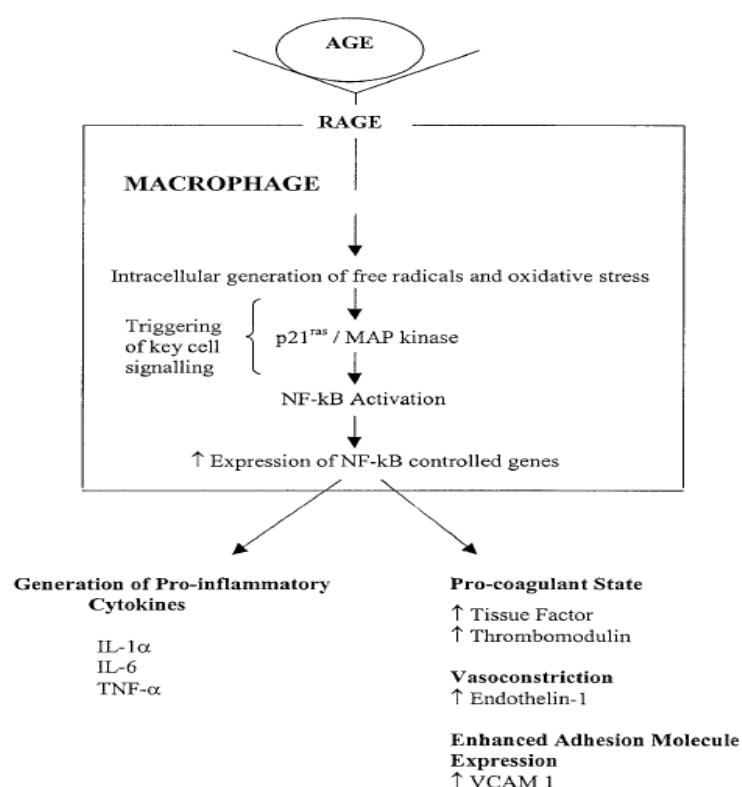


Figure 27 : Liaison AGE-RAGE et activation du NF-kB, conduisant à un SO, une vasoconstriction et un état procoagulant (Singh, 2001)

La voie du NF-kB est impliquée dans les complications diabétiques de plusieurs manières: 1) elle active la transcription de gènes impliqués dans la vasomotricité et la fonction vasculaire (endothéline-1, VCAM-1 et thrombomoduline (Bierhaus et al., 1998)⁵⁴); 2) elle est suspectée d'intervenir dans la déplétion en antioxydants induite par les AGE (diminution du glutathion, de la vitamine C et du NO (Bierhaus et al., 1997)), créant un cercle vicieux renforçant les autres mécanismes délétères évoqués ici; et 3) elle est à

⁵⁴ L'implication de ces différents éléments dans les complications diabétiques est détaillée dans l'encadré 12 (l'athérosclérose)

Encadré 12 - L'athérosclérose

Définition de l'OMS :

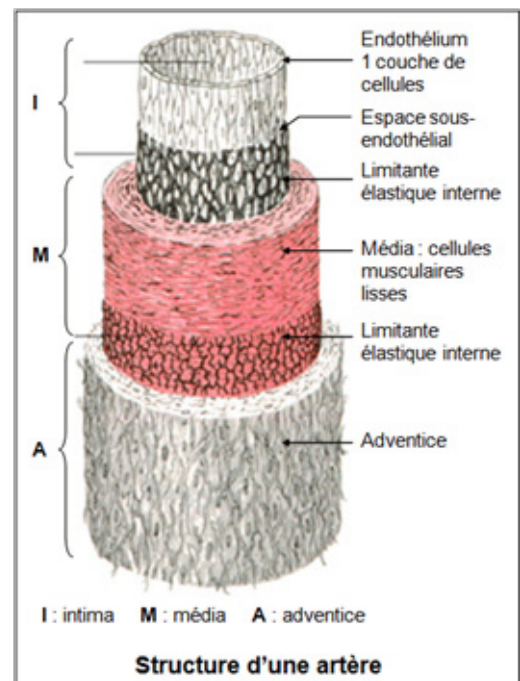
«L'athérosclérose est une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôt calcaires ; le tout s'accompagnant de modifications de la media.» (OMS, 1954).

L'athérosclérose est liée à de multiples facteurs, génétiques et environnementaux, qui interviennent plus comme facteurs de risque que comme causes directes. En 1994, Stary et al. proposent une classification en 7 stades :

TYPE LÉSIONNEL	TERME PROPOSÉ	DESCRIPTION
I	Macrophages spumeux isolés	Macrophages spumeux isolés dans l'intima. Absence de lipides extracellulaires.
II	Strie lipidique	Couches de macrophages spumeux. Cellules musculaires lisses dans l'intima chargées de lipides. Fines particules lipidiques extracellulaires disséminées.
III	Préathérome	Modifications de type II associées à de multiples dépôts lipidiques extracellulaires formant de petits agrégats.
IV	Athérome	Modifications de type II associées à de multiples dépôts lipidiques extracellulaires massifs et confluents (noyau lipidique).
V	Plaque athéroscléreuse	Modifications de type IV associées à des dépôts massifs de collagène (chape fibreuse) recouvrant le noyau lipidique (type Va), avec calcifications (type Vb).
VI	Plaque athéroscléreuse compliquée	Modifications de type V avec rupture de la chape fibreuse (VIa), hémorragie intraplaque (VIb) ou thrombose (VIc).
VII	Plaque fibreuse	Épaississement massif de l'intima par sclérose collagène ; lipides intra- et extracellulaires absents ou présents en quantité négligeable.

Rappels sur la structure des vaisseaux

Pour comprendre les nombreux et complexes mécanismes qui provoquent la formation d'un ou plusieurs athéromes (donc l'athérogenèse qui mène à l'athérosclérose), il faut d'abord avoir une idée assez précise de la structure des artères. La paroi artérielle est formée de 3 couches ou tuniques : l'intima (interne) comprenant l'endothélium et l'espace sous endothélial, la média formée essentiellement de cellules musculaires lisses et l'adventice externe. Entre l'intima et la média se trouve une membrane souple : la limitante élastique interne, alors que la limitante élastique externe sépare la média de l'adventice.



Influence de l'hyperglycémie et de l'hypoinsulinémie

Il est intéressant de noter que le glucose lui-même peut contribuer à l'athérosclérose. Il induirait en effet une augmentation du facteur tissulaire, qui convertit la prothrombine en thrombine. Cette dernière est un agrégateur plaquettaire puissant, et induit la conversion du fibrinogène en fibrine. Ainsi, les concentrations élevées de glucose induisent un état prothrombotique. Ces effets contribuent aux complications cardiovasculaires associées à l'hyperglycémie, notamment l'infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux. La thrombine déclenche de plus des mécanismes pro-inflammatoires via la libération du CD40, puissant déclencheur de l'inflammation. Par conséquent, l'inflammation favorise la thrombose, qui en retour stimule encore plus l'inflammation (Dandonna, 2007).

A l'inverse, l'insuline exerce, en plus de son action glucorégulatrice, un effet vasodilatateur en stimulant la production de NO.

Encadré 12 - L'athérosclérose

Les étapes de développement de l'athérosclérose

1) Les LDL (intermediate density lipoprotein ou LDL cholestérol ou cholestérol de moyenne densité), les LDL (low density lipoprotein ou LDL cholestérol ou cholestérol basse densité) et les VLDL (very low density lipoprotéines) sont des transporteurs du cholestérol qui, en cas de déséquilibre, peuvent s'accumuler dans l'intima des artères : c'est l'infiltration lipidique.

2) La phase suivante est l'oxydation de ces LDL, dans les structures mêmes de l'intima, notamment sous l'action des ERO/ERN. Cette oxydation est favorisée par une hyperglycémie chronique.

3) Les LDL oxydés vont activer la formation de molécules d'adhésion à la surface des cellules de l'intima (celles qui sont en contact avec le sang), ce qui va attirer des monocytes. Au niveau de l'intima, des protéines spécifiques vont jouer le rôle de « molécules d'adhésion » et permettre ainsi l'adhésion de ces monocytes : VCAM-1 pour vascular cell adhesion molecule et ICAM-1 pour intercellular adhesion molecule. Ces molécules d'adhésion vont s'accrocher à des intégrines présentes à la surface des monocytes.

4) Les monocytes passent dans l'espace sous endothélial grâce à une protéine, MCP-1 (monocyte chemotactic protein), en passant entre les jonctions des cellules endothéliales. Ils vont alors être transformés en macrophages en présence d'un facteur indispensable : le MCSF (monocyte colony stimulating factor), puis capter des molécules de LDL oxydées.

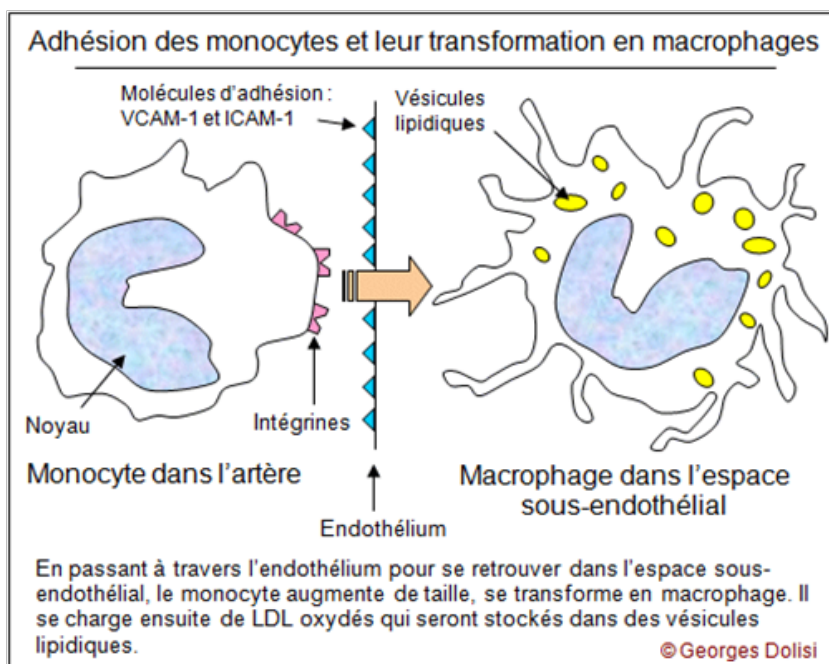
5) A partir de ce moment, les macrophages vont créer et entretenir dans l'espace sous-endothélial une réaction inflammatoire qui va précipiter la suite des événements. Ils produisent des cytokines pro-inflammatoires, dont le TNF-alpha et l'interleukine 1 (Il-1) et certains se transforment en cellules spumeuses (qui ont un aspect mousseux, écumeux) en se chargeant de vésicules lipidiques. Les cytokines produites ont également le pouvoir de favoriser la fabrication par la plaque athéromateuse, lorsqu'elle est constituée de métalloprotéinases qui vont agir sur la matrice extracellulaire en la dégradant.

6) A ce stade, on observe souvent des stries lipidiques (stade II) qui sont des dépôts longitudinaux de couleur jaunâtre et qui ne présentent pas encore de danger. Dans certains cas, on a même observé une régression de ces stries.

7) Le centre de l'athérome se constitue (stade III) progressivement par accumulation de lipides dans et hors des cellules : c'est le cœur lipidique ou centre athéromateux, véritable point de départ de la plaque. Par la suite, ce cœur lipidique va progressivement se couvrir d'une chape fibreuse ou fibromusculaire, constituée de cellules musculaires lisses de la média, de protéines extracellulaires (collagène, élastine et protéoglycanes), et de facteur de croissance qui va entretenir cette formation (stades IV et V). Cette chape fibromusculaire va, dans un premier temps, isoler le centre athéromateux de la circulation sanguine, mais aussi contribuer à réduire encore la lumière artérielle. Les plaquettes ou thrombocytes activés vont également venir s'agglutiner à ce niveau.

8) C'est à partir de ce stade que les risques ischémiques sont importants, car la circulation sanguine est considérablement ralentie et les organes situés en aval sont en état d'hypoxie. Le risque majeur est l'infarctus du myocarde si la plaque athéromateuse siège dans les artères coronaires, et l'infarctus cérébral ou AVC (accident vasculaire cérébral) s'il siège dans une artère irriguant le cerveau.

9) En même temps que la plaque athéromateuse se développe et évolue, il n'est pas rare que l'artère touchée subisse aussi des modifications : les angiologues parlent du remodelage artériel. Dans la plupart des cas, ce remodelage est « compensateur », limitant en quelque sorte l'influence ischémique de la plaque, mais il peut aussi être « constrictif », aggravant ainsi la situation. Chez de nombreux patients, un autre phénomène vient se surajouter à tout ce qui précède : la calcification de la plaque athéromateuse qui la rend plus ou moins rigide (stade VII).



l'origine d'une réaction inflammatoire avec production de cytokines (TNF-alpha, IL-1, IL-6) (Neumann et al., 1999)⁵⁵.

L'implication des AGE dans les complications vasculaires, a été décrite par un modèle "en deux temps" (Schmidt et al., 1999): la liaison initiale AGE-RAGE (présentée précédemment) induit une activation cellulaire et une inflammation, suivie par l'accumulation de lipoprotéines au niveau des lésions athérosclérotiques, conduisant elles-mêmes à une inflammation chronique, et donc à une accélération ultérieure de l'athérosclérose.

En effet, le phénomène de glycation (décrit à l'origine comme la formation d'une liaison entre un ose et le groupement amine d'une protéine), peut également toucher le groupement amine d'autres composés comme les acides nucléiques, les lipides ou les lipoprotéines, et notamment les LDL (Singh et al., 2001). Or, les LDL glyquées subissent de nombreuses altérations dans leur fonctionnement, les conduisant à devenir très athérogènes (Lyons and Jenkins, 1997). La réticulation créée lors de la glycation accroît notamment la liaison des LDL glyqués circulants aux protéines de collagène de la matrice, elles aussi touchées par la glycation. Ces liaisons vont entraver le flux normal du sang, favorisant l'accumulation des LDL et leur infiltration dans la paroi des vaisseaux, où, comme les LDL oxydés, ils vont déclencher une réaction inflammatoire renforçant l'athérosclérose (Jakus and Rietbrock, 2004). Le rôle des AGE dans les lésions athéromateuses a été confirmé par le fait que la CML s'accumule dans les tissus, tout particulièrement au niveau des plaques d'athérome (Schleicher et al., 1997).

Enfin, il a récemment été proposé que les AGE d'origine alimentaire contribueraient au développement des complications diabétiques, en augmentant le SO et l'inflammation dans les cellules insulino-productrices et insulino-sensibles, via une perturbation du microbiote intestinal. Cette hypothèse est confirmée par le fait que la réduction de la part des AGE dans la nourriture, sans modifier par ailleurs l'apport énergétique ou les apports en nutriments, permet de rééquilibrer le microbiote intestinal, de diminuer l'inflammation, et de réduire la survenue de complications rénales et vasculaires dans le diabète (Vlassara and Striker, 2011).

4.2.2 L'activation de la PKC

A l'intérieur de la cellule, l'hyperglycémie augmente la synthèse du diacylglycérol (DAG), qui est un co-facteur de la protéine kinase C (PKC). L'activation de la PKC va ensuite avoir de nombreuses conséquences délétères représentées sur la figure 26, notamment au niveau de la fonction vasculaire, via une stimulation de mécanismes néfastes et une inhibition des mécanismes protecteurs antagonistes. Si l'on considère, par exemple, la fonction vasomotrice, la PKC va à la fois stimuler un mécanisme délétère, la production d'endothéline-1 (vasoconstrictrice) et inhiber le mécanisme bénéfique antagoniste, c'est à dire diminuer la production de NO (vasodilatateur) par la eNOS (Brownlee, 2005).

⁵⁵ Le rôle de l'inflammation dans les complications diabétiques est décrit dans le paragraphe 4.1.2

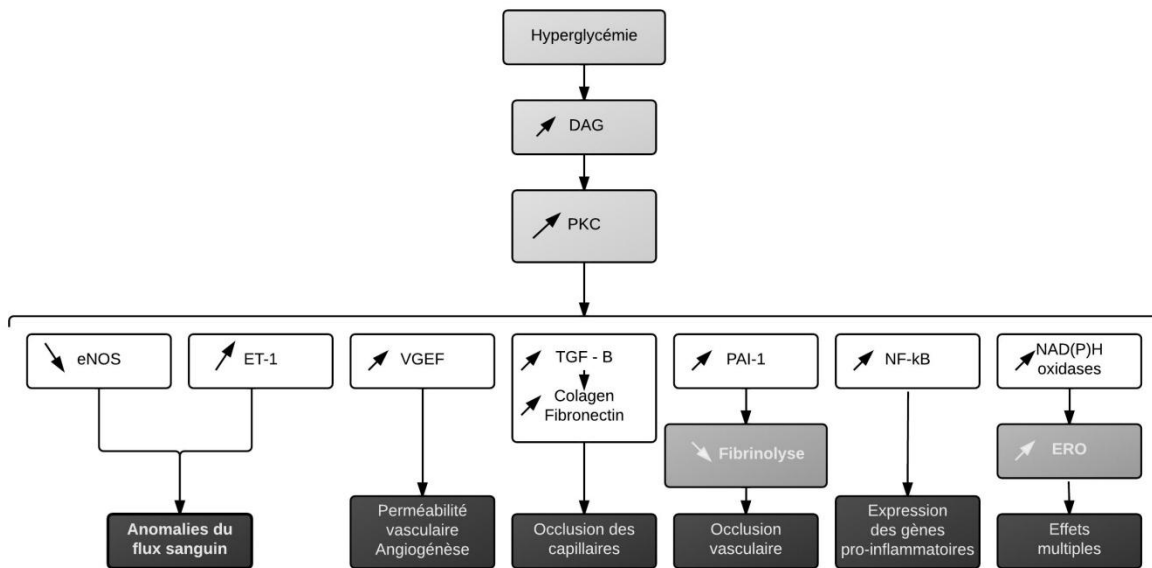


Figure 28 : Mécanismes et conséquences de l'activation de la voie des PKC par l'hyperglycémie (adaptée de Brownlee, 2005)

4.2.3 La voie des hexosamines

Cette voie ne fait pas intervenir directement le SO, mais contribue fortement au développement des complications vasculaires en lien avec les ERO/ERN, c'est pourquoi nous la présentons brièvement. Physiologiquement, le fructose-6-phosphate, formée à partir du glucose intracellulaire, est métabolisé par la glycolyse. Toutefois, une partie du fructose-6-phosphate intègre une voie alternative dont le produit terminal est la glucosamine *N*-acetyl, qui a la propriété de phosphoryler les résidus sérine et thréonine des facteurs de transcription à l'origine de modifications pathologiques dans l'expression des gènes impliqués dans les dysfonctions vasculaires.

4.2.4 Diminution de la biodisponibilité du NO

Comme présenté dans l'encadré 12 (Les Dysfonctions Endothéliales), les dysfonctions endothéliales désignent classiquement une altération de la relaxation endothélium-dépendante, résultant d'une baisse de la biodisponibilité du NO. Cette diminution est le reflet de différents mécanismes qui, dans le cas du DT1, s'additionnent.

Tout d'abord, la eNOS, responsable de la production de NO dans les vaisseaux, peut être inhibée lorsque les LDL oxydés sont présent en grande quantité, ce qui se produit au niveau des lésions vasculaires dans le diabète. La synthèse est donc diminuée. De plus, la déplétion en NADPH induite par l'activation de la voie des polyols (paragraphes 3.2.3 et 3.2.4) a pour conséquence une diminution de la synthèse de NO, le NADPH étant un co-facteur des NOS (Bonfont-Rousselot et al., 2000). Le découplage de la eNOS diminue également la production de NO, puisqu'une partie de l'enzyme va produire de l'O₂⁻ à la place du NO (Vasquez-Vivar et al., 1998).

Par ailleurs, le NO produit peut être ensuite inactivé. C'est notamment le cas lorsqu'il se lie à l'anion superoxyde, présent en grande quantité dans le diabète. L'anion superoxyde va réagir avec le NO et l'inactiver en formant des peroxynitrites, agents potentiellement oxydants, en raison de leur décomposition en NO₂ et °OH. La formation de peroxynitrites intervient tout particulièrement dans le cadre du découplage de la eNOS, où le NO et l'O₂⁻ sont alors formés de façon concomitante par les deux sous unités de l'enzyme. Cette implication des ERO dans l'inactivation du NO a été démontré dans un modèle de vaisseaux isolés, où la présence simultanée d'anion superoxyde et de radical hydroxyle bloque la relaxation endothélium-dépendante induite par le NO, alors que l'addition de SOD ou de CAT restaure la vasodilatation (Szaleczky et al., 1999). Dans un modèle *in vitro* de cellules endothéliales de la rétine (touchée par les complications du diabète), Uhlmann et al., 2002 ont montré que les AGE piègent le NO produit par ces cellules (Uhlmann et al., 2002).

Enfin, des protéines comme le collagène, qui contiennent des AGE, pourraient éliminer le NO dans l'endothélium et ainsi limiter sa diffusion dans les cellules musculaires.

Le NO exerce physiologiquement un effet vasodilatateur et antiagrégant. La baisse de sa biodisponibilité dans le diabète s'accompagne donc d'effets vasoconstricteurs, associé à un effet proagrégant plaquettaire (Dandona, 2002). Ces deux mécanismes vont fortement contribuer au développement des complications vasculaires (détaillées dans l'encadré 13 : l'athérosclérose).

De plus, le NO maintient l'aldose réductase (impliquée dans la voie des polyols) dans un état inactif, et cette inactivation est levée dans le tissu diabétique (car baisse de la biodisponibilité du NO) (Bonnefont-Rousselot et al., 2000).

4.2.5 L'inflammation

4.2.5.1 L'hyperglycémie et le SO entraînent une augmentation de l'inflammation

Le glucose exerce *per se* un effet pro-oxydant et pro-inflammatoire, puisqu'il a été démontré que l'ingestion de 75 grammes de glucose active la NADPH-oxydase, responsable de la production d'anion superoxyde. Ce dernier active des facteurs de transcription inflammatoires redox-sensibles, parmi lesquels le NF-kB, et augmentent l'expression de nombreux gènes, notamment ceux codant pour le TNF- α , l'IL-6 et la protéine chimioattractrice monocytaire-1 (MCP-1) (Dhindsa et al., 2004). Cet effet inflammatoire a été retrouvé lors du maintien d'un plateau hyperglycémique avec inhibition concomitante de la production d'insuline, mimant le DT1 : les concentrations plasmatiques de TNF- α et d'IL-6 étaient augmentées (Esposito et al., 2002).

Par ailleurs, l'association du SO à l'inflammation dans le DT1 a été bien décrite dans la littérature (pour revue, Devaraj et al., 2010). En effet, le stress oxydant active les macrophages, monocytes et cytokines pro-inflammatoires (directement et par l'intermédiaire du TNF-alpha), qui en retour produisent eux-mêmes de grandes quantités d'ERO et activent de plus la iNOS.

4.2.5.2 L'inflammation participe aux complications vasculaires

L'inflammation (TNF-alpha, IL-6) et le SO (isoprostanes) sont associés de manière précoce dans le développement des complications diabétiques (Davi et al., 2003).

Il est intéressant de noter que l'inflammation joue, elle-même (sans passer via les mécanismes pro-oxydants), un rôle direct dans le développement du diabète et de ses complications. En effet, l'activation de la voie du NF- κ B par les cytokines inflammatoires (et sa toxicité associée) est maintenue, même lorsque la production d'ERO/ERN (et donc l'activation de la voie du NF- κ B par ces derniers) est artificiellement bloquée. La toxicité des cytokines peut donc s'exercer sans être médiée par les ERO/ERN (Chen et al., 2005).

Lorsque les processus inflammatoires sont déclenchés, que ce soit via le SO ou pas, l'inflammation se perpétue selon un cercle vicieux (figure 27): la stimulation des cellules par diverses voies activées dans le diabète, notamment les ERO/ERN, les cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1, il-6) et la PKC, active le NF- κ B, qui induit lui-même la transcription de protéines de l'inflammation, notamment des cytokines, des protéines d'adhésion vasculaires, et surtout le TNF-alpha, qui va renforcer l'activation initiale du NF- κ B, (Dandona et al., 2007).

L'inflammation joue ensuite un rôle prépondérant dans le développement de l'athérosclérose (encadré 13).

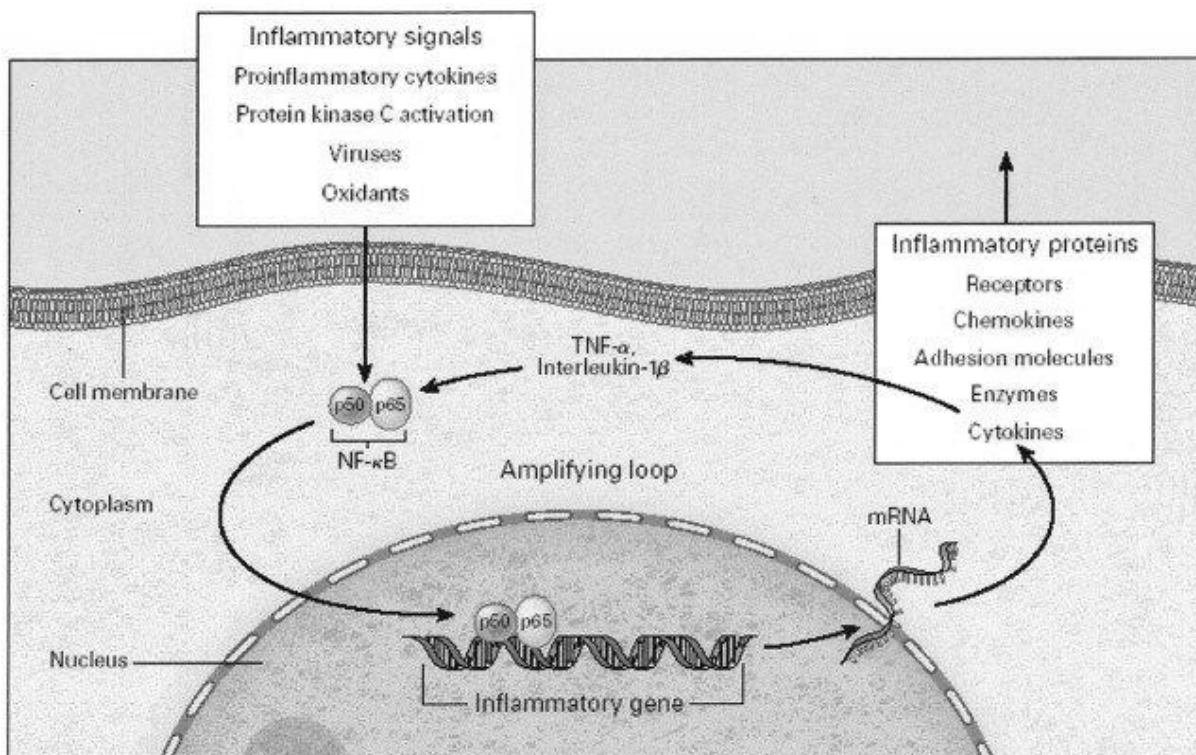


Figure 29 : Mécanismes de l'inflammation et son amplification dans la cellule (Dandona et al., 2007)

Dans le cadre du diabète, l'hyperglycémie et la production d'ERO/ERN qui lui est associée stimulent un ensemble de mécanismes perturbant le bon fonctionnement cellulaire, et surtout la fonction vasculaire. Les vaisseaux vont en effet être touchés d'une part, par des modifications structurales, résultant de la glycation des protéines de la matrice et d'altérations du remodelage vasculaire; et d'autre part, par des modifications fonctionnelles, causées principalement par une baisse de la biodisponibilité du °NO. Les mécanismes impliqués fonctionnent selon un cercle vicieux, se stimulant mutuellement (comme le couple SO/inflammation, par exemple), précipitant le développement des complications diabétiques.

Stress oxydant induit par l'hyperglycémie et complications dans le diabète de type 1

S'il est aujourd'hui bien établi qu'une production basale et modérée d'espèces oxydantes est nécessaire au bon fonctionnement cellulaire, tout excès d'ERO et d'ERN est préjudiciable, ces derniers étant impliqués dans de nombreuses pathologies chroniques et/ou leurs conséquences associées.

Le SO mis en évidence dans le diabète de type 1, résulte essentiellement de l'hyperglycémie. Celle-ci peut être permanente en l'absence de traitement à l'insuline (chez l'homme avant son dépistage ou chez l'animal non traité), ou persister sous forme d'épisodes plus ou moins fréquents (selon l'efficacité du contrôle glycémique) chez le sujet sous insulinothérapie. L'hyperglycémie active, en effet, différents mécanismes (autoxydation du glucose, glycation des protéines et formation des AGE, voie des polyols) producteurs d'espèces oxydantes. Ces dernières sont dans un premier temps neutralisées par les systèmes de défense antioxydants enzymatiques, dont elles stimulent l'expression. Mais à long terme, il semblerait que le phénomène de glycation induit par l'hyperglycémie touche également les enzymes antioxydantes, en les inactivant, permettant ainsi aux espèces oxydantes de provoquer de nombreux dommages à l'origine des complications diabétiques. En effet, les ERO et ERN participent à la survenue et au développement des micro- et macro-angiopathies diabétiques, en perturbant les voies de signalisation intracellulaires, en stimulant des processus inflammatoires, et en altérant la fonction vasculaire par la diminution de la biodisponibilité du NO.

Dans l'objectif de réduire ces complications, devenues aujourd'hui le principal trouble du DT1 traité à l'insuline, la prise en charge du SO qui en est à l'origine constitue donc une priorité.

Chapitre 3 : Les moyens de protection contre le SO chez le DT1

1 L'insulinothérapie

Les altérations du statut pro/antioxydant chez les sujets diabétiques, et les complications qui lui sont associées, ont souvent été reliées à la qualité du contrôle glycémique. L'insulinothérapie est donc indispensable, non seulement pour réguler la glycémie, mais aussi pour améliorer le statut pro/antioxydant et ainsi diminuer le risque de complications. Toutefois, peu d'études se sont intéressées aux effets du traitement à l'insuline sur ce statut, alors même que les quelques résultats disponibles sont encourageants.

La production de radicaux libres *in vivo*, mesurée de façon directe par RPE, est ainsi diminuée dans un modèle animal de DT1, suite à quatre semaines de traitement à l'insuline, qui par ailleurs, améliore également l'HbA1c (Sano et al., 1998). La CML, produit de la glycoxydation considérée comme un marqueur de SO dans le cadre du DT1, est normalisée dans le muscle soléaire après 12 semaines de traitement à l'insuline (Snow and Thompson, 2009).

Plus généralement, le traitement à l'insuline permet de réduire les marqueurs de dommages oxydatifs, habituellement élevés dans le DT1, en améliorant la régulation de la glycémie. Les isoprostanes, notamment, sont élevés lors du diagnostic du DT1 mais diminués après 16 semaines d'insulinothérapie (Flores et al., 2004). Les TBARS et l'H₂O₂ sont également anormalement élevés chez des patients DT1 ayant un mauvais contrôle glycémique. La mise en place d'un traitement à l'insuline intensif associé à diverses mesures (régime, exercice physique et éducation au diabète) pour améliorer le contrôle glycémique (fructosamine passant de 6 à 3,9 mmol/L en deux semaines) permet de diminuer significativement ces marqueurs, bien qu'ils restent supérieurs à ceux des sujets sains (Wierusz-Wysocka et al., 1995). Seuls Elangovan et al., (2000), n'ont pas rapporté d'amélioration des diènes conjuguées ni de la capacité antioxydante mesurées dans le plasma et dans différents tissus (cœur, rein, cerveau, foie) suite à trois semaines de traitement. On peut supposer que la durée du traitement était trop courte pour améliorer significativement le contrôle glycémique, qui n'a par ailleurs pas été évalué dans cette étude.

Concernant l'activité des enzymes antioxydantes, l'activité des principales enzymes suite à huit semaines de diabète, puis quatre semaines de traitement par insuline, est représentée sur la figure 29. Les diverses altérations du système antioxydant enzymatique observées au bout de huit semaines de diabète sont presque toutes corrigées par les quatre semaines de traitement à l'insuline qui suivent (Wohaieb and Godin, 1987).

Enzymes / Tissus	CuZn-SOD	CAT	GPX	GSH	GSSG
Pancréas	↗ - →	↗ - →	→ →	→ →	↗ - →
Cœur	→ →	↗ - →	→ →	→ →	↗ - →
Rein	↘ - ↘	↘ - →	↗ - →	→ →	→ →
Foie	↘ - ↘	↘ - →	↘ - →	↘ - →	→ →

Figure 30 : Effets du diabète (induit par streptozotocine, après 12 semaines) puis du traitement à l'insuline (les 4 dernières semaines du protocole) sur le système antioxydant dans différents tissus.

Sindhu et al., (2004) rapportent des résultats similaires lorsque les quatre semaines d'insulinothérapie sont mises en place dès l'induction du diabète : l'hyperglycémie est moins prononcée, et l'activité et l'expression hépatiques de toutes les enzymes antioxydantes sont normalisées.

La prise en charge de l'hyperglycémie par un traitement à l'insuline suffisamment long (plus de trois semaines) permet de diminuer les marqueurs de dommages oxydatifs, et de corriger partiellement les perturbations du système antioxydant enzymatique chez le DT1, sans toutefois normaliser le statut pro/antioxydant. Ce dernier point souligne encore une fois l'importance d'associer à l'insulinothérapie des mesures additionnelles telles que l'activité physique et/ou une prise en charge nutritionnelle.

2 L'activité physique

2.1 Rappel des effets de l'activité physique (exercice aigu et entraînement) chez le sujet sain

L'exercice physique, d'intensité et/ou de durée suffisante, s'accompagne d'une production accrue d'ERO et constitue un stress pour l'organisme, perturbant temporairement son homéostasie redox (refs à rajouter plus tard). Malgré tout, l'activité physique n'est pas à déconseiller, car les ERO produits lors de l'exercice vont agir comme un signal intracellulaire, conduisant à l'activation des facteurs de transcription et des voies de signalisation nécessaires à l'adaptation cellulaire. Un entraînement physique bien conduit va donc déclencher un processus adaptatif, impliquant entre autres, une "up-régulation" des enzymes antioxydantes. A ce titre, l'exercice chronique peut être considéré comme un "antioxydant naturel" (Gomez-Cabrera et al., 2008) permettant de réduire, au repos et en réponse à l'exercice, les marqueurs du

stress oxydant par une amélioration de l'activité des enzymes antioxydantes. Ainsi, son utilisation comme complément thérapeutique dans la prise en charge de patients, est pleinement justifiée dans les pathologies caractérisées par un SO chronique. A l'opposé, un entraînement excessif (surentraînement) est associé à un stress oxydant accru (Tanskanen et al., 2010).

2.2 Chez le sujet diabétique

Dans le DT1, l'exercice physique possède la capacité d'améliorer la régulation de la glycémie. Il permet également, chez le sujet sain, un renforcement des défenses antioxydantes. Il devrait donc, à double titre, réduire le SO résultant de l'hyperglycémie dans le diabète, constituant ainsi une approche particulièrement intéressante pour réduire les complications diabétiques induites par le SO. Pourtant, très peu d'études ont analysé les effets de l'exercice et de l'entraînement sur le statut pro/antioxydant chez les DT1.

2.2.1 Effets de l'activité physique sur le SO

2.2.1.1 Exercice aigu

Les quelques études disponibles concernant l'effet d'un exercice aigu sur le stress oxydant chez le DT1 semblent indiquer que, comme chez le sujet sain, l'exercice aigu s'accompagne d'une augmentation des dommages oxydatifs. La formation d'espèces radicalaires a d'ailleurs été démontrée directement par RPE, suite à un exercice triangulaire maximal, à la fois chez le sujet sain et DT1 (Davison, 2002 & 2008).

De plus, pour Laaksonen et al. (1996) et Atalay et al. (1997), les TBARS plasmatiques sont augmentés suite à un exercice de 40 minutes à 60% de VO_{2max} , chez des sujets diabétiques et sont significativement supérieurs aux valeurs observées chez les sains (respectivement $3,3 \mu\text{mol/L} \pm 0,63$ contre $1,4 \mu\text{mol/L} \pm 0,54$). Cette augmentation (exprimée en valeur relative) est identique pour les deux groupes (environ 50 %). Concernant le système antioxydant, l'activité de la GPX est significativement inférieure après l'exercice chez les sujets diabétiques, expliquant au moins partiellement les valeurs plus élevées de la peroxydation lipidique observées dans ce groupe. Pour la SOD et la CAT, aucune différence d'activité n'est observée après l'exercice entre les deux groupes. Deux études récentes, chez l'adulte (Fayh et al., 2012) et l'enfant (Rosa et al., 2011) DT1, n'ont toutefois pas mis en évidence d'augmentation des dommages oxydatifs (évalués respectivement par les TBARS et les protéines carbonylées, et les isoprostanes et la 3-nytrotyrosine) suite à un exercice isolé. Le système antioxydant (glutathion et capacité antioxydante totale) n'était pas non plus modifié. Ces différences par rapport aux résultats rapportés précédemment par Atalay et Laaksonen peuvent s'expliquer par une modalité d'exercice très différente chez les enfants (répétition de sprints de 2 minutes à 80% de VO_{2max} , entrecoupés de pause de 1 minute). De plus, dans l'étude de Fayh et al. (2012), l'exercice réalisé n'entraîne pas non plus de SO chez les sujets sains. L'intensité serait insuffisante pour induire un SO car, même chez le sujet sain, aucun dommage oxydatif n'est rapporté. Cette constatation est d'autant plus surprenante qu'il s'agit, tout comme dans les études

d'Atalay et de Laaksonen, d'un exercice continu de 40 à 45 minutes, à une intensité moyenne (60% de VO₂max pour Atalay et Laaksonen, 10% en dessous du 2^{ème} seuil ventilatoire pour Fayh).

Chez des rats réalisant un exercice exhaustif huit semaines après induction du diabète par streptozotocine, la peroxydation lipidique n'est augmentée que dans le foie, alors qu'elle est inchangée dans le muscle (Gul et al., 2002).

2.2.1.2 *Entraînement*

A notre connaissance, une seule étude s'est intéressée à l'effet de l'entraînement sur les marqueurs du SO chez l'Homme (Woo et al., 2010). Des enfants DT1 ont suivi un programme d'entraînement aérobie d'intensité modérée pendant 12 semaines, ce qui a permis d'augmenter l'activité érythrocytaire de la SOD et de la GPX, cette dernière étant diminuée au début du protocole, comparativement à des enfants sains. Toutefois, les auteurs ont rapporté que la 8-HdOG, marqueur des dommages de l'ADN, était également augmentée suite à l'entraînement.

Chez l'animal DT1, l'entraînement diminue la peroxydation lipidique de repos, que ce soit au niveau du plasma, des globules rouges, des reins ou du pancréas (Gul et al., 2002; Coskun et al., 2004; Kutlu et al., 2005; Naziroglu and Butterworth, 2005). Au niveau musculaire, les concentrations de protéines carbonylées sont inchangées quel que soit le muscle considéré (Atalay et al., 2004), alors que pour les TBARS, les résultats varient selon le muscle étudié. En effet, Gul et al. (2002) montrent une diminution au niveau du vaste latéral, mais une absence de changement au niveau de la partie oxydative du gastrocnémien. Dans le cerveau, la peroxydation lipidique n'est pas diminuée par un entraînement de huit semaines, chez des rats diabétiques entraînés comparés à des non-entraînés (Ozkaya et al., 2002; Alipour et al., 2012). La durée de l'entraînement pourrait expliquer en partie ces divergences de résultats (Stoppa et al., 2006), tout comme l'efficacité de l'entraînement chez les animaux diabétiques (évaluée par l'augmentation de l'activité de la citrate synthase), qui n'est pas toujours rapportée dans les publications.

Les résultats concernant les effets d'un entraînement sur le statut antioxydant du rat DT1 sont également divergents et dépendent du tissu analysé. Ainsi, dans le pancréas, Coskun (2004) note une augmentation significative de l'activité de la SOD, de la GPX et de la CAT chez des rats STZ entraînés (12 semaines) par rapport à des rats contrôles. Narizoglu et Butterworth (2005) montrent une augmentation de l'activité érythrocytaire de la GPx et de la CAT, une élévation du GSH érythrocytaire, ainsi qu'une augmentation des antioxydants non enzymatiques (GSH, β -carotène, vitamines A et E) dans le plasma après 20 jours d'entraînement, chez des rats STZ. Au niveau rénal, les résultats sont moins nets puisque Kutlu et al. (2005) observent une augmentation de l'activité de la GPX et de la vitamine E, sans observer de hausse du niveau de GSH, de la vitamine A et du β -carotène, en réponse à 20 jours d'entraînement chez des rats STZ. Au niveau cérébral, les effets de huit semaines d'entraînement chez des rats diabétiques sont également contrastés : si certains rapportent une augmentation de l'activité de la SOD et de la GPX sans variation d'activité de la CAT (Ozkaya et al., 2002), d'autres observent une diminution d'activité de la CuZn-SOD, et une absence d'effets sur les autres enzymes antioxydantes (expression et activité de la GPX et la CAT) (Lappalainen et al., 2009)

En plus des diverses adaptations qu'il induit au repos, l'entraînement stimule également l'activité de certaines enzymes antioxydantes en réponse à l'exercice. Ainsi, Gul et al. (2002) notent une augmentation de l'activité de la GPX au niveau du rein et de la partie oxydative du gastrocnémien, à la fois au repos et en réponse à un exercice exhaustif, après une période d'entraînement de huit semaines chez des rats STZ. En revanche, les auteurs ne montrent aucune différence concernant l'activité de la GPX dans le vaste latéral et le foie, ni de l'activité de la glutathion réductase au niveau des quatre tissus analysés et dans les deux conditions (repos et exercice aigu).

2.2.2 Effets de l'entraînement sur les complications du diabète

La plupart des études portant sur les effets de l'exercice physique régulier dans le DT1 montrent que celui-ci, lorsqu'il est bien conduit, contribue à améliorer la régulation de la glycémie (p.41). Toutefois, les données sont insuffisantes à l'heure actuelle, pour conclure quant à son impact sur le développement des complications diabétiques (Carral San Laureano et al., 2010).

Une étude rétrospective portant sur près de 2000 patients DT1, mettant en lien leur niveau d'activité physique évalué par questionnaire auto-administré, et les complications qu'ils présentaient (rétinopathie, néphropathie, maladies cardiovasculaires), a mis en évidence une corrélation négative entre l'intensité de l'activité physique pratiquée et le degré de complications. Il est toutefois difficile d'établir un lien de cause à effet entre ces deux paramètres, la diminution d'activité physique résultant, au moins partiellement, de la présence de complications⁵⁶. Néanmoins, un élément de ces résultats souligne l'importance de la diminution de l'activité physique dans l'origine des complications : la diminution d'activité physique est enregistrée dès la présence de micro-albuminurie alors même que cette dernière ne se traduit par aucun signe " visible " qui pourrait conduire à une diminution volontaire de l'activité physique (Waden et al., 2008). Dans ce cas, la diminution d'activité physique n'est donc pas la conséquence de la micro-albuminurie, mais pourrait au contraire jouer un rôle dans son développement.

A notre connaissance, aucune étude interventionniste n'a toutefois été mise en place pour analyser l'effet de l'entraînement sur les complications diabétiques, via le SO. L'entraînement peut pourtant agir sur des mécanismes spécifiquement impliqués dans les complications, par exemple, en augmentant l'expression de la NOS endothéliale, stimulant ainsi la production de NO (Adams et al., 2005). Cette augmentation de la production de NO pourrait d'une part, améliorer sa biodisponibilité au niveau endothélial, et d'autre part améliorer la régulation de la glycémie, via son action dans le captage de glucose.

⁵⁶ Les efforts intenses sont par exemple déconseillés aux diabétiques présentant une rétinopathie en raison du risque de décollement de la rétine, ou à ceux présentant une pathologie cardiovasculaires en raison du risque d'accident cardiaque.

Chez le sujet sain, l'exercice aigu s'accompagne d'une production d'espèces oxydantes. Celles-ci permettent à l'organisme de s'adapter sur le long terme (entraînement), par un renforcement des défenses antioxydantes, aboutissant à une diminution du SO au repos et en réponse à l'exercice.

Chez le diabétique, lorsque l'exercice est suffisant pour induire un SO, ce dernier est plus important que chez le sujet sain. Cette différence résulte toutefois d'un SO pré-exercice supérieur chez le DT1. L'augmentation relative de SO (par rapport à la valeur pré-exercice) est identique, que les sujets soient sains ou diabétiques. Cette évolution a été modélisée sur la figure 31 par Villa-Caballero et al., (2000). Un exercice isolé n'entraîne donc pas pour le sujet diabétique un stress supérieur à celui induit chez le sujet sain, et semble alors tout à fait envisageable dans cette population.

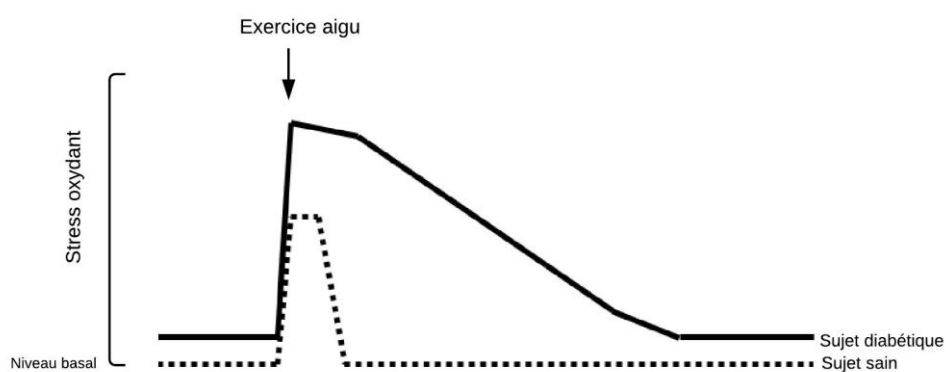


Figure 31 : Effets de l'exercice sur le SO chez les sujets sains et diabétiques (Villa-Caballero et al., 2000)

Concernant l'effet de l'entraînement, les résultats chez l'animal sont contrastés selon l'entraînement proposé (sa durée et son efficacité), mais sont encourageants, car toutes les adaptations rapportées sont bénéfiques. La seule étude disponible chez l'Homme ne permet pas de conclure, d'autant plus qu'elle fait état d'une augmentation des marqueurs de dommages de l'ADN, même si l'activité des enzymes antioxydantes est augmentée en parallèle. Il convient donc d'être particulièrement prudent dans la prescription de l'activité physique aux sujets diabétiques, et l'effet de l'entraînement en lui-même sur le SO dans cette population reste à établir avec précision.

3 Alimentation/supplémentation

3.1 La supplémentation en antioxydants chez le sujet sain : un paradoxe

Recommandée il y a quelques années, lorsque les ERO et ERN étaient considérés uniquement comme des espèces toxiques à éliminer, la supplémentation en antioxydants chez des sujets ne présentant pas de pathologies particulières est aujourd'hui déconseillée. En effet, les travaux des dernières décennies ont permis de mettre en évidence le rôle primordial que jouent les ERO/ERN, à faible concentration, dans de nombreuses voies de signalisation physiologiques (Barbieri and Sestili, 2012). Ainsi, tenter de diminuer leur niveau basal va également perturber ces voies de signalisation et le bon fonctionnement de l'organisme.

De même, le SO peut être le facteur déclenchant d'adaptations de l'organisme, notamment dans le cadre de l'activité physique. Diminuer ce SO artificiellement (par une supplémentation en antioxydants) revient alors à empêcher les adaptations de se produire. C'est notamment le cas lorsqu'une supplémentation en antioxydants est proposée simultanément à un entraînement : les bénéfices de l'activité physique sur la santé semblent alors totalement perdus, que ce soit l'amélioration de l'insulino-sensibilité ou le renforcement des défenses antioxydantes (Ristow et al., 2009). Cette absence d'adaptations à l'entraînement lors d'une supplémentation concomitante ne fait toutefois pas consensus. En effet, une autre étude plus récente a rapporté une amélioration de l'insulinosensibilité suite à un entraînement de 12 semaines, même chez les sujets ayant pris une supplémentation en vitamines antioxydantes (Yfanti et al., 2011).

3.2 La supplémentation en antioxydants chez le sujet diabétique : beaucoup d'espoirs, des résultats pas toujours concluants

Face à la quantité de travaux mettant en avant le rôle clé du SO dans la survenue et le développement des complications dans le diabète, d'autres travaux, tout aussi nombreux, se sont mis à étudier les effets d'une supplémentation en antioxydants dans cette population. En effet, l'équation semble simple : si le SO est à l'origine des complications diabétiques, le diminuer en renforçant les défenses antioxydantes devrait diminuer les complications. Pourtant, les études menées n'ont rencontré que peu de succès : bien souvent, une supplémentation en antioxydants ne permet pas d'améliorer/normaliser le statut pro/antioxydant, ou le fait dans des proportions insuffisantes pour diminuer les complications diabétiques.

On peut, en réalité, différencier plusieurs types de supplémentation :

- **les suppléments en antioxydants non enzymatiques, qui vont piéger directement les ERO**

Chez l'animal, une supplémentation à court terme (deux semaines) en vitamine E, a le même effet que l'insuline sur la production de RL (diminution), sans toutefois améliorer le contrôle glycémique (Sano et al., 1998). Elle permet de diminuer la peroxydation lipidique dans le plasma

et l'oxydabilité des LDL (Bonnet-Rousselot et al., 2000; Giannini et al., 2007), sans que cela ne se traduise par une réduction de la microalbuminurie rénale (Giannini et al., 2007). Toutefois, lorsque le diabète n'est pas correctement contrôlé, la supplémentation en vitamine E n'a aucun effet sur les paramètres du SO (Chugh et al., 1999; Sharma et al., 2000).

Chez l'Homme, le régime diabétique peut être à l'origine de carence dans les apports alimentaires en antioxydants, notamment liposolubles, car le patient tente de limiter les apports lipidiques. On peut supposer que les études de supplémentation présentant des résultats positifs, notamment quand il s'agit de supplémentation en vitamine E, ne font que corriger les apports déficients en antioxydants alimentaires (Rosen et al., 2001).

Par ailleurs, une supplémentation en vitamine C permet de diminuer la production de RL observée *in vivo*, que ce soit chez des sujets diabétiques ou sains, sans toutefois que la peroxydation lipidique ne soit réduite (Davison et al., 2008).

- **les suppléments inhibant la production des ERO/ERN résultant du phénomène de glycation**

Le principal produit testé à cet effet est l'aminoguanidine. Il réagit avec les produits de glycation précoces (les produits d'Amadori), et inhibe ainsi la formation des AGE (Bonnet-Rousselot et al., 2000), ce qui réduit efficacement le SO en renforçant les défenses antioxydantes (Stoppa et al., 2006). L'aminoguanidine a ainsi pu prévenir avec succès les complications diabétiques dans plusieurs études (voir Brownlee, 2008, pour revue)

- **les suppléments bloquant un ou des mécanismes par le(s)quel(s) le SO induit les complications diabétiques**

L'aminoguanidine présente l'avantage, là encore, de cliver la réticulation présente dans les AGE (Lei and Vatamaniuk, 2011), ce qui leur fait perdre leurs propriétés physiologiques. C'est également un inhibiteur de la iNOS (Ingaramo et al., 2011).

Une supplémentation en L-arginine, précurseur de NO, a également été testée afin de corriger la diminution de la biodisponibilité du NO survenant dans le DT1. Elle permet de normaliser le flux sanguin, témoin *in vivo* de la fonction vasculaire, sans toutefois que ce résultat soit associé à une modification de la concentration plasmatique totale en nitrates et nitrites.

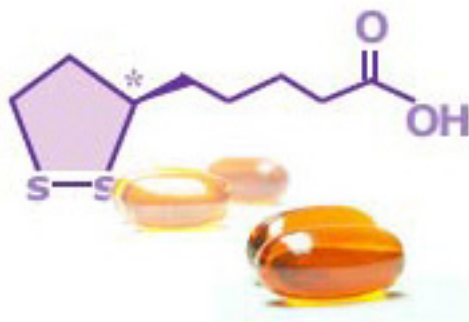
Enfin, le composé le plus testé dans cette catégorie, est sans conteste, l'acide alpha-lipoïque, parfois présenté comme "l'antioxydant universel" (encadré 13). Il intervient de manière prépondérante dans la lutte contre les ERO produits lors de la respiration cellulaire au niveau des mitochondries et dans la détoxification des métaux lourds de notre organisme. En piégeant l'anion superoxyde résultant des fuites de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie, l'ALA intervient directement à la source (supposée) des complications diabétiques réduisant ainsi le SO (Maritim et al., 2003). Il agit en cascade sur de nombreux mécanismes

Encadré 13 - L'acide alpha-lipoïque

L'acide alpha-lipoïque, l'antioxydant universel

Puissant antioxydant actif à la fois en milieu aqueux et lipidique, l'acide alpha-lipoïque est capable de protéger tous les compartiments des cellules de l'organisme. De nombreuses publications confirment ses multiples effets bénéfiques pour la santé et, notamment, le rôle vital qu'il joue dans la protection des mitochondries, et dans la prévention et le traitement du diabète et de ses complications.

L'acide alpha-lipoïque, également connu sous le nom d'acide thioctique, est produit naturellement dans les plantes, les animaux et chez l'homme en petites quantités. Lorsqu'il est synthétisé de façon endogène, il est lié à une protéine et agit comme cofacteur de nombreuses et importantes enzymes mitochondriales. Il est également capable d'amplifier les effets bénéfiques d'autres antioxydants, tels la CoQ10 ou le glutathion.



L'ALA dans la mitochondrie

L'acide alpha-lipoïque est notamment capable, au sein de la mitochondrie, de neutraliser la production excessive de ERO et d'inverser certaines détériorations mitochondriales induites par ces derniers. Des perturbations mitochondriales peuvent avoir de multiples conséquences, notamment une réduction de la production d'ATP, et une augmentation de la production d'ERO. De nombreuses études ont montré que l'acide alpha-lipoïque pouvait avoir des effets bénéfiques dans ce cas (Shen et al., 2008).

L'ALA améliore l'insulinorésistance

L'acide alpha-lipoïque peut aider à diminuer l'insulinorésistance : il diminue la glycémie en stimulant la fonction de l'insuline et en exerçant un effet insulino-trope (Kamenova, 2006).

L'ALA prévient et traite le diabète ainsi que ses complications

De nombreuses études ont montré que l'acide alpha-lipoïque peut être utilisé pour prévenir et traiter le DT1 ainsi que les complications associées, en particulier les rétinopathies (Maitra et al., 1995) et les accidents cardiovasculaires résultant de l'athérosclérose.

Un grand nombre de travaux ont également montré l'efficacité de l'acide alpha-lipoïque dans le traitement des neuropathies diabétiques (Ziegler et al., 1997, 2004). De plus, la supplémentation a permis de prévenir les signes de léthargie et de maladie observés après 3 mois chez les souris diabétiques non supplémentées. Enfin, l'acide alpha-lipoïque a complètement prévenu l'augmentation du cholestérol plasmatique, des lésions d'athérosclérose et la détérioration générale de la santé entraînée par le diabète (Yi et Maeda, 2006)

L'ALA inhibe les lésions de l'athérosclérose

Chez des souris déficientes en alipoprotéine E, une supplémentation en acide alpha-lipoïque réduit de façon significative la formation de lésions d'athérosclérose dans l'aorte. De plus, l'inflammation y est également réduite : l'expression aortique des molécules d'adhérence était plus faible, ainsi que l'accumulation de cytokines pro-inflammatoires et de macrophages aortiques, particulièrement dans la zone où la formation des lésions d'athérosclérose a été réduite. (Zhang et al., 2008)

Encadré 14 - Le paradoxe redox, rôle des ERO et ERN dans le captage de glucose

Le glucose stimule la synthèse de l'insuline via les ERO

L'une des caractéristiques des cellules beta du pancréas est leur faible équipement en enzymes antioxydantes, ce qui les rend particulièrement sensibles au SO. Pourtant, de façon surprenante, les ERO/ERN sont nécessaires à la sécrétion d'insuline, et sont impliqués dans différentes étapes des voies de signalisation menant à sa synthèse.

Dans les cellules beta, le glucose (en concentration physiologique) augmente la concentration en H_2O_2 , qui stimule lui-même la sécrétion d'insuline. En effet, la production d' H_2O_2 est une condition nécessaire à l'activation de la production d'insuline, car la présence de différents piègeurs (ou scavengers en anglais) comme la CAT, par exemple, bloque la transmission du signal et inhibe la production d'insuline. A l'inverse, il semble qu'un SO trop élevé inhibe également la production d'insuline, car il est associé à une up-régulation des systèmes antioxydants qui vont piéger l' H_2O_2 et bloquer cette voie de signalisation (Pi et al., 2007)

Les ERO participent à la stimulation du captage du glucose induit par l'insuline

Dans les cellules, l' H_2O_2 est produit localement par la NADPH-oxydase, dont la sous unité Nox4, est activée par la fixation de l'insuline sur son récepteur, et/ou par le glucose intra-cellulaire, cette dernière voie restant à confirmer.

A l'intérieur de la cellule, la protéine tyrosine phosphatase bloque la voie de signalisation de l'insuline. L' H_2O_2 , en l'oxydant, va l'inhiber, et donc permettre la levée de l'inhibition du signal transmis par l'insuline (Goldstein et al., 2005).

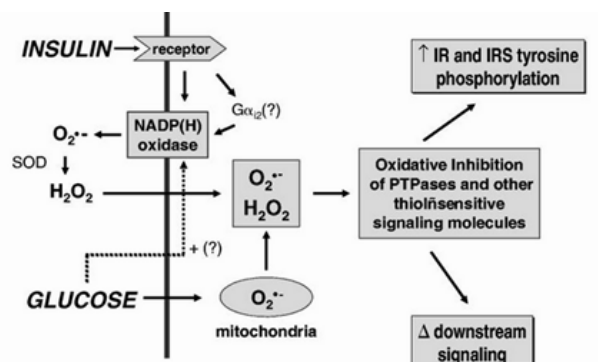


Figure 1 : Mécanismes de transmission du signal insulique via les ERO (Goldstein et al., 2005)

Implication du NO dans le captage de glucose induit par l'insuline

Le NO est impliqué dans les effets de l'insuline sur le captage musculaire de glucose, notamment par son action vasodilatatrice. Si le NO n'intervient pas directement dans les voies de signalisation « classiques » du captage de glucose (stimulées par l'insuline ou la contraction musculaire), il semble qu'il stimule une voie de signalisation différente (Balon and Nadler, 1997). Ces effets sont toutefois initiés par l'insuline elle-même, puisque c'est sa fixation sur son récepteur qui va induire la production de NO au niveau cellulaire (Ritchie et al., 2010).

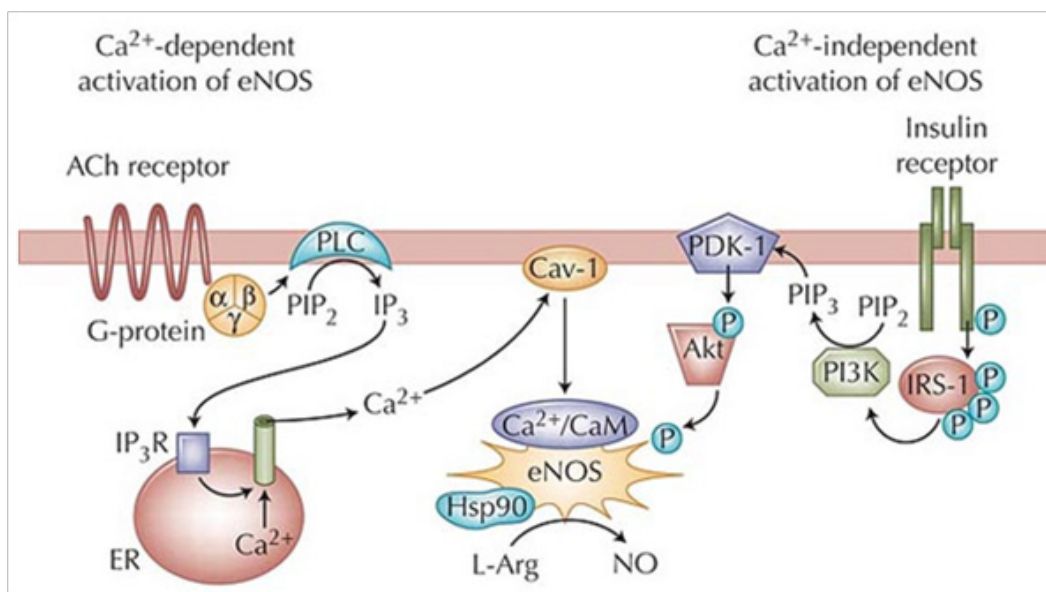


Figure 2 : Activation de l'enzyme eNOS de façon classique (dépendante du Ca^{2+}) et par l'insuline (indépendante du Ca^{2+}) (Vincent et al., 2003)

impliqués dans le développement des complications⁵⁷ permettant dans la majorité des études de prévenir/réduire les principales complications diabétiques (rétinopathie: Mayer-Davis et al., 1998); (neuropathie: Low et al., 1997; Ziegler et al., 1997) ;(fonction neurovasculaire: Cameron et al., 1998).

Un paramètre important à prendre en compte est l'absence quasi-systématique de traitement à l'insuline dans les modèles animaux de DT1, contrairement aux études réalisées chez l'Homme. L'hyperglycémie constante active les mécanismes à l'origine du SO dans des proportions beaucoup plus importantes que chez l'Homme, où les épisodes hyperglycémiques sont sporadiques et peuvent être diminués par un meilleur contrôle glycémique. C'est pourquoi les diverses suppléments testées avec succès chez l'animal (car elles bloquent la production d'ERO induite l'hyperglycémie), n'ont pas toujours les effets escomptés chez l'Homme.

De plus, les ERO étant impliqués dans la stimulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, et dans le captage de glucose induit par l'insuline⁵⁸, il est particulièrement difficile de les réduire dans des proportions adéquates sans voir apparaître des effets opposés à ceux attendus. En effet, les ERO ont des effets contraires selon leur concentration : ils sont nécessaires à faible dose pour la transmission du signal, mais le bloque à haute dose, soulignant l'importance de l'homéostasie redox. La mise en place d'une supplémentation en antioxydants, pour améliorer l'insulinosensibilité de personnes chez qui elle est altérée, semble donc délicate (pour revue, Lei and Vatamaniuk, 2011). Plusieurs études ont d'ailleurs mis en évidence qu'une supplémentation en divers antioxydants chez l'Homme sain mais également pathologique (diabète, cancer), exerçait, contrairement aux résultats attendus, des effets hyperglycémiques, hyperlipidiques et pro-diabétiques. Ces résultats, qui pourraient être attribués à une modification trop prononcée de la balance redox (une réduction trop importante des ERO et ERN, au même titre qu'un excès, les empêche d'exercer leur action physiologique dans le captage de glucose) ont conduit à l'arrêt prématuré de plusieurs études testant une supplémentation en antioxydants à long terme et à grande échelle (pour revue, Lei and Vatamaniuk, 2011).

3.3 Améliorer la prise en charge du diabète en consommant des produits d'origine naturelle : la promesse du soja

Dans les pays asiatiques, la consommation importante de soja est corrélée à une moindre survenue de maladies cardiovasculaires, mais également de cancers du sein ou du colon (Barnes, 1998). Aux Etats-Unis, la Food and Drug Administration (FDA) autorise la mention sur les produits à base de soja des bénéfices pour la santé et les maladies cardiovasculaires (FDA, 1999). Néanmoins, des niveaux de consommations comparables sont difficiles à atteindre dans la population occidentale, en raison

⁵⁷ Une supplémentation en acide lipoïque diminue, par exemple, l'activation du NfκB par les AGE (Bierhaus et al., 1997).

⁵⁸ C'est ce que l'on appelle le Paradoxe Redox : bien que délétères à forte dose, les ERO/ERN sont nécessaires à dose physiologique dans la régulation du métabolisme glucidique (encadré 14)

d'habitudes alimentaires très éloignées⁵⁹. C'est pourquoi de nombreuses études s'attachent à déterminer quelles sont les molécules bioactives dans la graine de soja, afin de les isoler et de les incorporer à un régime alimentaire de type occidental.

Dans le cadre du diabète de type 1, deux classes de molécules nous semblent particulièrement intéressantes : les isoflavones de soja, qui améliorent la régulation de la glycémie et présentent des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes, et les galacto-oligosaccharides (GOS), des prébiotiques qui modifient favorablement la flore intestinale, dont on sait que son altération est largement impliquée dans le développement du diabète de type 1 (cf chapitre 1, paragraphe 3.2.1).

3.3.1 Les isoflavones : des vertus prometteuses pour les diabétiques

Les isoflavones font partie des phytoestrogènes, un large groupe de composés dérivés des plantes et pouvant mimer les effets des œstrogènes. Leur structure est caractérisée par la présence d'un noyau phénol, nécessaire à la fixation sur les récepteurs aux œstrogènes.

La famille des isoflavones comprend au total 12 dérivés, se présentant sous leur forme glycoside ou aglycone⁶⁰. Les substances les plus connues sont les isoflavones aglycones, la génistéine et la daidzéine, et leurs équivalents glycosides, respectivement la génistine et la daidzine (Turner et al., 2003). La formomônétine et la biochanine A sont deux autres dérivés de la famille des isoflavones, précurseurs respectifs de la daidzéine et de la génistéine. Dans les produits non-fermentés, la forme glycoside est largement prédominante sur la forme aglycone (plus de 95%), alors que c'est l'inverse pour les produits fermentés.

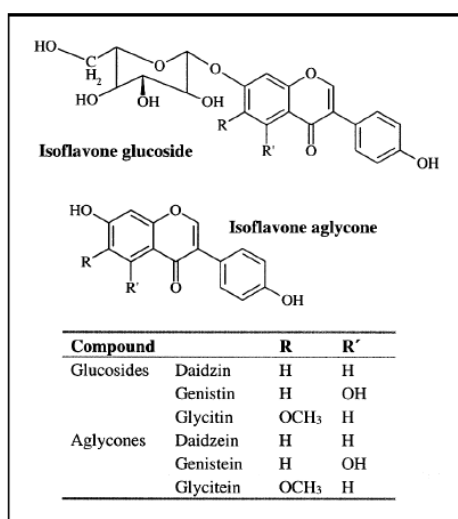


Figure 32 : Représentation des trois principales formes glycosides et aglycones des isoflavones - schéma de la génistéine (Turner et al., 2003)

⁵⁹ Un régime alimentaire de type occidental apporte moins de 10mg d'isoflavones par jour, contre 30 à 100mg pour un régime asiatique (Anderson et al., 2000)

⁶⁰ Le passage de la forme glycoside à aglycone se fait par la perte de la molécule de sucre rattachée aux isoflavones

3.3.1.1 Biodisponibilité

Environ 1% des isoflavones présents dans l'alimentation est retrouvé dans le plasma, indiquant une biodisponibilité orale très faible (Turner et al., 2003). Néanmoins, seulement 1 à 2% des isoflavones ingérés sont excrétés dans les selles, la quasi-totalité étant donc métabolisée par l'organisme. Ceci nécessite le passage de la forme glycoside à la forme aglycone, seule forme qui puisse être absorbée au niveau de l'intestin. La génistéine est alors convertie en 6'-hydroxy-O-desméthylangolésine, alors que les métabolites majeurs de la daidzéine sont l'o-DMA (o-desméthylangolensin) et l'équol (7-hydroxyisoflavan). Il semble que les bénéfices résultant de la consommation d'isoflavones soient largement liés à la présence d'équol, dont l'activité oestrogénique est largement supérieure à celle de la daidzéine ou du O-DMA. Or l'équol n'est retrouvé que chez 30 à 35% des sujets consommant des isoflavones, les 70% restants étant incapables de métaboliser la daidzéine (Rowland et al., 2000).

Par ailleurs, le taux d'absorption au niveau de l'intestin est différent suivant les isoflavones. En effet, la daidzéine et ses formes conjuguées semblent plus biodisponibles que la génistéine et ses métabolites (Xu et al., 1994; King, 1998).

La flore intestinale a également un rôle important dans la biodisponibilité des isoflavones, puisqu'elle peut améliorer leur absorption au niveau de l'intestin (Xu et al., 1995). Le métabolisme des isoflavones au niveau intestinal est le résultat d'actions couplées et complexes de très nombreuses souches de bactéries, et les études tentant d'en isoler les éléments importants n'ont pu que souligner le grand nombre de bactéries impliquées (Turner et al., 2003).

Après le passage de la barrière intestinale, la génistéine et la daidzéine subissent une étape de glucuronidation pour être transférée dans le sang. Ainsi, c'est la forme glucuronide qui prédomine dans le plasma (de 75 à 95-99% d'isoflavones glucuronides selon les auteurs, vs 5 à 10% seulement d'isoflavones aglycones (Zhang et al., 2003)), alors que seule la forme aglycone est retrouvée dans les tissus. Les concentrations d'isoflavones aglycones dans les tissus sont toujours supérieures à celles retrouvées dans le sérum (Chang et al., 2000).

Le délai d'apparition des isoflavones dans le plasma va de un quart d'heure à une heure et demie selon les études (pour revue, Turner et al., 2003).

Dans le cadre d'une consommation régulière, les concentrations plasmatiques et urinaires d'isoflavones (génistéine et daidzéine) sont corrélées à leurs apports alimentaires (Arai et al., 2000).

Hutchins et al. (1995) indiquent que la fermentation améliore la biodisponibilité des phytoestrogènes. En effet, la fermentation permet d'inverser le rapport entre isoflavones glycosides et aglycones, ces derniers étant majoritaires dans les produits fermentés et directement assimilés par l'organisme.

3.3.1.2 *Effets œstrogéniques, toxicité potentielle et consommation maximale d'isoflavones*

L'effet œstrogénique des isoflavones est 100 à 1000 fois moindre que celui de l'oestradiol (Setchell, 1998). Selon l'AFSSA, l'activité œstrogénique des phytoestrogènes a été démontrée en laboratoire mais est différente de celle de l'œstradiol.

De plus, les isoflavones présentent de nombreux effets non-hormonaux expliquant leur activité biologique (Adlercreutz, 1995), ces effets étant retrouvés y compris au niveau des cellules dépourvues de récepteurs aux œstrogènes. Ainsi, la génistéine est un inhibiteur puissant des tyrosine kinases (Akiyama et al., 1987), et influence les facteurs de croissance responsables de la prolifération cellulaire (Kim et al., 1998).

Toutefois, les travaux de l'équipe du Pr Vina (Valence) ont montré que l'effet de la génistéine sur l'expression des enzymes antioxydantes était médié par les récepteurs aux œstrogènes (ER- β) (Borras et al., 2006; Borras et al., 2010).

Si le débat reste ouvert sur de possibles effets toxiques des isoflavones (essentiellement liés à leur possible effet œstrogénique), il semble en réalité que ce soit la dose qui détermine des effets bénéfiques ou néfastes. Ainsi Klein et King (2007) ont défini une concentration *in vitro* de génistéine supérieure à $5\mu\text{M}$ ⁶¹ comme "non-physiologique", et ont ré-examiné les données de la littérature à la lumière de ce critère : il apparaît que les effets toxiques de la génistéine ne sont rapportés que pour des doses supérieures à la dose physiologique. De même, les études *in vivo* cités par Doerge and Sheenan (2002), qui concluent à un effet délétère des isoflavones, ont toutes administré des doses très élevées. A partir des données de la littérature, l'AFSSA a donc défini une dose sans effet toxique observable⁶² de 1mg/kg de poids corporel/jour, ce qui équivaut à une concentration plasmatique de $5\mu\text{M}$.

A ces doses, on constate lors d'une supplémentation en isoflavones que la concentration sanguine en génistéine et daidzéine s'élève jusqu'à l'apparition d'un plateau, au bout de 2 semaines chez la femme (50mg/jour, soit en moyenne un peu moins de 1mg/kg/jour). Chez l'homme, pour une dose légèrement supérieure (100mg/jour, soit en moyenne 1,5mg/kg/jour), les valeurs continuent d'augmenter jusqu'à l'issue des 3 semaines de supplémentation (Djuric et al., 2001). Il semble donc que la durée nécessaire à l'apparition du plateau dépende de la dose ingérée.

3.3.1.3 *Les isoflavones améliorent le métabolisme du glucose chez le sujet diabétique*

La consommation d'isoflavones de soja a montré des effets bénéfiques dans la prise en charge du diabète (Anderson et al., 1999), en réduisant la glycémie et en augmentant l'insulinémie résiduelle chez des animaux diabétiques de type 1.

Chez des souris NOD, une supplémentation de 9 semaines en génistéine ou daizéine permet de limiter l'hyperglycémie (inférieure respectivement de 40% et 36%, comparativement aux contrôles non-

⁶¹ une dose élevée dans la littérature étant plutôt de l'ordre de $50\mu\text{M}$

⁶² En anglais, NOAEL : Non Observable Adverse Effect Level

supplémentés) et préserve les cellules bêta du pancréas (nombre de cellules positives au marquage à l'insuline) (Choi et al., 2008).

Chez des rats rendus diabétiques par streptozotocine (100mg/kg), une supplémentation de huit semaines permet à la fois d'augmenter l'insulinémie et de diminuer la glycémie (Lu et al., 2008), et une supplémentation de trois semaines seulement permet également d'augmenter l'insulinémie et d'améliorer l'HbA1C, indiquant une meilleure régulation de la glycémie (Lee, 2006).

Cette action glucorégulatrice s'explique notamment par le fait que la génistéine stimule directement la production d'insuline par les cellules bêta, en réponse à une stimulation glucidique. Ce phénomène a été mis en évidence à la fois *in vitro* et *in vivo*, pour des doses physiologiques de génistéine (Liu et al., 2006). De plus, une étude utilisant une technique particulièrement sensible de micro-array a pu mettre en évidence *in vitro* que la génistéine et l'équol up-régulaient l'expression des gènes codant pour le récepteur à l'insuline et pour IRS (Blay et al., 2010).

3.3.1.4 Les propriétés anti-inflammatoires des isoflavones

➤ Modèles de culture cellulaire

Dans des modèles de culture cellulaire, les flavonoïdes, et notamment la génistéine, ont un effet sur la réponse immunitaire aigüe et chronique, en supprimant la production du TNF-alpha par de nombreuses cellules (macrophages, microglies...), en réponse à diverses stimulations inflammatoires (LPS, Toll-Likes récepteurs...) (Morris et al., 1999; Kumazawa et al., 2006; Lee and Lee, 2008). La génistéine diminue également la production d'IL-1 et d'IL-6 par de nombreux types de cellules: cellules intestinales, cancéreuses, ostéoblastes, cellules épithéliales gastriques, cellules mononucléaires... (Paradkar et al., 2004). Par ailleurs, elle bloque l'induction de iNOS suite à une stimulation par différents agents inflammatoires impliqués dans le diabète de type 1, et notamment l'IL-1B et l'interferon-γ. La génistéine n'a par contre aucun effet sur l'expression ou la translocation du NF-kB (Salzman et al., 1999).

Plus récemment, Blay et al. (2010) ont étudié par micro-array l'effet des isoflavones sur l'expression des gènes dans les macrophages lors d'une situation inflammatoire induite par LPS et interféron-γ. La génistéine et l'équol diminuent l'expression des gènes codant pour l'IL-1B, la CRP, les récepteurs solubles au TNF-alpha, la iNOS, et diminuent la production de NO par les macrophages.

Dans toutes les études où la daidzéine était également testée, elle n'a eu aucun effet.

➤ Chez l'animal

Les études chez l'animal se sont quasi-exclusivement intéressées à des modèles pathologiques d'inflammation (obésité, insulino-résistance, injection de LPS). Dans ces populations, la génistéine inhibe l'activation du NF-kB (Kang et al., 2001; Palanisamy et al., 2011) et supprime la production de TNF-alpha, d'IL-1 et d'IL-6 normalement observée dans l'inflammation (Zhao et al., 2006; Gudbrandsen et al., 2009; Ji et al., 2011), mais reste sans effet sur la CRP (Chen et al., 2006).

A notre connaissance, seules deux études se sont intéressées à l'effet anti-inflammatoire de la génistéine dans le diabète de type 1. Comme pour les effets antioxydants, ces premiers résultats sont prometteurs :

l'augmentation du TNF-alpha constatée dans le diabète est supprimée (Ibrahim et al., 2010), tout comme les taux d'IL-1B et IL-6 qui sont normalisés (Valsecchi et al., 2011).

➤ Chez l'Homme

Chez l'homme, une étude rétrospective sur plus de 8000 sujets aux Etats-Unis a permis de mettre en évidence une relation inverse entre la consommation d'isoflavones et le taux de CRP dans le sérum (Chun et al., 2008). Cet effet anti-inflammatoire a été confirmé par une étude interventionniste, où une supplémentation en isoflavones de 12 semaines chez des femmes ménopausées diminuait le TNF-alpha (Charles et al., 2009). Toutefois, cet effet semble plutôt résulter d'une meilleure régulation du métabolisme du tissu adipeux, largement impliqué dans l'inflammation (Kim et al., 2010).

3.3.1.5 Les propriétés antioxydantes des isoflavones

➤ Propriétés antioxydantes des composés alimentaires à base de soja

Alezandro et al. (2011) ont analysé le contenu en isoflavones et l'activité antioxydante (par ORAC⁶³) de 15 produits alimentaires commerciaux à base de soja. Si les contenus en isoflavones sont pour la plupart relativement faibles (de 2,4 à 18,1mg/100gr) comparés à la graine de soja elle-même, tous les produits présentent une activité antioxydante conséquente (2000µM équivalent Trolox/100gr). Néanmoins, celle-ci n'est pas corrélée au contenu en isoflavones, et est donc attribuable à la fois aux isoflavones et aux autres polyphénols présents dans la plupart des composés.

➤ Propriétés antioxydantes *in vitro*

Les études sur cultures cellulaires analysant l'effet antioxydant des isoflavones se sont exclusivement intéressées à la génistéine, composé majoritaire dans les produits à base de soja. La génistéine a ainsi démontré sa capacité à inhiber la production d'anion superoxide et d'H2O2 dans des lignées de cellules cancéreuses (Wei et al., 1995). Au niveau mitochondrial, elle diminue également la production d'H2O2 et prévient le relargage du cytochrome C⁶⁴ (Borras et al., 2010). L'incubation de cellules avec des doses physiologiques de génistéine pendant 24 à 48 heures s'accompagne d'une up-régulation de l'expression de différents gènes codants pour des composés antioxydants : la glutathione reductase, la glutathion S-transférase 1 microsomale (Raschke et al., 2006), et la Mn-SOD (Borras et al., 2006).

➤ Propriétés antioxydantes chez l'animal

Chez l'animal, les différentes études ayant testé une supplémentation en isoflavones (mélange d'isoflavones ou génistéine seule) rapportent également une inhibition de la production d'O₂^{•-} et d'H2O2 dans des modèles animaux de tumeurs de la peau (Wei et al., 1995). Elles notent par ailleurs une

⁶³ Oxygen Radical Absorbance Capacity : technique d'évaluation de la capacité d'un composé à neutraliser les radicaux libres

⁶⁴ La fuite de cytochrome C est un témoin de l'attaque des membranes mitochondriales (présent normalement à l'intérieur des membranes). La chaîne respiratoire mitochondriale est perturbée ce qui augmente la production de radicaux libres.

augmentation de la capacité antioxydante totale (Fang et al., 2004), et une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes dans différents tissus (intestin grêle, muqueuse gastrique, foie, reins, peau, poumons) (Cai and Wei, 1996; Liu et al., 2005; Takekawa et al., 2006; Ibrahim et al., 2008), ce qui se traduit par une diminution de la peroxydation lipidique⁶⁵ (Fang et al., 2004; Takekawa et al., 2006; Ibrahim et al., 2008). L'activation du système antioxydant pourrait résulter d'une augmentation de l'expression des gènes codant pour les enzymes antioxydantes, phénomène rapporté pour la Mn-SOD dans le foie et l'intestin (Paradkar et al., 2004; Mahn et al., 2005), et également démontré sur des cultures cellulaires.

Une étude limite cependant ces résultats en indiquant que, seules des doses extra-physiologiques ont permis d'augmenter l'activité de la SOD et de la CAT dans les tissus (Liu et al., 2005). Toutefois dans cette même étude, une consommation de tofu (dont la teneur en isoflavones reste physiologique) a montré des effets supérieurs sur l'activité des enzymes antioxydantes, comparée aux doses supra-physiologiques d'isoflavones pures. Il semble donc que l'activité des isoflavones s'exerce de façon synergique avec d'autres composés présents dans le soja.

➤ Propriétés antioxydantes chez l'Homme

Chez des femmes ménopausées au contraire, une supplémentation en isoflavones ne semble pas avoir de vertus antioxydantes, que ce soit par un renforcement des défenses ou une diminution des dommages oxydatifs. Ainsi, Hsu et al. (2006) n'ont pu mettre en évidence une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes érythrocytaires, après une supplémentation de 6 mois en isoflavones de soja, à dose élevée (150mg/jour). La capacité antioxydante totale du plasma n'est pas non plus améliorée (Vega-Lopez et al., 2005). Cette absence d'effets antioxydants est confirmée par Engelman et al. (2005), qui après une supplémentation de 6 semaines, ne constatent aucune diminution des dommages oxydatifs évalués par les concentrations plasmatiques d'isoprostanes et de protéines carbonylées. Les doses sont cette fois plus proches des recommandations françaises, avec 85 mg/jour d'isoflavones pour des femmes pesant de 70 à 75 kg en moyenne. Toutefois dans ces études, le type d'isoflavones ingérés (glycosides ou aglycones) n'est pas précisé, et la supplémentation est proposée sous forme d'isoflavones associés à des protéines de soja. Or, on sait que cette forme n'est pas la plus adaptée pour bénéficier de l'effet antioxydant des isoflavones (Barbosa et al., 2011), comme nous le verrons au point suivant.

Une étude chez des hommes et des femmes plus jeunes a tout de même rapporté des résultats très encourageants, notant après trois semaines de consommation d'un complément alimentaire à base de soja, une diminution drastique des marqueurs de dommages de l'ADN (de plus de 50%) (Djuric et al., 2001). Tout comme dans l'étude d'Engelman et al. (2005), les isoprostanes plasmatiques n'étaient toutefois pas modifiés, ce qui laisse penser que l'action des isoflavones se ferait par des mécanismes localisés et non systémiques. Les auteurs de cette étude rapportent d'ailleurs que cet effet bénéfique sur les dommages de l'ADN se fait par une inhibition de NFκB empêchant ainsi l'activation du TNF-α. Cet effet

⁶⁵ évaluée par les TBARS, le MDA et les diènes conjugués dans le foie et les TBARS dans la muqueuse gastrique

est retrouvé *in vitro* dans des cultures de lymphocytes. Il s'agirait donc bien d'un mécanisme local (au niveau de la cellule) qui n'implique pas de renforcement des défenses antioxydantes.

➤ Propriétés antioxydantes dans le diabète de type 1

Dans le cadre du diabète, où le SO est important et joue un rôle prépondérant dans le développement des complications, le potentiel antioxydant des isoflavones semble très intéressant. Toutefois, peu d'études à l'heure actuelle se sont penchées sur cette problématique, bien que les quelques résultats disponibles soient encourageants, tout particulièrement dans la prévention des complications.

Ainsi, une supplémentation en génistéine permet d'améliorer la perméabilité de la rétine (Nakajima et al., 2001), d'améliorer la filtration glomérulaire (Stephenson et al., 2005), ou encore de diminuer les signes de neuropathie (Valsecchi et al., 2011), en renforçant les systèmes antioxydants (augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes et du contenu en glutathion), en diminuant les dommages oxydatifs, et en réduisant l'inflammation (Lee, 2006; Valsecchi et al., 2011). Plus récemment, Tie et al. (2012) ont montré chez des souris STZ, que l'administration de génistéine pouvait améliorer la guérison des plaies (en vitesse et en qualité), en normalisant la concentration d'anion superoxyde dans les tissus lésés, via une inhibition de la iNOS. Ce résultat est particulièrement intéressant pour les personnes diabétiques de type 1, puisque ces plaies persistantes sont une cause fréquente d'amputation dans cette population.

Deux études *in vitro* s'intéressant aux complications vasculaires du diabète ont également obtenu des résultats prometteurs : dans un modèle de diabète en culture cellulaire (cellules endothéliales maintenues dans un milieu riche en glucose et en H₂O₂), l'adjonction de génistéine et de daidzéine prévient l'apoptose induite par l'H₂O₂, lève l'inhibition de la prolifération cellulaire (Xu et al., 2009); et bloque l'oxydation des LDL par le glucose⁶⁶ (seulement pour la génistéine) (Exner et al., 2001).

A notre connaissance, une seule étude a rapporté un lien négatif entre isoflavones et diabète de type 1 : l'analyse rétrospective des concentrations sanguines en isoflavones chez 400 sujets diabétiques de type 1 a montré que les sujets ayant les concentrations en isoflavones les plus élevées étaient ceux qui avaient le plus de complications rénales (évaluées par la présence ou non de néphropathie et par son stade de développement) (von Hertzen et al., 2004). Comme dans toute étude chez l'Homme, la question de la part de sujets "équol-producteurs" est primordiale dans la compréhension de ces résultats, toutefois, elle n'est pas abordée par les auteurs, et rend donc difficile toute interprétation.

➤ Influence du type d'isoflavones sur leurs propriétés antioxydantes

Si les propriétés antioxydantes des isoflavones sont bien démontrées (au moins *in vitro*), elles ne sont pas équivalentes pour tous les isoflavones. Arora et al. (1998) ont ainsi étudié *in vitro* l'inhibition de la peroxydation lipidique par les isoflavones, selon qu'ils soient glycosides, aglycones ou métabolisés. Ce sont les métabolites de la génistéine et de la daidzéine qui montrent la plus grande capacité antioxydante, et plus particulièrement l'équol. Leurs composés parents démontrent une activité antioxydante similaire

⁶⁶ Les LDL oxydés par le glucose interviennent dans les complications vasculaires du diabète en participant au phénomène d'athérosclérose

quelle que soit leur forme (les composés glycosides semblent toutefois moins antioxydants, bien que cette différence ne soit pas significative). Ces résultats ont été confirmés par Rimbach et al. (2003) et Rufer et Kulling (2006), qui en analysant la capacité antioxydante totale des isoflavones et de leurs métabolites par différentes techniques (ORAC, FRAP et TAC⁶⁷), ont montré que ce sont les métabolites qui avaient un pouvoir antioxydant plus élevé. Une analyse directe par RPE⁶⁸ indique que c'est un métabolite de la daidzéine (le 8-hydroxydaidzéine) qui est le piègeur le plus efficace vis-à-vis de l'anion superoxyde et du radical hydroxyle (Rimbach et al., 2003). Les différences dans les capacités antioxydantes des composés sont attribuées à leur structure, et notamment le nombre et la position des groupements hydroxyles (Arora et al., 1998). Il est intéressant de noter que ces résultats ont été obtenus pour des concentrations d'isoflavones correspondant à celles retrouvées dans le plasma lors d'une consommation habituelle de produits à base de soja (Rufer and Kulling, 2006).

Enfin, Wiseman et al. (2000) ont vérifié que dans un régime enrichi en soja, l'effet antioxydant était bien lié à la présence d'isoflavones. Alors que chez les sujets consommant une nourriture riche en soja sans isoflavones, aucun changement n'est observé, une diminution de 20% des isoprostanes plasmatiques est rapportée chez les sujets consommant la même nourriture, contenant cette fois des isoflavones à dose physiologique (35mg de génistéine et 21mg de daidzéine par jour, pendant 17 jours).

➤ Influence des modalités d'administration sur les propriétés antioxydantes des isoflavones

Les modalités d'administration des isoflavones sont également primordiales pour bénéficier de leurs effets antioxydants. Seuls les isoflavones prises de façon isolée sont capables d'augmenter la capacité antioxydante au niveau du plasma, contrairement à l'association isoflavones-protéines de soja, ou aux protéines de soja seules (Barbosa et al., 2011). L'hypothèse avancée est que, dans certaines conditions de pH rencontrées dans le tractus gastro-intestinal, une large part des isoflavones précipitent avec les protéines de soja, devenant ainsi inutilisable par l'organisme (Lopes Barbosa et al., 2006).

Par ailleurs, la fermentation dont on sait déjà qu'elle améliore la biodisponibilité des isoflavones, semble également être un facteur important dans l'activité antioxydante. Un composé commercial à base d'extrait de soja fermenté, le FSE (Fermented Soybean Extract), a montré *in vitro* une activité antioxydante supérieure à la vitamine C et au Trolox, en agissant à la fois en stimulant l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPX dans le foie) et en piégeant les RL (Hu et al., 2004).

En conclusion, si les propriétés antioxydantes des isoflavones sont clairement établies *in vitro* et chez l'animal, les résultats sont beaucoup moins évidents chez l'Homme, sain ou diabétique. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce manque de résultats probants, notamment la nature et la forme des isoflavones proposées (glycosides vs aglycones, composés parents vs métabolites,

⁶⁷ Mettre une phrase de précision sur les techniques respectives (ORAC déjà fait page précédente)

⁶⁸ Résonance Paramagnétique Electronique ou Electron Spin Resonance (ESR) : technique directe de quantification et d'identification des radicaux libres basée sur la présence d'un électron non-apparié

fermentation) ou encore la dose administrée. Et surtout, la daidzéine est transformée au niveau de l'intestin en équol, un produit terminal dont on a vu qu'il possédait un pouvoir antioxydant bien plus fort. Si chez les animaux, tous les sujets produisent de l'équol, chez l'homme, seulement 30 à 50% des gens seraient capables de métaboliser la daidzéine en équol. Cette différence expliquerait les résultats contrastés des études sur les bénéfices attendus (mais pas toujours vérifiés) d'une supplémentation en isoflavones chez l'homme (Setchell et al., 2002)⁶⁹.

Les propriétés anti-inflammatoires des isoflavones sont, par contre, clairement établies, tout comme leurs effets bénéfiques sur la régulation de la glycémie chez le DT1. Enfin, leur toxicité potentielle, liée à leur action oestrogénique, a été écartée pour des doses physiologiques.

3.3.2 Les galacto-oligosaccharides

Comme nous l'avons évoqué précédemment, en plus des isoflavones, la graine de soja contient une autre classe de molécules aux propriétés intéressantes : les galacto-oligosaccharides (GOS).

Il s'agit de glucides complexes qui, grâce à leurs liaisons osidiques, résistent à l'hydrolyse de la salive et à l'activité des enzymes digestives de l'intestin. A ce titre, ils peuvent être considérés comme des prébiotiques.

Le terme de prébiotiques a été défini en 1995 comme "des ingrédients nutritionnels non-digestibles, qui affectent positivement l'hôte en stimulant de manière sélective la croissance et/ou l'activité d'une ou d'un nombre limité de bactéries du colon" (Gibson and Roberfroid, 1995). Ce concept est détaillé dans l'encadré 15.

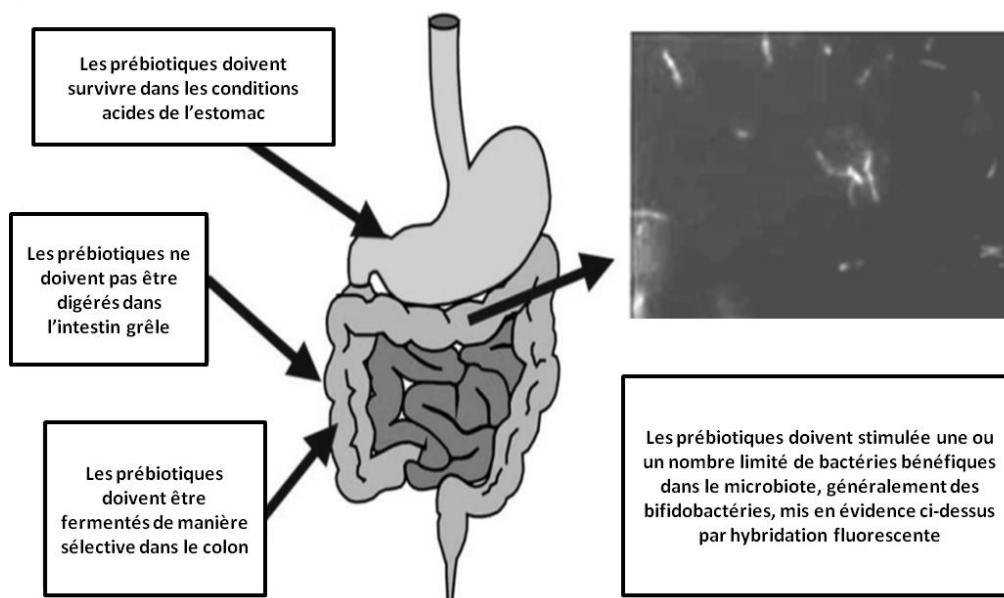


Figure 33 : Le concept de prébiotique (Tuohy et al., 2005)

⁶⁹ Dans cette optique, l'adjonction d'un prébiotique tel que les alpha-GOS, qui pourraient favoriser la synthèse d'équol à partir de la daidzéine, semble indispensable à un complément alimentaire à base d'isoflavones.

Encadré 15 - Les prébiotiques

DÉFINITION/ACTION DES PRÉBIOTIQUES

Les prébiotiques sont communément définis comme «des oligosaccharides ou des polysaccharides à courte chaîne constitués approximativement de deux à vingt unités glucidiques. Ils échappent à la digestion dans l'intestin grêle et sont des substrats potentiels pour l'hydrolyse et la fermentation par les bactéries intestinales.»

Composant prébiotique	Composition	Degré de polymérisation
Xylo-oligosaccharides	β (1→4) liés aux unités de xylose	2-4
Oligosaccharides de soja	Raffinose(F-Gal-G)+stachyose(F-Gal-Gal)	3-4
Oligosaccharides transgalactosylés	6' Galactosyllactose	2-8
Condensats de Palatinose	Molécules de sucrose réarrangées par voie enzymatique	2-7
Isomaltooligosaccharides	Transgalactosylation de maltose	2-8
Inuline	β (2→1) Fructans	2-65
Oligofructose	β (2→1) Fructans	2-8
Lactulose (Bifital®)	Galactosyl- β (4→1) fructose	3-5

Certains composants de la microflore intestinale, particulièrement les bifidobactéries, sont capables de fermenter des substances essentiellement non digestibles (glucides) dans le colon, grâce à son pouvoir saccharolytique important (Kaplan et Hutkins, 2000). Le concept de prébiotique a été développé suite aux travaux de Gibson et Roberfroid (1995), qui ont mis en évidence une stimulation sélective de la croissance de bifidobactéries dans le colon de sujets ayant ingérés de l'oligofructose et de l'inuline.

Les prébiotiques doivent être non digestibles pour servir de substrat aux bactéries spécifiques, principalement les bifidobactéries et les lactobacilles, qui sont actives et améliorent la santé de l'hôte. Les fibres alimentaires comme les polysaccharides (amidon, inuline, pectine...) et les oligosaccharides non digestibles sont ainsi fermentés par les bactéries intestinales, en produisant des acides gras à courte chaîne (notamment les acides acétique, propionique et butyrique), qui sont alors utilisés par les différents tissus de l'hôte comme substrats énergétiques, ou comme facteurs de régulation cellulaire (Blaut, 2002).

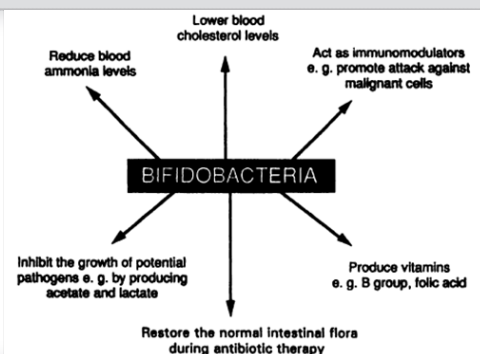
Pour être considéré comme prébiotique (Gibson et Roberfroid, 1995), un ingrédient alimentaire doit:

- a-n'être ni hydrolysé, ni absorbé dans le tractus gastro-intestinal,
- b-être sélectif pour un nombre limité de bactéries endogènes,
- c-modifier la microflore intestinale en améliorant sa composition,
- d-induire des effets intestinaux ou systémiques bénéfiques pour la santé de l'hôte

BÉNÉFICES SUPPOSÉS POUR LA SANTÉ

Actuellement, les études sur les prébiotiques ont mis en évidence une modulation positive de la flore intestinale. Néanmoins, il reste à déterminer si ces modifications peuvent se traduire en terme de bénéfices pour la santé, et selon quels mécanismes, les principales hypothèses étant présentées sur le schéma ci-dessous.

Propriétés supposées des bifidobactéries et bénéfices attendus sur la santé (Gibson et Roberfroid, 1995)



PRÉBIOTIQUES VS PROBIOTIQUES

Les prébiotiques exercent leur action différemment des probiotiques, puisque ces derniers sont des micro-organismes vivants qui viennent renforcer la flore intestinale, en favorisant justement la digestion des fibres dont font partie les prébiotiques. L'avantage des prébiotiques comparés aux probiotiques, est qu'il ne s'agit pas de souches vivantes : leur conservation et leur incorporation dans diverses préparations alimentaires est donc largement facilitées. ¹

¹ Les prébiotiques et probiotiques sont le plus souvent proposés sous la forme d'aliments dits fonctionnels : ils sont intégrés dans les aliments du régime alimentaire habituel.

3.3.2.1 *Activité prébiotique au niveau de l'intestin*

L'effet le plus connu des GOS est la stimulation sélective de la croissance de bifidobactéries, associée à une réduction significative du nombre de bactéries ayant un effet potentiellement pathogène (pour revue, Roberfroid, 1997; Tuohy et al., 2005). En effet, les oligosaccharides dérivés du soja sont utilisés comme substrat énergétique par les bifidobactéries de l'intestin, alors que les bactéries malignes sont incapables de métaboliser ces oligosaccharides.

Les études s'intéressant aux bénéfices potentiels de la consommation de GOS ont toutes utilisé des doses physiologiques (allant de 3 à 20g/j), correspondant aux apports issus des végétaux dans une alimentation équilibrée. L'effet bifidogénique⁷⁰ interviendrait à partir de 4 à 5 g/j, avec un effet optimum vers 10 g/j, et un possible effet laxatif au-delà (Tuohy et al., 2005).

Par rapport à d'autres prébiotiques, les GOS dérivés du soja sont ceux qui ont la plus grande capacité à stimuler les "bonnes" bactéries⁷¹ (Su et al., 2007). Leur nature bifidogénique a été confirmée *in vivo* chez le rat, où elle s'exerce de manière dose-dépendante, et se poursuit tant que dure la supplémentation (Holma et al., 2002).

Toutefois, certaines études ont échoué à mettre en évidence une amélioration du microbiote intestinal suite à une supplémentation en GOS. Il semble que le niveau de départ en "bonnes" bactéries dans l'intestin soit prépondérant dans la capacité des GOS à l'augmenter (Alles et al., 1999). Ainsi, dans le cas du diabète de type 1 où il existerait un déséquilibre du microbiote intestinal (avec diminution des "bonnes" bactéries), les GOS auraient un intérêt tout particulier.

3.3.2.2 *Les GOS améliorent la biodisponibilité des isoflavones*

En plus de leur activité prébiotique, les GOS augmentent la concentration plasmatique des isoflavones en favorisant la conversion des structures glycosylées en structures aglycones, seules capables de passer la barrière intestinale. Ce phénomène intervient même lors de l'ingestion d'isoflavones aglycones, car ces dernières sont en partie absorbées par le foie, qui les retransforme en glucuronides, avant de les relarguer dans l'intestin, où il doivent être retransformés en structure aglycone (Lampe et al., 1998; Rowland et al., 2000).

Les GOS pourraient également influencer la biosynthèse de l'équol, métabolite de la daidzéine possédant un pouvoir oestrogénique et antioxydant plus important que les autres isoflavones (Wiseman et al., 2000).

⁷⁰ Effet favorisant la multiplication des bactéries bénéfiques pour l'organisme

⁷¹ Les bactéries ayant les effets les plus importants sont les lactobacilles et les bifidobactéries

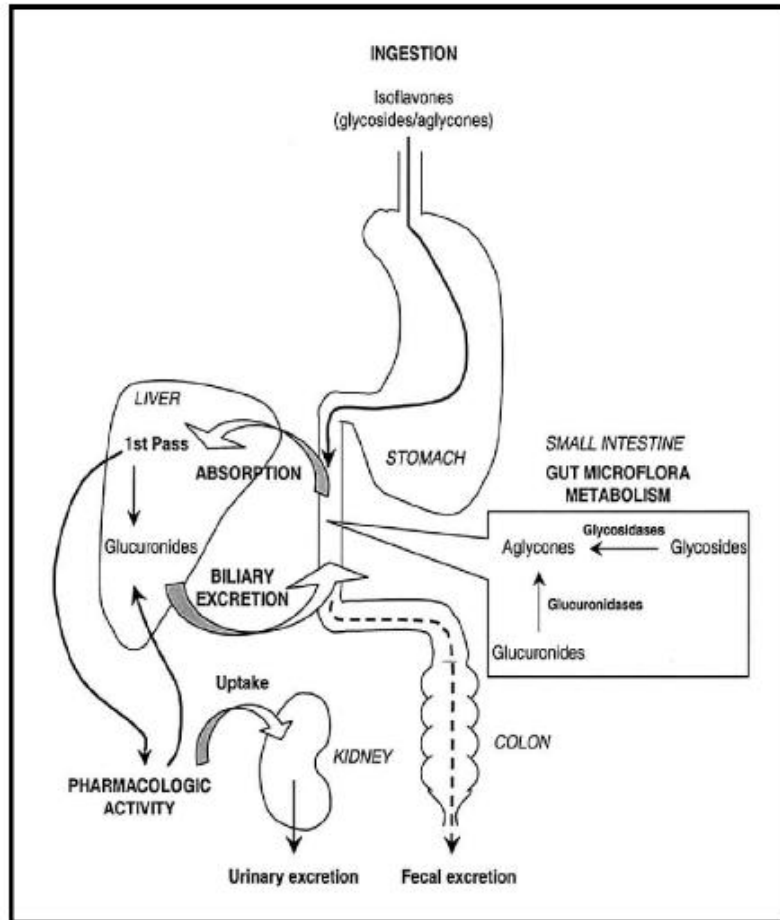


Figure 34 : Représentation schématique de l'importance du métabolisme du microbiote intestinal sur l'activité pharmacologique des isoflavones (Turner et al., 2003)

3.3.2.3 Autre(s) intérêt(s) des GOS dans la prise en charge du DT1

A notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée aux effets des GOS sur le métabolisme glucidique dans le diabète de type 1. Toutefois, quelques études comparables sur le métabolisme glucidique et le profil lipidique ont été menées chez le diabétique de type 2 (pour revue, Tuohy et al., 2005) consommant des fructo-oligosaccharides (FOS) : si aucun bénéfice n'a été mis en évidence, elles n'ont pas noté de risques liés à la consommation d'oligosaccharides par des sujets diabétiques de type 2.

En résumé, les GOS favorisent la biodisponibilité des isoflavones, composés bioactifs majeurs de la graine de soja, et stimulent la croissance des " bonnes " bactéries au niveau du microbiote intestinal. Ils sont donc, à double titre, particulièrement intéressants dans le cadre de la prise en charge nutritionnelle du DT1 par des produits dérivés du soja, bien que leurs effets n'aient jamais été étudiés dans cette population.

3.4 Retrouver les bienfaits du soja dans un complément alimentaire : le PFS (Produit Fermenté de Soja)

Si les bénéfices des composés du soja sont bien démontrés, ils ne s'exercent que pour des consommations importantes, qui ne sont pas atteintes dans un régime alimentaire de type occidental. Le développement de compléments alimentaires permettant d'atteindre une consommation de soja bénéfique sans modifier les habitudes alimentaires semble donc une option intéressante.

C'est le concept d'aliment fonctionnel : ce sont des aliments qui contiennent un ingrédient - un micronutriment ou une substance chimique naturelle - dont on sait qu'il apporte des bénéfices pour la santé (comme la faculté de réduire le risque d'apparition de pathologies spécifiques). D'après le projet FUFOSÉ (Functional Food Science in Europe), " un aliment est appelé fonctionnel s'il contient un constituant (nutriment ou non) qui affecte une ou un nombre limité de fonctions dans l'organisme, selon un mécanisme tel qu'il a un effet positif, ou s'il a un effet physiologique qui va au delà de l'effet nutritionnel traditionnel ". Dans ce cadre, les compléments alimentaires sont considérés comme des aliments fonctionnels.

3.4.1 *Un produit différent et original*

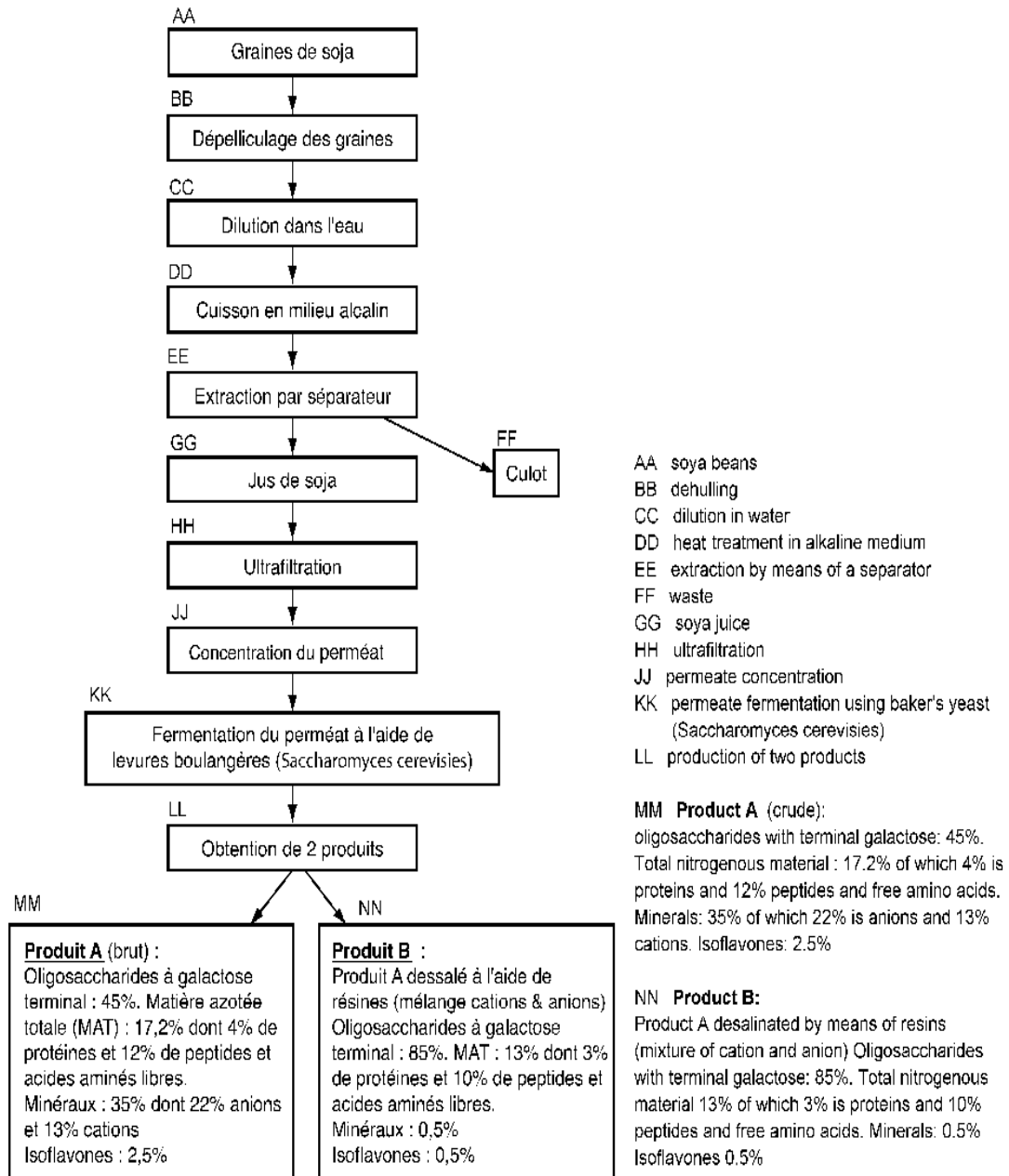
Les compléments alimentaires cherchent souvent à isoler un composé actif. Or, de nombreuses études ont démontré que la consommation de la graine entière apporte un bénéfice bien supérieur à la consommation d'un extrait isolant un principe actif. En effet, la graine entière regroupe de très nombreux éléments qui vont agir de manière synergique, potentialisant les effets respectifs des uns et de autres (Slavin et al., 1999). Ainsi, dans le cadre du diabète, il semble intéressant de conserver l'association des isoflavones et des GOS, pour bénéficier à la fois de l'effet prébiotique et anti-inflammatoire des GOS au niveau de l'intestin, de leur capacité à augmenter la biodisponibilité des isoflavones, puis des effets antioxydants et régulateurs de la glycémie des isoflavones.

La forme d'ingestion est également primordiale lorsque l'on souhaite retrouver l'action d'un principe actif : la fermentation de la graine d'origine, notamment, semble indispensable pour bénéficier pleinement des effets positifs du soja (Hutchins et al., 1995). La fermentation permet en effet de transformer les isoflavones glycosides en isoflavones aglycones, seule forme utilisable par l'organisme.

C'est pourquoi la société Sojasun Technologies a développé le PFS, Produit Fermenté de Soja. Contrairement aux produits déjà existants, le PFS conserve l'association naturelle de différents composés présents dans la graine de soja. Il regroupe ainsi des isoflavones de soja, dont on a vu qu'ils exerçaient de nombreux effets bénéfiques, et des alpha-GOS, aux propriétés bifidogéniques incontestables. Il a par ailleurs l'avantage d'inclure dans sa fabrication une étape de fermentation, afin de proposer les isoflavones sous leur forme aglycone, la plus active biologiquement.

3.4.2 Un produit innovant aux vertus démontrées in vitro

Le processus de fabrication du PFS, qui fait l'objet d'un dépôt de brevet national et international sous le numéro WO 2007/093628 A1, est présenté sur la figure ci-dessous.



La graine de soja est tout d'abord décortiquée et cuite dans de l'eau, pour récupérer un jus de soja, qui est ensuite purifié par ultrafiltration et concentré. Le perméat ainsi obtenu va fermenter grâce à des levures boulangères, pour donner le produit final brut. Pour être propre à la consommation, celui-ci va être dessalé à l'aide de résines, et le produit final se présente sous la forme d'une poudre soluble dans l'eau.

In vitro, le PFS réduit significativement la production d'anion superoxyde de neutrophiles stimulés ou non et diminue significativement l'activité de la myéloperoxydase (figure 33).

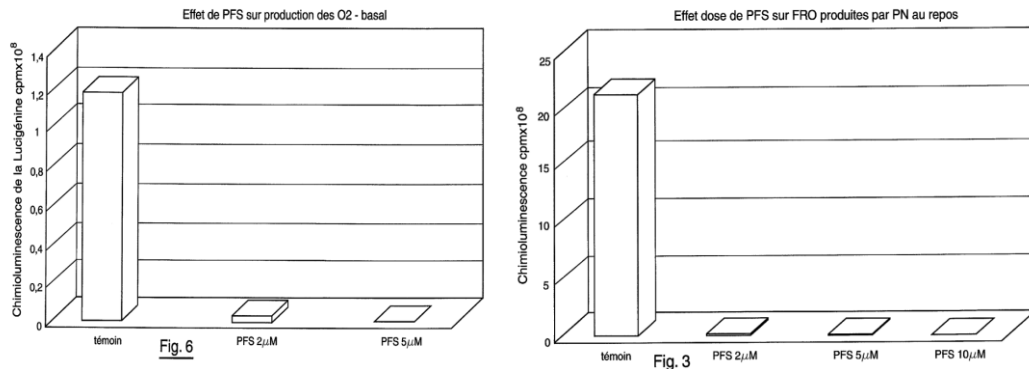


Figure 35 : Effets du PFS sur la production d'anion superoxyde et l'activité de la myéloperoxydase (Efstathiou, 2010)

Si les composés retrouvés dans le PFS (isoflavones et alpha-GOS) ont démontré leurs propriétés antioxydantes de façon isolée *in vivo*, les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires du PFS démontrées *in vitro* exclusivement restent à confirmer *in vivo*.

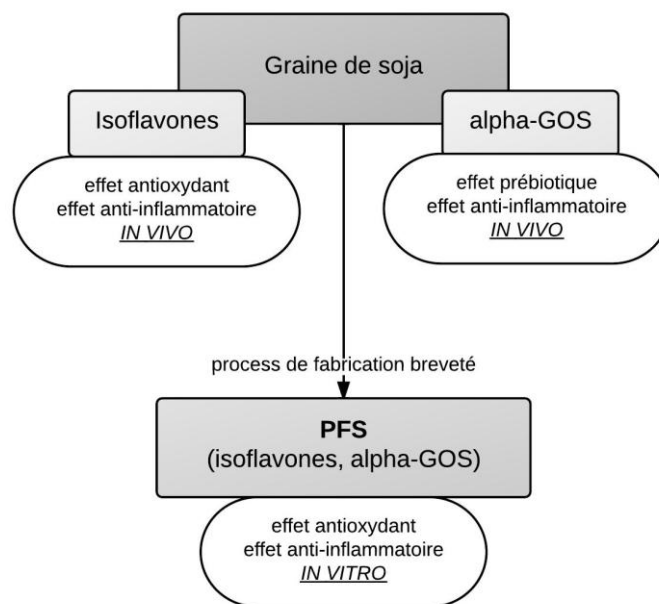


Figure 36 : Effets démontrés des composés de la graine de soja et du PFS

Chez le sujet sain, une supplémentation chronique en antioxydants ne semble pas indiquée, car elle bloque les adaptations physiologiques induites par les modifications modestes et transitoires du statut redox. Dans le diabète, la prise d'antioxydants permet au contraire de renforcer le système antioxydant (en diminuant la glycation) et de prévenir/diminuer les complications. Le PFS (Produit Fermenté de Soja) regroupe deux composés du soja présentant une activité biologique majeure : les alpha-GOS, prébiotiques qui exercent une activité anti-inflammatoire au niveau de l'intestin, et les isoflavones. Ces derniers exercent un effet anti-inflammatoire et antioxydant, y compris dans le diabète, et permettent également d'améliorer le métabolisme glucidique chez les DT1. L'activité antioxydante et anti-inflammatoire du PFS a été démontrée in vitro, mais reste à étudier in vivo, que ce soit chez le sujet sain ou diabétique.

4 Prise en charge globale

Bien que la mise en place d'un seul type de prise en charge du SO dans le DT1 semble insuffisante, très peu d'études se sont intéressées à l'effet couplé de différentes prises en charge existantes (insuline/activité physique/alimentation -supplémentation, par exemple-).

Chez l'Homme, l'insulinothérapie étant indispensable, les prises en charge proposées, qu'elles soient par la nutrition ou par l'activité physique, sont des prises en charge additionnelles au traitement insulinique. Par contre, chez l'animal, aucune étude à notre connaissance, n'a testé cet effet additionnel des différentes prises en charge au traitement insulinique. Ceci est d'autant plus dommage que cette prise en compte de l'effet de l'insuline permettrait de se rapprocher du modèle humain, afin de comprendre au mieux les adaptations observées chez les DT1 en réponse à un entraînement ou une prise en charge nutritionnelle.

Les quelques études disponibles se sont limitées à étudier l'impact d'une prise en charge nutritionnelle à visée antioxydante, sur le SO induit par l'exercice. Les premiers résultats sont prometteurs et incitent à poursuivre ces analyses. Davison et al. (2008) ont ainsi montré que la prise d'un gramme de vitamine C, deux heures avant la réalisation d'un exercice exhaustif, annulait l'augmentation de production de RL observée à l'exercice, chez les sujets diabétiques traités à l'insuline ayant consommé un placebo⁷². Une supplémentation de 4 semaines en zinc ou en sélénium permet également de normaliser les réponses à l'exercice chez des rats diabétiques (disparition de l'augmentation du MDA et de la diminution d'activité des enzymes antioxydantes) (Akil et al., 2011; Bicer et al., 2012). Une supplémentation en aminoguanidine (inhibiteur de glycation) couplée à un programme d'entraînement chez le rat a des effets divergents selon les enzymes étudiées L'activité de la SOD, diminuée chez les animaux diabétiques, n'est modifiée par aucun traitement. Pour la GPX et la CAT, l'aminoguanidine permet d'augmenter leur activité, mais l'entraînement ne majore pas cet effet. Il faut toutefois noter que chez les rats diabétiques comparés aux rats sains, l'activité de la GPX n'était pas modifiée, et que celle de la CAT était même augmentée (Stoppa et al., 2006).

Les adaptations à différentes prises en charge couplées du DT1 semblent donc complexes, et les résultats des premiers travaux, s'ils ne permettent pas de conclure, sont encourageants et incitent à poursuivre l'exploration des prises en charge plurielles.

⁷² Mesure directe de la production de RL *in vivo* par RPE

Prise en charge du SO dans le diabète de type 1 : bilan des données actuelles

Les prises en charge existantes sont aujourd'hui de trois types : l'insulinothérapie, l'activité physique, et les compléments alimentaires.

Si les injections régulières d'insuline permettent effectivement de réduire le SO, elles sont insuffisantes pour normaliser la balance pro/antioxydante, nécessitant la mise en place de prise(s) en charge additionnelle(s).

Les effets antioxydants de l'activité physique sont bien démontrés chez le sujet sain, mais les premiers résultats chez le sujet diabétique, s'ils sont intéressants, nécessitent d'être précisés. Ces résultats, essentiellement chez l'animal (une seule étude chez l'Homme) montrent souvent une amélioration de l'un ou l'autre des marqueurs de SO, sans amélioration globale ; ce qui laisse penser que l'activité physique exercerait pleinement ses effets bénéfiques en étant couplée à une autre prise en charge comme.

Enfin, une supplémentation en antioxydants permet de réduire la production d'ERO/ERN et de renforcer le système antioxydant dans le DT1, réduisant ainsi les complications. Parmi les composés existants, le Produit Fermenté de Soja, développé par la société Sojasun Technologies, présente l'avantage de regrouper différents composés exerçant des effets complémentaires dans le cadre de la prise en charge du DT1 : un effet anti-inflammatoire au niveau de l'intestin pour les alpha-GOS, un effet antioxydant et anti-inflammatoire au niveau systémique, et un effet glucorégulateur pour les isoflavones. Si les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires du PFS ont été établies *in vitro*, elles restent à confirmer *in vivo*.

Enfin, il est surprenant de constater que ces différentes prises en charge, alors même qu'elles montrent des limites lorsqu'elles sont proposées séparément, n'ont que très peu été étudiées conjointement. Les rares études disponibles présentent de nombreuses limites, et des investigations sont encore nécessaires pour déterminer les possibles bénéfices d'une prise en charge plurielle du SO dans le DT1.

SYNTHESE ET OBJECTIFS

Le diabète de type 1 touche aujourd'hui plus de 10 millions de personnes dans le monde, et son incidence est en constante augmentation. Il est à l'origine de complications, notamment d'ordre cardiovasculaires, à pronostic vital. Les mécanismes à l'origine des complications diabétiques sont relativement bien compris, et les dernières recherches dans ce domaine ont mis en évidence un dénominateur commun à ces complications : **le Stress Oxydant (SO) induit par l'hyperglycémie** (Baynes and Thorpe, 1999).

L'insulinothérapie constitue l'élément majeur du traitement du DT1, la réduction de l'hyperglycémie permettant de réduire le SO. Toutefois, le traitement par insuline ne normalise jamais parfaitement la glycémie, et les épisodes hyperglycémiques récurrents engendrent un SO persistant. Ce dernier est lui-même à l'origine d'une insulino-résistance, qui renforce alors l'hyperglycémie. Le SO induit, de plus, une inflammation, majorant l'inflammation initiale résultant des altérations du microbiote intestinal. L'association du SO et de l'inflammation conduit à des dysfonctions endothéliales, complications majeures du diabète.

Les limites de l'insulinothérapie dans la prise en charge du SO induit par l'hyperglycémie conduisent à proposer une prise en charge plurielle, associant à l'insuline une hygiène de vie adaptée, notamment la pratique d'une activité physique et une alimentation équilibrée.

En effet, il est bien démontré, chez le sujet sain, que l'entraînement aérobie exerce un effet antioxydant en "up-régulant" l'expression des enzymes antioxydantes. Chez le sujet diabétique, les résultats sont plus contrastés, rapportant l'amélioration de certains marqueurs du SO sans amélioration générale. Les mécanismes sous-jacents restent à explorer : les effets bénéfiques observés résultent-ils de l'amélioration de la glycémie par l'activité physique, d'une "up-régulation" des enzymes antioxydantes, ou encore d'une diminution de la production d'espèces oxydantes ?

Par ailleurs, de nombreux compléments alimentaires à visée antioxydante et/ou anti-inflammatoire sont disponibles sur le marché. La société Sojasun Technologies a mis au point un extrait dérivé de la graine de soja, le PFS, dont les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires ont été bien démontrées *in vitro*. L'intérêt particulier de ce produit dans le diabète résulte de l'association préservée de deux composés biologiquement actifs du soja : les isoflavones, qui en plus d'exercer un effet antioxydant et anti-inflammatoire, contribuent à l'amélioration du métabolisme glucidique chez le sujet DT1 ; et les alpha-GOS, prébiotiques qui potentialisent l'absorption intestinale des isoflavones, et contribuent à corriger les altérations du microbiote intestinal, à l'origine du DT1. Toutefois, l'efficacité *in vivo* du PFS reste à démontrer, que ce soit chez le sujet sain ou diabétique, tant en terme d'effets antioxydants et anti-inflammatoires que sur le métabolisme glucidique, et notamment les stocks de glycogène. Ce dernier point revêt une importance toute particulière, puisque les stocks de glycogène conditionnent en partie la tolérance à l'exercice physique (diminuée chez le diabétique), et résultent des interactions entre le statut diabétique et le statut oxydant (les espèces oxydantes étant impliquées dans le captage de glucose).

Enfin, il est surprenant de constater que, malgré les limites des différentes prises en charge proposées isolément aux sujets diabétiques, très peu d'études ont testé leurs effets conjoints. Or, nous faisons l'hypothèse que l'association de ces différentes approches, dont les effets s'exercent par des mécanismes

différents, peut lutter contre le SO induit par l'hyperglycémie dans le DT1, et donc contre les complications associées.

L'objectif de ces travaux de thèse est d'évaluer si une prise en charge plurielle du DT1 permet de réduire efficacement le SO, en associant différentes approches qui agissent par des mécanismes différents mais complémentaires, et de déterminer la part respective de chacun de ces mécanismes dans les effets observés. Ces différentes approches s'appuient sur l'insulinothérapie, une prise en charge nutritionnelle (via la prise d'un complément alimentaire à base de soja) et l'activité physique (via un entraînement en endurance).

Les objectifs spécifiques de cette thèse sont les suivants :

- Déterminer si le PFS, un composé alimentaire à base de soja associant des isoflavones aux propriétés antioxydantes et glucorégulatrices, et des prébiotiques agissant au niveau intestinal pour diminuer l'inflammation, peut réduire le SO *in vivo* dans un modèle de rat DT1. Nous faisons l'hypothèse que le PFS réduit le SO *in vivo*, non seulement grâce à ses propriétés antioxydantes, mais également grâce à ses propriétés glucorégulatrices et anti-inflammatoire (étude 1).
- Déterminer si ce composé peut améliorer le métabolisme glucidique, et notamment les stocks de glycogène musculaire, facteur majeur de la tolérance à l'exercice physique. Nous faisons l'hypothèse que les stocks de glycogène sont diminués dans notre modèle animal de DT1, et qu'ils pourraient être corrigés (partiellement ou totalement) par une prise en charge antioxydante, le SO étant impliqué dans le captage musculaire de glucose (étude 2).
- Déterminer si l'insulinothérapie et l'activité physique, proposées seules ou en association, peuvent réduire le SO dans notre modèle de DT1. Nous faisons l'hypothèse que l'insuline diminue le SO en régulant la glycémie, alors que l'activité physique agit à la fois en régulant la glycémie (dans une moindre mesure que l'insuline) et en renforçant le système antioxydant. L'association des deux prises en charge devrait donc permettre de potentialiser leurs effets respectifs (étude 3).
- Mettre au point une technique d'analyse novatrice permettant d'étudier le phénomène de glycation des enzymes antioxydantes, ce qui permettrait de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux adaptations observées, et notamment de différencier les adaptations résultant d'une "up-régulation" du système antioxydant de celles résultant d'une réduction de l'hyperglycémie.
- Déterminer les mécanismes par lesquels les deux prises en charge (insuline et entraînement) diminuent la production d'anion superoxyde au niveau vasculaire, siège des complications diabétiques. Nous faisons l'hypothèse que l'insuline et l'activité physique inhibent (dans des proportions différentes) les trois principales enzymes productrices d'anion superoxyde dans l'aorte, la NADPH-oxydase, la xanthine oxydase, et la NOS. Leurs effets inhibiteurs respectifs seraient donc additifs, limitant la production d'anion superoxyde dans des proportions supérieures à celles observées lorsque les prises en charge sont proposées isolément (étude 4).

CONTRIBUTIONS PERSONNELLES :
TRAVAUX EXPERIMENTAUX

Publications et communications

L'ensemble des travaux expérimentaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont donné lieu aux publications et communications présentées ci-dessous.

1 Publications relatives au travail de thèse

Malardé, L., Gratas-Delamarche, A., Lefeuvre-Orfila, L., Vincent, S., Efstathiou, T. and Groussard, C. A Fermented Soy Permeate improves the skeletal muscle glucose level without restoring the glycogen content in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Food*. 2012 Sous Presse.

Malardé, L., Groussard, C., Lefeuvre-Orfila, L., Vincent, S., Efstathiou, T. and Gratas-Delamarche, A. Fermented Soy Permeate reduces inflammation and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. Soumis à *Nutrition Research*.

Malardé, L., Gratas-Delamarche, A., Le Douairon-Lahaye, S., Zguira, MS., Vincent, S., Lemoine-Morel, S. and Groussard, C. Endurance training and insulin therapy are both required to obtain the full therapeutic benefit on oxidant stress and glyceemic regulation in diabetic rats. Soumis à *Diabetes & Metabolism*.

Malardé, L., Rebillard A., Le Douairon-Lahaye, S., Vincent, S., Zguira, MS., Lemoine-Morel, S., Gratas-Delamarche, A., and Groussard, C. Superoxide production pathways in aorta of diabetic rats : beneficial effects of insulin therapy and endurance training. Soumis à *Diabetes & Metabolism*.

2 Communications orales

Malardé L., Groussard C., Lefeuvre-Orfila L., Vincent S., Vassaux D., Efstathiou T., Gratas-Delamarche A. Fermented Soy Permeate reduces inflammation and oxidant stress in streptozotocin-induced diabetic rats. 6th Annual Meeting of the French Society of Physiology, Pharmacology and Therapeutics, 22-24 mars 2011, Grenoble, France. Publication des résumés: *Fund Clin Pharmacol.* 2011 Apr; 25(Suppl.1) :1-111.

Malardé, L., Groussard, C., Le Douairon-Lahaye, S., Zguira, M., Vincent, S., Lemoine-Morel, S. and Gratas-Delamarche, A. L'entraînement peut-il potentialiser les effets bénéfiques de l'insuline sur le stress oxydant chez des rats rendus diabétiques par streptozotocine? 14ème congrès de l'ACAPS, Rennes, 24-26 octobre 2011.

3 Communications affichées

Malardé L., Groussard C., Le Douairon-Lahaye S., Zguira MS., Vincent S., Lemoine-Morel S., Rannou-Bekono F. Comparative effects of treatment by insulin and/or exercise on oxidant stress in streptozotocin-induced diabetic rats. 15th Annual Congress of the European College of Sport Sciences, 23-26 juin 2010, Antalya, Turquie.

Malardé L., Le Douairon-Lahaye S., Rebillard A., Groussard C., Rannou-Bekono F. Influence of duration of streptozotocin-induced diabetes on oxidant stress. IVth International Symposium Nutrition, Oxygen Biology, and Medicine, Paris, 15-17 juin 2011.

Etude 1 : Un Produit Fermenté de Soja (PFS) réduit l'inflammation et le stress oxydant chez des rats rendus diabétiques par streptozotocine

INTRODUCTION

La consommation de soja est associée dans la population asiatique à une réduction de la prévalence de certaines pathologies, notamment les maladies cardiovasculaires et des cancers. Ces effets ne sont toutefois pas retrouvés dans les pays occidentaux, car la consommation de soja y est trop faible pour bénéficier des mêmes effets protecteurs pour la santé. C'est pourquoi de nombreuses études cherchent à déterminer les composés biologiquement actifs de la graine de soja, afin de les intégrer à des compléments alimentaires à destination des occidentaux. Parmi ces composés, les isoflavones sont les plus étudiés, en raison de leurs multiples activités biologiques, notamment antioxydantes et anti-inflammatoires.

Le diabète de type 1 (DT1) est une pathologie auto-immune médiée par des mécanismes oxydants et inflammatoires, conduisant à la destruction des cellules bêta du pancréas, puis par la suite, à de nombreuses complications. La pathogenèse du DT1 a récemment été attribuée à de multiples altérations du microbiote intestinal, qui déclenchent des processus inflammatoires via une réponse immunitaire anormale.

Les effets bénéfiques de la consommation d'isoflavones de soja, et notamment ses propriétés glucorégulatrices, ont été largement étudiés dans la population diabétique. De plus, dans un modèle de diabète induit par streptozotocine, la génistéine stimule l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, GPX, CAT), diminue la peroxydation lipidique, et normalise la concentration plasmatique de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF-alpha). Par ailleurs, un autre composé du soja, les alpha-galactooligosaccharides (alpha-GOS), exercent un effet prébiotique qui participe à la restauration du microbiote intestinal, pouvant ainsi diminuer l'inflammation générée à ce niveau dans le diabète. Les alpha-GOS améliorent également l'absorption intestinale des isoflavones. Pourtant, leur effet n'a été que très peu étudié dans le diabète.

L'association de ces deux composés biologiquement actifs de la graine de soja, les isoflavones et les alpha-GOS, est préservée dans le Produit Fermenté de Soja (PFS), un complément alimentaire développé par la société Bretonne Sojasun Technologies. Ce produit exerce un fort effet antioxydant et anti-inflammatoire *in vitro*. L'objectif de cette étude est de déterminer si le PFS réduit le SO *in vivo*, dans un modèle de rat DT1, en exerçant simultanément un effet anti-inflammatoire et antioxydant.

MATERIEL ET METHODES

Pour déterminer l'effet du PFS sur le SO et l'inflammation dans le DT1, nous avons utilisé un modèle de diabète de type 1 par injection de streptozotocine (45 mg/kg) et une supplémentation quotidienne en PFS par gavage. Le PFS se présente sous la forme d'une poudre hydrosoluble contenant 29% d'alpha-GOS et

0,5% d'isoflavones. Il est dilué à 10% dans un volume d'eau ajusté quotidiennement au poids de l'animal, pour assurer un apport de 1 mg d'isoflavones par jour et par kilogramme, la dose physiologique correspondant aux recommandations de l'AFSSA. Les animaux ont libre accès à l'eau et à une nourriture exempte de soja (2020X Teklad Global Soy Protein-Free, Harlan).

Trente rats Wistar mâles ont ainsi été répartis en trois groupes de 10 animaux chacun: sains placebo, diabétiques placebo, diabétiques supplémentés en PFS. A l'issue de trois semaines de supplémentation, les animaux ont été sacrifiés après 24 heures de jeûne : la glycémie a été mesurée, le sang collecté par ponction cardiaque et centrifugé pour récupérer le plasma, et le muscle gastrocnémien rapidement prélevé. Les prélèvements ont tous été stockés à - 80°C dans l'attente des analyses ultérieures. Les paramètres biochimiques (fructosamine pour le contrôle glycémique et CML pour la glycoxydation) et les marqueurs de l'inflammation (CRP, IL-1 et IL-6) ont été déterminés dans le plasma. Les marqueurs de dommages oxydatifs (isoprostanes et GSH/GSSG), l'activité des enzymes antioxydantes (SOD et GPX) et l'expression de la Mn-SOD ont été déterminés dans les homogénats musculaires. L'ensemble des détails techniques du protocole est présenté en annexe dans la section Fiches techniques.

RESULTATS

Comme attendu, à la fin du protocole, les rats diabétiques présentent une glycémie et une concentration plasmatique de fructosamine et de CML plus élevée que les rats sains. La supplémentation en PFS n'a pas d'effet sur la régulation de la glycémie, mais permet de diminuer significativement la CML, un marqueur de glycoxydation (-36%, $p < 0,001$).

La diminution de l'activité des enzymes antioxydantes observée chez les diabétiques comparée aux sains est corrigée par trois semaines de supplémentation en PFS. Le contenu en Mn-SOD, également diminué chez les diabétiques, tend à augmenter suite à trois semaines de supplémentation (NS), sans être restauré au niveau des rats sains.

Enfin, la supplémentation en PFS réduit significativement les marqueurs de l'inflammation (acide urique, IL-1 et IL-6) chez les rats diabétiques.

CONCLUSION

Les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires du PFS sont confirmées *in vivo* dans notre modèle animal de diabète de type 1. Le PFS exerce à la fois un effet antioxydant en renforçant les défenses antioxydantes enzymatiques, et un effet anti-inflammatoire, ce qui réduit efficacement le SO dans le diabète, comme l'atteste la diminution de la CML.

Ces résultats valident, dans notre modèle animal de DT1, l'efficacité d'une approche plurielle (antioxydante et anti-inflammatoire) pour réduire efficacement le SO, sans toutefois que le PFS n'améliore le contrôle glycémique. Le SO diminué par le PFS étant impliqué dans le captage musculaire de glucose, et les isoflavones possédant des propriétés glucorégulatrices, il serait intéressant de vérifier par ailleurs si le PFS peut, au niveau musculaire, améliorer le métabolisme glucidique (étude 2).

Fermented Soy Permeate reduces inflammation and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats

L. MALARDE^a; C. GROUSSARD^a; L. LEFEUVRE-ORFILA^a; S. VINCENT^a; T. EFSTATHIOU^b; A GRATAS-DELAMARCHE^a

^a: Laboratory M2S, Université Rennes 2-ENS Cachan, Avenue Charles Tillon, CS24414 35044 Rennes

^b: Sojasun Technologies, Rue Alain Fournier, 35530 Noyal sur Vilaine

Corresponding author

Carole Groussard (PhD)

Laboratoire M2S – UFR APS

Université Rennes 2-ENS Cachan

2, avenue Charles Tillon

CS24414

35044 RENNES Cedex

Email: ludivine.malarde@gmail.com

Phone number: (+33)2.99.14.17.75

Fax number:(+33)2.99.14.17.74

Abbreviations

NF-kB; Nuclear Factor-kappa B

TNF-alpha; Tumor Necrosis Factor-alpha

IL-1; interleukin-1

IL-6; interleukin-6

SOD; superoxide dismutase

GPX; glutathione peroxidase

CAT; catalase

TBARS; thiobarbituric acid reactive substances

Alpha-GOSs; alpha-linked galactooligosaccharides

FSP; fermented soy permeate

EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid

GSH/GSSG; reduced/oxidized glutathione ratio

MV2P; 1-methyl-2-vinylpyridinium trifluoromethanesulfonate

CML; N(ϵ)-(carboxymethyl)lysine

LC/MS; liquid chromatography-mass spectrometry

ROS; reactive oxygen species

Abstract

Oxidative stress and inflammation are involved in the development of type 1 diabetes and its complications. Because two compounds found in soy, i.e., isoflavones and alpha-galactooligosaccharides (alpha-GOSs), have been shown to exert antioxidant and anti-inflammatory effects, this study aimed to assess the effects of a dietary supplement containing these two active compounds on oxidative stress and inflammation in a type 1 diabetic animal model. The dietary supplement tested was a patented compound, Fermented Soy Permeate (FSP), developed by the French Company Sojasun Technologies.

Thirty male Wistar rats were divided into the control placebo, diabetic placebo and diabetic FSP-supplemented groups. They received by oral gavage water (placebo groups) or diluted FSP (0.1 g/day; FSP-supplemented group) daily for a period of three weeks. At the end of the protocol, glycemic regulation (glycemia and fructosamine level); the plasma level of carboxymethyllysine (CML), a marker of systemic oxidative stress in diabetes; and the plasma levels of inflammatory markers (CRP, IL-1 β , IL-6, uric acid) were evaluated. Markers of oxidative damage (isoprostanes and GSH/GSSG), the levels of antioxidant enzymatic activity (SOD and GPX) and the Mn-SOD content were determined in skeletal muscle (gastrocnemius).

Diabetic placebo rats exhibited higher CML levels, lower SOD and GPX activities, and decreased Mn-SOD contents. FSP supplementation in diabetic animals normalized the CML level and antioxidant enzymatic activity levels and tended to increase Mn-SOD expression. The markers of inflammation whose levels were increased in the diabetic placebo group were all markedly decreased by FSP (IL-1 β : -75%, IL-6: -46%, uric acid: -17%), except for CRP.

Our results demonstrate that FSP exhibited antioxidant and anti-inflammatory properties in vivo in streptozotocin-induced diabetic rats.

Key words: alpha-galactooligosaccharides; inflammation; oxidative stress; soy isoflavones; type 1 diabetes.

INTRODUCTION

Soy consumption is well known to exert some health benefits in Asian individuals and is associated with reductions in the prevalence of cardiovascular diseases and cancer (Barnes, 1998). Because soy intake is very low in Western countries, primarily because of cultural differences in diet (Anderson et al., 1999), numerous studies have aimed to identify the biologically active components in soy so that these components can be included in dietary supplements for this population.

Among all of the active compounds in soy, isoflavones are the most widely studied. They exhibit a number of biological activities, including antioxidant and anti-inflammatory properties. Soy isoflavones has been reported to increase the activities of antioxidant enzymes (Cai and Wei, 1996; Liu et al., 2005; Takekawa et al., 2006; Ibrahim et al., 2008) and up-regulate the expression levels of these genes (Borras et al., 2006), increase the total antioxidant capacity (Fang et al., 2004), decrease reactive oxygen species (ROS) production (Wei et al., 1995; Borras et al., 2010) and reduce the level of oxidative damage (Djuric et al., 2001; Fang et al., 2004; Takekawa et al., 2006; Ibrahim et al., 2008). Genistein, one of the isoflavones in soy, is also able to inhibit inflammatory processes by suppressing NF- κ B activation (Kang et al., 2001; Palanisamy et al., 2011) and the production of TNF- α , IL-1 and IL-6 (Zhao et al., 2006; Ji et al., 2011).

Type 1 diabetes mellitus is an auto-immune disease that is mediated by oxidant and inflammatory mechanisms, leading to β -cell destruction. The pathogenesis of this disease has recently been attributed to multiple alterations to the gut microflora (Vaarala, 2012), which trigger inflammatory processes via an abnormal immune response. Oxidative stress and inflammation are implicated in the onset and progression of diabetes-induced complications, such as neuropathy, nephropathy, and cardiovascular diseases [2728].

The beneficial effects of soy consumption, such as the glucoregulatory effects of isoflavones, on the therapeutic management of type 1 diabetes have been highlighted (Anderson et al., 1999). Furthermore, in a streptozotocin-induced diabetic animal model, genistein has been shown to restore altered antioxidant enzyme activities (SOD, GPX, CAT), decrease the TBARS level, and normalize the concentrations of pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF- α), which are increased in individuals with diabetes (Valsecchi et al., 2011). Other compounds found in soybeans, namely GOSs (galactooligosaccharides), have the ability to correct alterations to the gut microflora (Tuohy et al., 2005) and thus decrease the inflammatory state in a different way. Moreover, GOSs potentiate the absorption of isoflavones (Tamura et al., 2003). Nevertheless, the potential benefits of GOSs in type 1 diabetes have rarely been studied, unlike the effects of soy isoflavones.

A French company, Sojasun Technologies, has developed a powder extracted from soybeans called Fermented Soy Permeate (FSP). The novelty and originality of this product is due to the presence of both types of active molecules from soybeans: isoflavones and alpha-linked galactooligosaccharides (alpha-GOSs). The presence of both types of compounds allows the preservation of the synergistic effects of soy components, as the benefits of whole grains vs isolated components have recently been highlighted (Reinwald et al., 2010). This patented compound has been shown to exhibit strong antioxidant and anti-

inflammatory effects *in vitro* (Efstathiou, 2010). Because type 1 diabetes is characterized by a pro-oxidant and pro-inflammatory state, we designed the present study to test the hypothesis that FSP can reduce oxidative stress and inflammation in an *in vivo* model of streptozotocin-induced type 1 diabetes.

MATERIALS AND METHODS

1. ANIMALS

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee of the University of Rennes and was in accordance with the Guide for the Care and Use of the Laboratory Animals. Thirty nine-weeks-old male Wistar rats were obtained from Janvier (St-Gesnet-sur-Isle, France) and housed individually in an air conditioned room with a controlled temperature (23–25 ° C) and automatic lighting (12/12 h light/dark cycle). Tap water and food (2020X Teklad Global Soy Protein-Free Extruded Rodent Diet, Harlan, Netherlands) were available ad libitum.

2. DIABETES INDUCTION

After one week of acclimatization, diabetes was induced by intraperitoneal streptozotocin injection (Sigma Aldrich Chemical, France). Streptozotocin was freshly dissolved in citrate buffer (0.1 mol/L, pH4.5) and administered at a dose of 45 mL/kg of body weight. An additional control healthy group received citrate buffer only. The blood glucose concentration was measured 48 h later (MediSense Optium® glucometer, Abbott, France); animals with blood glucose levels greater than 250 mg.dL⁻¹ were considered diabetic. The others received a second injection of streptozotocin, and the blood glucose concentration was measured again 48 h after this second injection (Szkudelski, 2001). Animals with glycemia under 250 mg.dL⁻¹ after the two injections were not included in the protocol.

3. PRODUCTION OF FSP AND SUPPLEMENTATION PROTOCOL

Fermented Soy Permeate was provided by Sojasun Technologies, which patented the manufacturing process. In this process, soybeans are dehulled and cooked in water, and then the soy milk is extracted and condensed. The soy extract is then subjected to a fermentation step with baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and desiccated to obtain a dry powder. The final product is a soluble powder containing 29% alpha-GOSs and 0.5% soy isoflavones (daidzein and genistein).

One week after the confirmation of diabetes, oral supplementation began, and the rats were randomly assigned to one of three groups (n=10 rats per group): group 1, healthy control rats supplemented with the placebo; group 2, diabetic rats supplemented with the placebo; and group 3, diabetic rats supplemented with FSP.

FSP powder was diluted in water (10%) and administered each day by oral gavage for a period of three weeks. Water was used as the placebo. The volume administered was adjusted daily according to the body weight of each animal. Each rat received an FSP dose equivalent to 1 mg of soy isoflavones and 70 mg of

alpha-GOSs/day/kg of body weight, according to the recommendations of the French Agency of Food Safety.

4. PREPARATION OF BLOOD AND TISSUE SAMPLES

At the end of the intervention protocol, the animals were fasted for 24 h and then anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (90 mg/kg) and xylazine (3 mg/kg).

Whole blood was collected by cardiac puncture in EDTA tubes, the blood glucose concentration was measured, and the blood samples were immediately centrifuged at $2000 \times g$ for 10 min at 4°C to obtain the plasma. Aliquots were stored at -80°C until the analysis of biochemical parameters and systemic inflammation.

Skeletal muscle (gastrocnemius) was quickly removed, extensively washed in physiological saline buffer, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analysis. After slow thawing, the tissues samples were homogenized in ice-cold 50 mM phosphate buffer (pH 7.4, 1: 10 w/v) and centrifuged at $10\,000 \times g$ for 10 min at 4°C . Aliquoted supernatant was used to determine the levels of oxidative stress markers and antioxidant system activity. Free radical scavengers were added in appropriate amounts to prevent artificial oxidation: 10 μL of butylated hydroxytoluene (10 mM) was added to aliquots used for isoprostane analysis, and 10 μL of MV2P (the scavenger provided in the kit) was added to aliquots used for GSH/GSSG ratio analysis. The results obtained from skeletal muscle were normalized by protein content to account for individual variations in the animal's body weights during the experiment.

5. BIOCHEMICAL ANALYSIS

5.1 Biochemical parameters (glycemic regulation and glycooxidation)

The plasma fructosamine and carboxymethyl-lysine (CML) levels were determined using a colorimetric method (Cerba, France) and a Circulex ELISA kit (CycLex, Japan), respectively.

5.2 Markers of oxidative damage in skeletal muscle

The isoprostane analysis consisted of isoprostane extraction from tissue homogenates by thermolysis and LC/MS analysis, as described previously (Youssef et al., 2009). The extraction protocol was slightly modified for use with tissue homogenates. A volume of 990 μL of plasma, 10 μL of deuterated 8-isoprostane as an internal standard (80 ng/mL), 10 μL of 20 mM deferiprone, 10 μL of 20 mM Desferal and 1 mL of 15% KOH were added, and the sample was incubated for 60 minutes at 37°C . The alkali was neutralized by the addition of 3.5 mL of 1 M KH_2PO_4 and 2 mL of 0.1 M phosphate buffer (pH 7) to adjust the pH to a value between 7.2 and 7.4. The samples were loaded into isoprostane affinity columns (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) that had been prepared according to the manufacturer's

instructions. The column was washed with twice with 2 mL of phosphate buffer 0.1 M (pH 7) and twice with 2 mL of ultrapure water. Isoprostanes were eluted with 2 mL of 95% ethanol. The eluate was evaporated to dryness under vacuum in a SpeedVac (Sc110A-UVS400A Savant). The sample was redissolved in 20 μ L of solution containing two solvents: solvent B, accounting for 60% (H₂O and 0.5% of NH₃), and solvent C, accounting for 40% (55% acetonitrile, 45% methanol and 0.5% of NH₄OH). An aliquot of 20 μ L of the sample was injected into the high-performance liquid chromatography system and analyzed as previously described[26].

The levels of reduced and oxidized glutathione were measured with a Bioxytech GSH/GSSH-412 kit (Bioxytech, Oxis International, Inc., Portland, WA, USA) with some modifications to adapt the protocol to muscle homogenates, as previously described (Kim, 2009).

5.3 Activity of antioxidant enzymes (SOD and GPX)

Ransod and Ransel kits (Randox, France) were used to evaluate the SOD and GPX activities, respectively.

5.4 Expression of Mn-SOD

Western blot analyses were used to determine relative levels of Mn-SOD in gastrocnemius muscle samples. Briefly, samples were solubilized in a buffer containing Tris-HCl (pH 6.8), SDS, bromophenol blue, glycerol and 2-b-mercaptoethanol. Proteins were separated on a SDS-polyacrylamide gel (12.5%) and then transferred overnight onto nitrocellulose membranes (Millipore, France) in a transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.01% SDS and 10% ethanol). For normalization, a selected protein sample was run on each gel. The membrane was then washed in Tris-buffered saline/Tween 20 (TTBS 0.1%) for 10 min. After blocking nonspecific binding sites for 1 h at room temperature using 5% BSA diluted in 0.1%TTBS, the membranes were incubated overnight at 4°C with anti-Mn-SOD antibodies (Enzo Life Sciences, France). The membranes were washed three times with TTBS and then incubated for 1 h with infrared-labeled secondary goat anti-mouse IRDye 800 antibodies (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) that bound to the primary antibody. The bound complex was detected using the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE). The images were analyzed using Odyssey Application Software, version 1.2 (LI-COR) to obtain the integrated intensities. Western blots were normalized using the level of a housekeeping protein (HSC70: the constitutive isoform of heat shock protein 70).

5.5 Inflammatory markers

The uric acid, IL-1 β , IL-6 and C-reactive protein levels in serum were determined using commercial enzyme-linked assay kits according to the manufacturer's instructions. The kits were purchased from Cayman Chemical (Enzo Life Sciences, France).

6. STATISTICAL ANALYSIS

The results were expressed as the means \pm SEM. Data were analyzed by performing a one-way analyses of variance (ANOVA) followed by a Student-Newman-Keuls post-hoc test to determine the significance of the differences between the three groups. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

1. Effects of FSP supplementation on glycemic regulation and glycoxidation markers

As expected, at the end of the protocol, the blood glucose, plasma fructosamine and CML levels were higher in diabetic placebo rats (group 2) than in controls (group 1) (Figure 1 A,B and C).

FSP supplementation had no effect on the blood glucose or plasma fructosamine level (Figure 1 A and B). In contrast, the level of plasma CML, a glycoxidative marker, was significantly lower after 3 weeks of supplementation (- 36%) (Figure 1 C).

2. Effects of FSP supplementation on muscle pro/antioxidant status

The muscle markers of oxidative damages, isoprostanes and GSH/GSSG ratio, were not modified by the diabetic state or by FSP supplementation.

The low activities of antioxidant enzymes (SOD and GPX) in the diabetic placebo group normalized after three weeks of FSP supplementation. The Mn-SOD content, decreased by diabetes, tended to increase in the FSP-supplemented group (NS), although the levels were not restored to the control levels.

3. Effects of FSP supplementation on systemic inflammatory markers

Figure 3 illustrates the levels of inflammatory markers (uric acid, IL-1 β , IL-6 and CRP) in the three groups. Diabetic placebo rats exhibited elevated CRP and uric acid levels compared with controls, but the IL-1 β and IL-6 levels were increased in the control rats.

FSP supplementation significantly reduced the plasma levels of uric acid, IL-1 β and IL-6 but did not change the level of CRP.

DISCUSSION

In this study, we investigated the effect of FSP supplementation on *in vivo* inflammation and oxidative stress in diabetic rats. Diabetes induced by streptozotocin injection resulted in a pro-inflammatory state and an altered redox balance, which are characteristic of type 1 diabetes mellitus. FSP exhibited strong anti-inflammatory activity and strengthened the antioxidant system.

1. Antioxidant properties of FSP in diabetic rats

Hyperglycemia, which is characteristic of streptozotocin-induced diabetes, has been associated with the development of oxidative stress (Bonfont-Rousselot, 2000). The elevated fructosamine levels indicated that hyperglycemia was sustained for the entire duration of the experiment, and these alterations in the glucose metabolism were associated with a pro-oxidant state, as evidenced by the increase in the CML level. In diabetes, N(ϵ)-(carboxymethyl)lysine is considered a general marker of oxidative stress because it is a major product of the oxidative modifications of glycated proteins (Schleicher, 1997).

The onset of oxidative stress could be due to a decrease in the activities of the antioxidant enzymes SOD and GPX. This alteration to the antioxidant system has been previously explained by a decrease in the expression/content of antioxidant enzymes (Sindhu, 2004) or by their glycation (post-transcriptional inactivation of enzymes in high-glucose medium) (Kawamura, 1992). Our study showed that the decrease in SOD activity resulted from a decrease in the level of the protein.

In the diabetic rats, in which the antioxidant system was altered, FSP up-regulated the Mn-SOD level, increasing the antioxidant enzyme activities to levels similar to those in the control rats. Our study confirmed the antioxidant properties of FSP that had been previously observed *in vitro* [24]. According to the literature data, the antioxidant effect of FSP could be attributed to soy isoflavones, especially genistein, which increases Mn-SOD expression and decreases superoxide anion production by mitochondria (Borras, 2006 & 2009).

Oxidative stress in diabetes mellitus is caused not only by sustained hyperglycemia but also by the inflammatory state. Monocytes and macrophages (activated in different ways discussed below) produced large amounts of reactive oxygen species (ROS). In turn, ROS themselves activated more macrophages and monocytes and stimulated inflammatory processes, especially via the NF- κ B/TNF-alpha pathway (Devaraj, 2010).

2. Anti-inflammatory properties of FSP in diabetic rats

The inflammatory state associated with type 1 diabetes is characterized by elevated CRP and uric acid levels. Nevertheless, the IL-1 β and IL-6 levels were unusually high in the control group, approximately

two-fold higher than the levels in the diabetic group. This abnormal increase could be due to the gavage itself. Because control rats were more active during the administration of water than the diabetic rats (because of a better general health), we hypothesize that the syringe used induced tissue damage in the esophagus, leading to inflammation. This hypothesis was confirmed by measuring the IL-1 β and IL-6 levels in a group of healthy rats that did not receive any supplementation or placebo by gavage. In these healthy rats, the IL-1 β and IL-6 levels were approximately 100 pg/mL vs 500pg/mL and 1100 pg/mL, for IL-1 β and IL-6 respectively, in the control group (data not shown). The administration of a dietary supplement by oral gavage with a syringe is commonly used to ensure the accuracy of this technique. We choose to use this method because the FSP dose must be carefully adjusted based on the body weight of each rat.

Relative to the basal values of healthy control rats (approximately 100 pg/mL), the IL-1 β and IL-6 were markedly increased in the diabetic group. This cytokine release was most likely induced by an autoimmune process, which resulted from the disturbed microbiota, leaky gut and altered mucosal immunity associated with type 1 diabetes (Vaarala, 2008). These processes trigger monocyte activation and IL-1 β production. IL-1 β then stimulates IL-6 and CRP production, leading to the elevated interleukins and CRP levels observed in this study. As mentioned above, uric acid levels are increased in diabetic individuals. Previously considered as a marker of complications, uric acid is now known to be directly implicated in the development of these complications (Hovind, 2011). Indeed, it participates in monocyte activation and IL-1 β secretion (Liu-Bryan, 2005), and it induces the increased expression of the IL-1 β precursor (Ghaemi-Oskouie, 2011). These two mechanisms could also have contributed to the high levels of IL-1 β (and thus the high levels of IL-6 and CRP) in the diabetic placebo group (with basal values considered to be approximately 100pg/mL).

FSP exhibited strong anti-inflammatory properties. It decreased the uric acid, IL-1 β and IL-6 concentrations but did not affect the CRP level. This surprising result has been reported previously (Chen, 2006), but no author has been able to provide a satisfactory explanation. Both active compounds of FSP (alpha-GOSs and isoflavones) were implicated in the anti-inflammatory activity of FSP. Alpha-GOSs exhibit bifidogenic effects on the intestinal microbiota of diabetic rats by stimulating non-pathogen commensal microflora, which participate in reinforcing the tight junctions of the intestinal barrier (Tuohy, 2005). The "leaky gut" phenomenon is thus decreased, together with the abnormal inflammatory immune response. Moreover, isoflavones were recently found to decrease uric acid levels and thus limit inflammatory processes in streptozotocin-induced diabetic rats. Uric acid, when present at elevated levels as observed in the context of diabetes, activates the NLRP3 inflammasome system, which is responsible for the expression of the IL-1 β precursor. Soy isoflavones, by decreasing the uric acid level, inhibit the activation of the NLRP3 inflammasome and the subsequent cascade of inflammatory reactions (Wang, 2012). Finally, the anti-inflammatory effects of FSP could also result from its antioxidant effects: because antioxidant systems were reinforced by FSP, FSP allowed these systems to better prevent ROS-induced inflammatory processes.

Interventions aiming to enhance redox status (by reducing oxidative stress and/or strengthening the antioxidant defense system) or inflammation will be beneficial in the therapeutic management of diabetes. Because these parameters are linked (reduce oxidative stress will decrease inflammation and vice versa), reducing both oxidative stress and inflammation with one product would be an ideal approach. Therefore, the manufacturer of FSP included both isoflavones and alpha-GOSs, which exhibit antioxidant and anti-inflammatory effects, respectively, in their dietary supplement to improve the effects of this supplement.

3. Methodological considerations regarding the effectiveness of isoflavones and alpha-GOSs in FSP

Although the antioxidant effects of soy isoflavones have been well documented *in vitro* and in animal studies, numerous studies failed to confirm these effects in humans (Von Hertzen, 2004). This lack of conclusive results could be explained by the following: 1) studies usually administered one compound isolated from soybeans, but it is well known that the consumption of whole grains results in synergistic effects of different compounds [23], and 2) when whole grains are transformed by an industrial process, the concept of equivalence is not taken into account. This concept states that the "intake of active ingredients must be adapted so that blood concentration of these active compounds was similar to those observed if active ingredients were provided by natural diet." For example, the dose of FSP (which provides isoflavones and alpha-GOSs as active compounds) must be adapted so that the blood concentrations of soy isoflavones and alpha-GOSs are equivalent to the blood concentrations resulting from the consumption of soybeans. The FSP manufacturing process and administration protocol were designed to observe this concept. FSP is prepared from whole grains and preserved the natural association of the two main types of active compounds in soy: isoflavones and alpha-GOSs. The manufacturing process includes a fermentation step, which allows the transformation of glycoside isoflavones into their aglycone counterparts (loss of a sugar group from the molecule). This technique increases the bioavailability of soy isoflavones because the aglycone forms can be digested in the stomach (Piskula, 2000) and are the only structures able to cross the intestinal barrier. Furthermore, alpha-GOSs positively affect the intestinal microbiota to promote the conversion of glycosides into aglycones, allowing the absorption of larger amounts of isoflavones from the diet (Turner, 2003). The dose of FSP was also adjusted to achieve an optimal effect. At high doses, soy isoflavones, as phytoestrogen compounds, exhibit estrogenic effects that can be harmful (Doerge, 2002). The physiological dose of soy isoflavones has been determined to be approximately 5 μM (blood concentration resulting from all food intake) (Klein & King, 2007), which corresponds to a daily dose of 1 mg/kg in the diet, according to the recommendations of the French Agency of Food Safety (Rapport AFSSA, 2006). Previous observations made by our team indicated that the equivalent oral dose provided by FSP (1 mg/kg of soy isoflavones associated with alpha-GOSs) corresponds to a plasma concentration of 4 μM after one week of gavage (unpublished observation). At this physiological dose, a plateau in the blood concentration appeared after two weeks of supplementation (Djuric, 2001). To account for individual variations in the kinetics of the blood isoflavones concentration, we extended the length of the supplementation protocol to three weeks.

CONCLUSION

The *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory properties of Fermented Soy Permeate were confirmed in an *in vivo* diabetic rat model. FSP exhibited antioxidant properties, strengthening the antioxidant enzymatic defenses and reducing the CML concentration. FSP also exhibited anti-inflammatory properties. The well-known health benefits of soy consumption were thus retained in a dietary supplement that may improve the therapeutic management of diabetic individuals.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the grant APAS-212-A and by the Valorial research cluster.

REFERENCES

1. Barnes, S., Evolution of the health benefits of soy isoflavones. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1998. **217**(3): p. 386-92.
2. Anderson, J.W., B.M. Smith, and C.S. Washnock, Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. *Am J Clin Nutr*, 1999. **70**(3 Suppl): p. 464S-474S.
3. Ibrahim, W.H., et al., Isoflavone-rich soy isolate reduces lipid peroxidation in mouse liver. *Int J Vitam Nutr Res*, 2008. **78**(4-5): p. 217-22.
4. Takekawa, S., T. Matsui, and Y. Arakawa, The protective effect of the soybean polyphenol genistein against stress-induced gastric mucosal lesions in rats, and its hormonal mechanisms. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2006. **52**(4): p. 274-80.
5. Liu, J., S.K. Chang, and D. Wiesenborn, Antioxidant properties of soybean isoflavone extract and tofu in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem*, 2005. **53**(6): p. 2333-40.
6. Cai, Q. and H. Wei, Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice. *Nutr Cancer*, 1996. **25**(1): p. 1-7.
7. Borrás, C., et al., Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NFkappaB. *FASEB J*, 2006. **20**(12): p. 2136-8.
8. Fang, Y.C., et al., Effect of genistein supplementation on tissue genistein and lipid peroxidation of serum, liver and low-density lipoprotein in hamsters. *J Nutr Biochem*, 2004. **15**(3): p. 142-8.
9. Wei, H., et al., Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1995. **208**(1): p. 124-30.
10. Borrás, C., et al., Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1802**(1): p. 205-11.
11. Djuric, Z., et al., Effect of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women. *Cancer Lett*, 2001. **172**(1): p. 1-6.
12. Palanisamy, N., S. Kannappan, and C.V. Anuradha, Genistein modulates NF-kappaB-associated renal inflammation, fibrosis and podocyte abnormalities in fructose-fed rats. *Eur J Pharmacol*, 2011. **667**(1-3): p. 355-64.
13. Kang, J.L., et al., Genistein prevents nuclear factor-kappa B activation and acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. **164**(12): p. 2206-12.
14. Zhao, J.H., et al., Oral administration of soy-derived genistin suppresses lipopolysaccharide-induced acute liver inflammation but does not induce thymic atrophy in the rat. *Life Sci*, 2006. **78**(8): p. 812-9.
15. Ji, G., et al., Anti-inflammatory effect of genistein on non-alcoholic steatohepatitis rats induced by high fat diet and its potential mechanisms. *Int Immunopharmacol*, 2011. **11**(6): p. 762-8.

16. Vaarala, O., Is the origin of type 1 diabetes in the gut? *Immunol Cell Biol*, 2012. **90**(3): p. 271-6.
17. Valsecchi, A.E., et al., The soy isoflavone genistein reverses oxidative and inflammatory state, neuropathic pain, neurotrophic and vasculature deficits in diabetes mouse model. *Eur J Pharmacol*, 2011. **650**(2-3): p. 694-702.
18. Tuohy, K.M., et al., Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics--assessment of efficacy. *Curr Pharm Des*, 2005. **11**(1): p. 75-90.
19. Tamura, M., K. Hirayama, and K. Itoh, Effects of soy oligosaccharides on plasma and cecal isoflavones, and cecal enzyme activities in mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2003. **49**(3): p. 168-71.
20. Reinwald, S., S.R. Akabas, and C.M. Weaver, Whole versus the piecemeal approach to evaluating soy. *J Nutr*, 2010. **140**(12): p. 2335S-2343S.
21. Efstathiou, T., Driss, Fathi, Method for production of active extracts from soya beans and corresponding uses of the produced extracts. 2010, Sojasun Technologies.
22. Szkudelski, T., The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*, 2001. **50**(6): p. 537-46.
23. Youssef, H., et al., Exercise-induced oxidative stress in overweight adolescent girls: roles of basal insulin resistance and inflammation and oxygen overconsumption. *Int J Obes (Lond)*, 2009. **33**(4): p. 447-55.

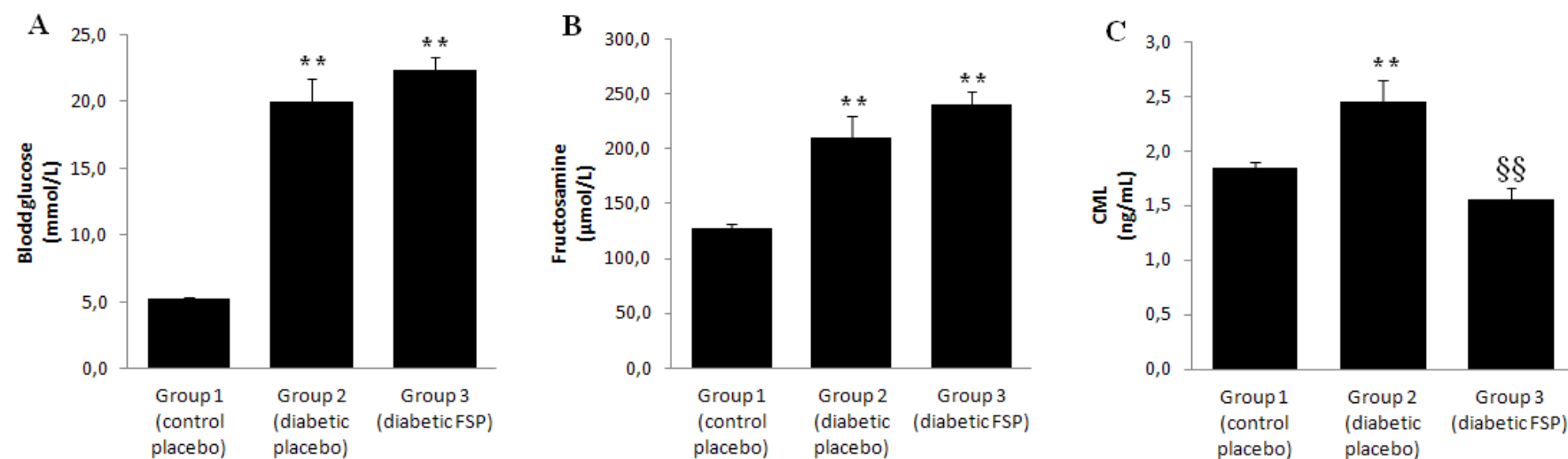


Figure 1: Effects of diabetes and of a three weeks FSP-Supplementation on biochemical parameters (glycemic regulation and glycoxydation). Alteration of glycemic regulation in both diabetic groups was attested by increased blood glucose concentration and plasma fructosamine level, and was not corrected by three weeks of FSP-Supplementation. Elevated CML, considered as a systemic marker of oxidant stress in case of hyperglycemia, demonstrated in diabetic group an oxidant stress, which was normalized by FSP-supplementation. Values are means \pm SEM. Data were analyzed by a one-way ANOVA, followed by a Newman-Keuls post-hoc test. ** $p < 0,01$ when compared to the group 1 (i.e. effects of diabetes). §§ $p < 0,01$ when compared to the group 2 (i.e. effects of FSP-supplementation in diabetic rats)

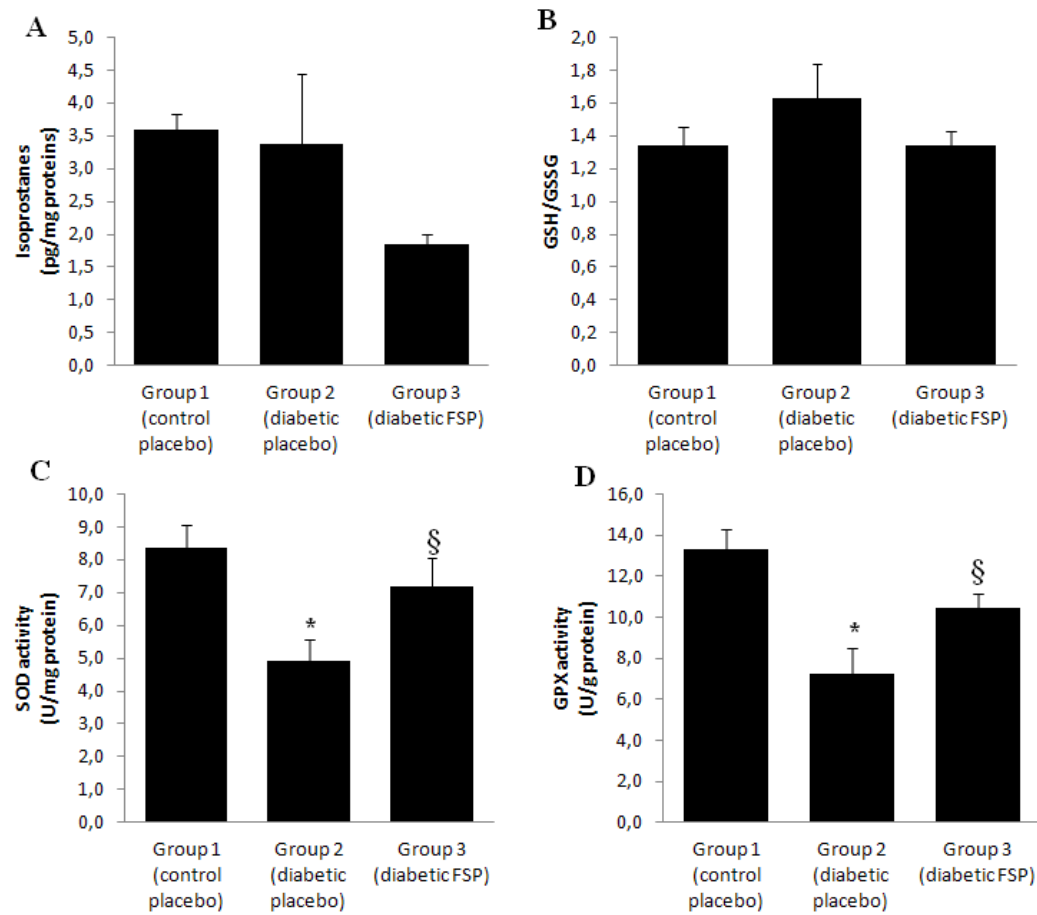


Figure 2: Effects of diabetes and of a three weeks FSP-Supplementation on markers of oxidative damages (A, B) and antioxidant enzymatic activity (C, D) in diabetic rats.. Activities of antioxidant enzymes SOD and GPX, altered in diabetes, was normalized by three weeks of FSP-supplementation. Values are means \pm SEM. Data were analyzed by a one-way ANOVA, followed by a Newman-Keuls post-hoc test. * $p < 0,05$ when compared to the group 1 (i.e. effects of diabetes). § $p < 0,05$ when compared to the group 2 (i.e. effects of FSP-supplementation in diabetic rats)

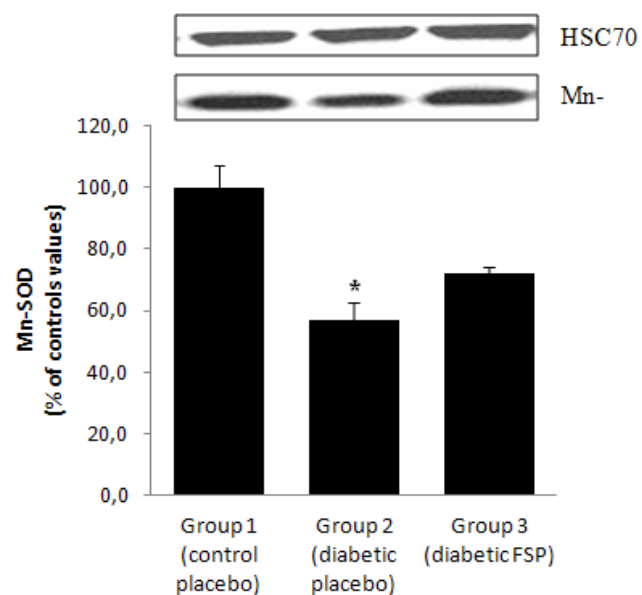


Figure 4 : Western Blot analysis of Mn-SOD protein in skeletal muscle (gastrocnemius). Equal amounts of protein (50 μ g) were subjected to Western Blot analysis using a polyclonal anti-Mn-SOD-antibody. The bars represent the optical density of the bands of Mn-SOD at 25kDa (n=6 rats per group), normalized by expression of the HSC-70 protein. Three weeks of supplementation with FSP tended to correct the decreased level of Mn-SOD content observed in skeletal muscle of diabetic rats.

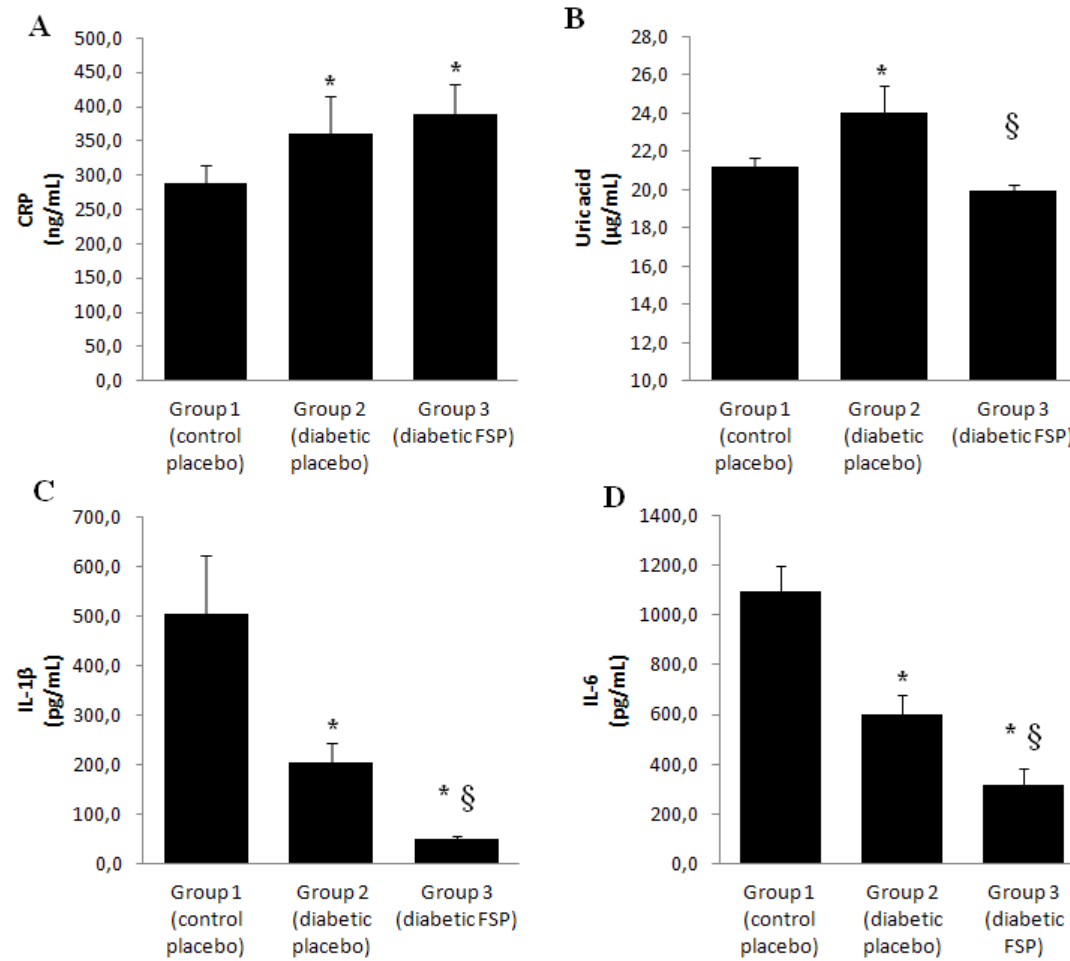


Figure 3: Effects of diabetes and of a three weeks FSP-Supplementation on systemic inflammatory markers in diabetic rats. Elevated CRP and uric acid attested a pro-inflammatory state in diabetes. Three weeks of FSP-supplementation induced a decrease of all inflammatory markers, except CRP. Values are means \pm SEM. Data were analyzed by a one-way ANOVA, followed by a Newman-Keuls post-hoc test. * $p < 0,05$ when compared to the group 1 (i.e. effects of diabetes). § $p < 0,05$ when compared to the group 2 (i.e. effects of FSP-supplementation in diabetic rats)

Etude 2 : Un Produit Fermenté de Soja (PFS) améliore la concentration de glucose dans le muscle squelettique, sans restaurer le contenu en glycogène, chez des rats rendus diabétiques par streptozotocine

INTRODUCTION

Autrefois déconseillé aux personnes diabétiques de type 1 (DT1), l'activité physique fait aujourd'hui partie intégrante de leur prise en charge, notamment en raison de son effet mimétique de l'insuline (Hayashi et al., 1997). Une activité physique régulière contribue ainsi à améliorer la régulation de la glycémie (Valerio et al., 2007), et permet même à long terme, une baisse de la mortalité (Moy et al., 1993). Toutefois, la tolérance à l'exercice est largement diminuée chez les sujets diabétiques, en raison, notamment, des altérations de leur métabolisme glucidique (Ramirez, 1993). Les stocks de glycogène musculaire représentent ainsi un facteur limitant à la pratique physique, et l'effet du diabète sur ceux-ci n'est pas clairement établi. S'il semble qu'ils soient diminués de manière générale, participant ainsi à la diminution de la capacité physique observés chez les DT1, des résultats contradictoires sont parfois rapportés selon le modèle étudié (Chen, 1982).

L'intérêt des isoflavones de soja dans le diabète de type 1 a été bien démontré (Anderson, 1999): la consommation de génistéine et de daidzéine, les deux principaux isoflavones, est associée chez le DT1 à une diminution de la glycémie et à une élévation de l'insulinémie (Choi, 2008). Cette dernière résulte d'une restauration de la structure des îlots de Langerhans (Lu, 2008), ainsi que de l'effet insulinothèque de la génistéine (Liu, 2006). Mais à notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à l'effet des isoflavones sur la synthèse de glycogène dans le muscle de DT1. Une société Bretonne, Sojasun Technologies, a développé un complément alimentaire extrait de la graine de soja, le Produit Fermenté de Soja (PFS). La particularité de ce produit est d'associer deux ingrédients actifs du soja : les isoflavones et les alpha-galactooligosaccharides (alpha-GOS), ces derniers potentialisant l'absorption intestinale des premiers (Tamura, 1993). L'intérêt est de préserver l'association naturelle des composés du soja, et au-delà, leurs effets synergiques. De plus, dans notre première étude, nous avons mis en évidence un effet antioxydant du PFS chez des rats diabétiques. Le stress oxydant étant impliqué dans le captage musculaire de glucose, nous faisons l'hypothèse que l'amélioration de la balance pro/antioxydante pourrait s'accompagner d'une amélioration du métabolisme glucidique dans le muscle.

L'objectif de cette étude est double : 1) dans un premier temps, il s'agit de vérifier si les stocks de glycogène musculaire sont diminués dans le modèle de DT1 servant de support à l'ensemble de ces travaux de thèse, 2) puis, de déterminer si une supplémentation en PFS peut influencer favorablement différentes étapes de la synthèse de glycogène.

MATERIEL ET METHODES

Pour déterminer l'effet respectif du diabète et du PFS sur la constitution des stocks de glycogène, nous avons utilisé un modèle de diabète de type 1 par injection de streptozotocine (45 mg/kg) et une supplémentation quotidienne en PFS par gavage. Le PFS se présente sous la forme d'une poudre hydrosoluble contenant 29% d'alpha-GOS et 0,5% d'isoflavones. Il est dilué à 10% dans un volume d'eau ajusté quotidiennement au poids de l'animal, pour assurer un apport de 1 mg d'isoflavones par jour et par kilogramme, la dose physiologique correspondant aux recommandations de l'AFSSA. Les animaux ont libre accès à l'eau et à une nourriture exempte de soja (2020X Teklad Global Soy Protein-Free, Harlan).

40 rats Wistar mâles ont ainsi été répartis en quatre groupes de 10 animaux chacun: sains placebo, sains supplémentés en PFS, diabétiques placebo, diabétiques supplémentés en PFS. A l'issue de trois semaines de supplémentation, les animaux ont été sacrifiés après 24 heures de jeûne : la glycémie a été mesurée et le muscle gastrocnémien prélevé pour la détermination ultérieure du contenu en glucose, en glycogène et en glycogène synthase totale. Les prélèvements ont été stockés à - 80°C dans l'attente des analyses, dont les détails sont présentés en annexes dans les fiches techniques.

RESULTATS

Comme attendu, les animaux diabétiques présentent une glycémie supérieure aux rats sains à la fin du protocole. Malgré cette hyperglycémie, la concentration en glucose dans le muscle est plus faible chez les diabétiques, suggérant une altération du captage de glucose dans le muscle. Cette concentration en glucose musculaire plus faible conduit à un contenu en glycogène musculaire également diminué par rapport aux rats sains. L'absence de corrélation entre ces deux paramètres (glucose et glycogène dans le muscle) laisse à penser que les étapes intermédiaires de la synthèse de glycogène sont altérées dans le diabète. Le contenu total en glycogène synthase n'est toutefois pas affecté par le diabète.

Une supplémentation de trois semaines en PFS ne permet pas d'améliorer la glycémie. Un tel effet a pourtant été rapporté dans la littérature, mais seulement pour des doses supra-physiologiques. La concentration en glucose dans le muscle est tout de même restaurée par le PFS chez les diabétiques, vraisemblablement par une amélioration du captage du glucose, résultant de l'effet insulino-trope des isoflavones. Cette augmentation du glucose dans le muscle n'est pas associée, chez les rats diabétiques, à une augmentation des stocks de glycogène, qui restent déplétés. Chez les animaux sains, à l'inverse, le glucose musculaire est inchangé mais le contenu en glycogène est augmenté.

CONCLUSION

Ces résultats démontrent 1) que les stocks de glycogène sont diminués (-25%) dans notre modèle de diabète de type 1; 2) qu'une supplémentation en PFS, chez les rats diabétiques, normalise le contenu en glucose musculaire sans restaurer les stocks de glycogène. Le PFS présente, de plus, un effet intéressant chez les animaux sains, chez lesquels il augmente les stocks de glycogène (+20%).

L'altération des stocks de glycogène dans le diabète est un paramètre important à prendre en compte lorsqu'une prise en charge par l'entraînement est proposée dans cette population (étude 3).

A Fermented Soy Permeate improves the skeletal muscle glucose level without restoring the glycogen content in streptozotocin-induced diabetic rats

L. MALARDE^a; C. GROUSSARD^a; L. LEFEUVRE-ORFILA^a; S. VINCENT^a; T. EFSTATHIOU^b; A. GRATAS-DELMARCHE^a

^a: Laboratory M2S, Université Rennes 2-ENS Cachan, Avenue Charles Tillon, CS24414 35044 Rennes

^b: Sojasun Technologies, Rue Alain Fournier, 35530 Noyal sur Vilaine

Diabetes, muscular glycogen, soy isoflavones

Corresponding author

Ludivine Malardé

Laboratoire M2S – UFR APS

Université Rennes 2-ENS Cachan

2, avenue Charles Tillon

CS24414

35044 RENNES Cedex

Email : ludivine.malarde@gmail.com

Phone number : (+33)2.99.14.17.75

Fax number :(+33)2.99.14.17.74

Abstract

BACKGROUND: Exercise is essential into the therapeutic management of diabetic patients, but their level of exercise tolerance is lowered due to alterations of glucose metabolism. As soy isoflavones have been shown to improve glucose metabolism, this study aimed to assess the effects of a dietary supplement containing soy isoflavones and alpha-galactooligosaccharides (alpha-GOS) on muscular glucose, glycogen synthase (GSase) and glycogen content in a type 1 diabetic animal model. The dietary supplement tested was a patent compound, the Fermented Soy Permeate (FSP), developed by the French Company Sojasun Technologies.

FINDINGS: Forty male Wistar rats were randomly assigned to control or diabetic groups (streptozotocin, 45mg/kg). Each group was then divided into placebo or FSP-supplemented groups. Both groups received by oral gavage, respectively water or diluted FSP (0.1g/day), daily for a period of three weeks. At the end of the protocol, glycemia was noticed after a 24h-fasting period. Glucose, total glycogen synthase (GSase) and glycogen content were determined in skeletal muscle (gastrocnemius).

Diabetic animals showed higher blood glucose concentration, but lower glucose and glycogen muscle content than controls. Three weeks of FSP consumption allowed to restore muscle glucose concentration, but failed to reduce glycemia and to normalize glycogen content in diabetic rats. Furthermore, glycogen content was increased in FSP-supplemented controls compared to placebo controls.

CONCLUSION: Our results demonstrated that diabetic rats exhibited depleted muscle glycogen content (-25%). FSP-supplementation normalized muscle glucose level without restoring glycogen content in diabetic rats. However, it succeeded to increase it in control group (+20%).

Key words: alpha-galactooligosaccharides; glucose metabolism; soy isoflavones; type 1 diabetes.

Introduction

Physical activity is now well integrated into the therapeutic management of diabetic patients to improve glycemic control and quality of life (ADA, 2011). Nevertheless, the level of exercise tolerance in patients with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is lower than the level of exercise tolerance of healthy people (Ramires et al., 1993). One explanation could be the decreased glycogen content in the skeletal muscle of IDDM patients (Chen and Ianuzzo, 1982; Cline et al., 1997), but literature data remain controversial.

Soy isoflavones have beneficial effects in IDDM management (Anderson et al., 1999): the consumption of genistein or daidzein reduces the blood glucose level and improves insulinemia in type 1 diabetic rats (Lee, 2006; Choi et al., 2008; Lu et al., 2008). To our knowledge, no study has investigated the effects of soy isoflavones on glycogen synthesis in the muscle of a type 1 diabetic animal model. A French company, Sojasun Technologies, has developed a powder extracted from the soybean called Fermented Soy Permeate (FSP). The specificity of this product is due to the presence of two types of active molecules from the soybean: isoflavones and alpha-galactooligosaccharides (alpha-GOS), which potentiate the absorption of isoflavones (Tamura et al., 2003). The advantage is to keep the natural association of soy active compounds, which provide synergistic effects.

We aimed to assess that:

- the intra-muscular glycogen content is indeed lower in a type 1 diabetic rat model,
- FSP could prevent this glycogen storage deficiency by improving several steps of glycogen synthesis in diabetics.

Protocol

The experimental protocol, approved by the Ethics Committee of Rennes University, was in accordance with the Guide for the Care and Use of the Laboratory Animals. Forty 9-week-old male Wistar rats (Janvier, France) were randomly assigned to the control or diabetic groups. Then, each group was divided into placebo or FSP-supplemented groups. Tap water and food (2020X Teklad Global Soy Protein-Free, Harlan, Netherlands) were available *ad libitum*. Food intake was daily recorded.

Diabetes was induced by intraperitoneal streptozotocin injection (45mg/kg of body weight, citrate buffer). Controls received citrate buffer alone. The blood glucose concentration was measured 48h later (MediSense Optium® glucometer, Abbott, France); animals with blood glucose levels greater than 250mg.dL⁻¹ were considered diabetic (Szkudelski, 2001).

The dietary supplement tested is a patented compound (Efstathiou, 2010), Fermented Soy Permeate (FSP), developed by Sojasun Technologies. The product was a soluble powder containing 29% alpha-GOS and 0.5% soy isoflavones (daidzein and genistein).

One week after the confirmation of diabetes, animals started to receive by oral gavage FSP-supplementation or water (daily for a period of three weeks). Volume of FSP or water was daily adjusted

according to body weight, to ensure that each rat received a FSP-dose equivalent to 1mg of soy isoflavones and 70mg of alpha-GOS/day/kg of body weight.

Then, all rats were sacrificed after a 24h-fasting period, and the blood glucose and fructosamine level was measured (Cerba, France). The other parameters were determined in gastrocnemius. The glucose concentration was determined using a Glucose GOD-PAP Assay kit (Biolabo, France). The glycogen content was measured with the same assay kit after total hydrolysis of the glycogen into glucose using alpha-amylglucosidase. The total Glycogen Synthase (GSase) content was determined using a Glycogen Synthase (Total) Elisa kit (Invitrogen, France). All results were normalized by muscle weight to account for individual variations in the animal's body weights during the experiment.

The results were expressed as the means \pm SEM. The effect of diabetes was assessed using a Mann-Whitney test between the two placebo groups. The effects of FSP supplementation on both groups were determined using ANOVA (Student Newman-Keuls post-hoc test). The Spearman test was used to detect correlations.

Results (table 1)

As expected, the final blood glucose and fructosamine level was higher in diabetic rats than in controls. In muscle, diabetic rats exhibited lower glucose concentrations and glycogen contents, although the GSase content was not affected by diabetes.

FSP supplementation had no effect on the blood glucose and fructosamine level but restored the glucose concentration in the muscle of diabetic animals. Moreover, FSP consumption increased the muscle glycogen content in supplemented control rats compared with the placebo control rats. No change in the GSase content was observed after three weeks of FSP supplementation in either the diabetic or placebo groups.

No correlation was found among all parameters for the four groups.

Discussion

The major results of this study were that 1-diabetes lead to lower muscle glycogen content, 2-FSP supplementation restored the muscle glucose content in diabetic rats but not the depleted glycogen store. However, FSP supplementation increased the glycogen store in controls (+20%).

The diabetic state was confirmed by the high blood glucose and fructosamine level at the end of the protocol. Despite the high blood glucose concentration, diabetic rats exhibited lower muscle glucose levels than controls, indicating that glucose transport into muscle cells was disrupted in the diabetic rats (Cline et al., 1997). Given that insulin is the major factor regulating muscle glucose uptake, this disruption may result from insulin deficiency in diabetic rats, as previously reported in the same animal model (Zhang et al., 2008).

As hypothesized, in placebo diabetic rats, the lower muscle glucose concentration led to lower muscle glycogen content. Literature data concerning the muscle glycogen content are often inconsistent, with a decrease (Grover et al., 2002), no change (Chen and Ianuzzo, 1982) and even an increase (Ferreira et al., 2001) reported in diabetics relative to healthy subjects. These conflicting results could be explained by 1- the different methods to determine glycogen content (possibly leading to incomplete glycogen degradation before quantification) and 2- the different nutritional states of the rats (fed or fasted). Indeed, glycogen storage depends on food consumption (Carey et al., 2003), which was two-fold higher in diabetics than in controls. In this experiment, the analysis of fasted rats ensured that all animals were in similar condition and that the lower glycogen content resulted from the diabetic state and not from the rats being in different post-prandial states.

Glycogen is synthesized from glucose through a succession of enzymatic reactions. Because no correlation was found between the muscle glucose level and the muscle glycogen content, the intermediate steps could be disrupted. For example, glucose phosphorylation could be defective, and GSase regulation could be disrupted (Cline et al., 1997). As it has been demonstrated that GSase phosphorylation ratio was not affected by diabetic state (Ferreira et al., 2001), we evaluated the total GSase content, which was not affected by the diabetic state nor upregulated to counteract lower glycogen content.

In our study, FSP consumption was unable to improve glycemic control (blood glucose and fructosamine levels) in diabetic rats. To our knowledge, the literature data showing positive effects of isoflavones on the blood glucose level (Lee, 2006; Choi et al., 2008; Lu et al., 2008) used supra-physiological doses (equivalent to 25 to 75mg/kg body weight vs 2mg/kg) and treated the animals over a longer period (up to 8 weeks vs 3 weeks). Our study aimed to determine the effects of FSP at physiological doses; thus, the administration of a lower soy isoflavones dose could explain the lack of improvement in the blood glucose level.

Nevertheless, physiological FSP supplementation was able to restore the muscle glucose content in diabetic rats. This beneficial effect could be explained by the elevation of the insulin level induced by soy isoflavones, an effect that is well described in type 1 diabetic animal models (Choi et al., 2008) and in streptozotocin-induced diabetic rats in particular (Lee, 2006; Lu et al., 2008). Indeed, Lu et al. (Lu et al., 2008) observed a significant restoration of the structure of Langerhans' islets and of insulin production in diabetic rats. In addition, Liu et al. reported an insulinotropic effect of genistein at physiological doses on pancreatic β -cells (Liu et al., 2006).

Despite the restoration of the muscle glucose concentration in the diabetic supplemented group, the muscle glycogen content remained low. In contrast, the consumption of FSP in the control group induced an increase in the glycogen content. These opposite results could be explained by the regulation of glycogen synthesis in muscle. This synthesis depends on the glycogen content: in case of glycogen depletion in muscle, glycogen synthesis is activated by hyperglycemia, whereas at basal levels, glycogen synthesis is activated by insulin (Halse et al., 2001). In diabetic subjects, because the glycogen stores are chronically depleted, blood glucose becomes the primary stimulus that activates glycogen synthesis,

which allows the preservation of partial glycogen synthesis despite lower insulinemia (Farrace and Rossetti, 1992), but FSP had no effect on this phenomenon. In the control group, the increased glycogen content resulted from the stimulatory effect of FSP on insulin secretion, as previously explained.

In summary, FSP supplementation may increase glucose transport from the blood into the muscle in controls and diabetics groups. In controls, FSP supplementation stimulated the conversion of intramuscular glucose into glycogen, leading to increased glycogen storage. In diabetics, FSP supplementation had no effect on the different steps of glycogen synthesis, leading to an accumulation of glucose in the muscle.

To conclude, type 1 diabetes induced a decrease in the glucose and glycogen levels in muscle. Three weeks of consumption of FSP, a dietary supplement containing soy isoflavones, 1) partially corrected diabetes-induced changes, allowing the restoration of the muscle glucose content in the diabetic group, and 2) increased the glycogen content in the muscles of the control group. This short communication highlights the interest in FSP development and is the first step in future research investigating underlying mechanism and FSP's action in various areas.

Acknowledgments

This research was supported by the grant APAS-212-A and by the Valorial research cluster.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Standards of medical care in diabetes--2011. *Diabetes Care* 2011, 34 Suppl 1:S11-61.
2. Ramires PR, Forjaz CL, Silva ME, Diament J, Nicolau W, Liberman B, Negrao CE: Exercise tolerance is lower in type I diabetics compared with normal young men. *Metabolism* 1993, 42(2):191-195.
3. Cline GW, Magnusson I, Rothman DL, Petersen KF, Laurent D, Shulman GI: Mechanism of impaired insulin-stimulated muscle glucose metabolism in subjects with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1997, 99(9):2219-2224.
4. Chen V, Ianuzzo CD: Dosage effect of streptozotocin on rat tissue enzyme activities and glycogen concentration. *Can J Physiol Pharmacol* 1982, 60(10):1251-1256.
5. Anderson JW, Smith BM, Washnock CS: Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. *Am J Clin Nutr* 1999, 70(3 Suppl):464S-474S.
6. Choi MS, Jung UJ, Yeo J, Kim MJ, Lee MK: Genistein and daidzein prevent diabetes onset by elevating insulin level and altering hepatic gluconeogenic and lipogenic enzyme activities in non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metab Res Rev* 2008, 24(1):74-81.
7. Lu MP, Wang R, Song X, Chibbar R, Wang X, Wu L, Meng QH: Dietary soy isoflavones increase insulin secretion and prevent the development of diabetic cataracts in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr Res* 2008, 28(7):464-471.
8. Lee JS: Effects of soy protein and genistein on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 2006, 79(16):1578-1584.
9. Tamura M, Hirayama K, Itoh K: Effects of soy oligosaccharides on plasma and cecal isoflavones, and cecal enzyme activities in mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2003, 49(3):168-171.
10. Szkudelski T: The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001, 50(6):537-546.
11. Efstathiou T, Driss, Fathi: Method for production of active extracts from soya beans and corresponding uses of the produced extracts. In: Sojasun Technologies; European Patent 1983844. 2010.
12. Zhang M, Lv XY, Li J, Xu ZG, Chen L: The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. *Exp Diabetes Res* 2008, 2008:704045.

13. Grover JK, Vats V, Yadav S: Effect of feeding aqueous extract of *Pterocarpus marsupium* on glycogen content of tissues and the key enzymes of carbohydrate metabolism. *Mol Cell Biochem* 2002, 241(1-2):53-59.
14. Ferreira LD, Brau L, Nikolovski S, Raja G, Palmer TN, Fournier PA: Effect of streptozotocin-induced diabetes on glycogen resynthesis in fasted rats post-high-intensity exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001, 280(1):E83-91.
15. Carey PE, Halliday J, Snaar JE, Morris PG, Taylor R: Direct assessment of muscle glycogen storage after mixed meals in normal and type 2 diabetic subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003, 284(4):E688-694.
16. Liu D, Zhen W, Yang Z, Carter JD, Si H, Reynolds KA: Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic β -cells through a cAMP-dependent protein kinase pathway. *Diabetes* 2006, 55(4):1043-1050.
17. Halse R, Bonavaud SM, Armstrong JL, McCormack JG, Yeaman SJ: Control of glycogen synthesis by glucose, glycogen, and insulin in cultured human muscle cells. *Diabetes* 2001, 50(4):720-726.
18. Farrace S, Rossetti L: Hyperglycemia markedly enhances skeletal muscle glycogen synthase activity in diabetic, but not in normal conscious rats. *Diabetes* 1992, 41(11):1453-1463.

Table 1 : Effects of diabetes and FSP supplementation on glycemic control, glucose metabolism in skeletal muscle, and food intake

	CONTROLS		DIABETICS	
	Placebo (n=10)	FSP (n=10)	Placebo (n=10)	FSP (n=10)
Blood glucose level (<i>mmol.L⁻¹</i>)	5.26 ± 0.12	4.90 ± 0.46	19.99 ± 1.76 ^{aa}	22.37 ± 0.89
Serum fructosamine level (<i>μmol.L⁻¹</i>)	127.38 ± 4.05	138.29 ± 4.89	209.60±20.18 ^{aa}	239.71 ± 12.31
Muscle glucose concentration (<i>μmol/100mg tissue</i>)	0.75 ± 0.09	0.73 ± 0.08	0.59 ± 0.14 ^a	0.78 ± 0.12 ^b
Total muscle glycogen synthase content (<i>mg/100mg tissue</i>)	11.55 ± 4.25	9.31 ± 0.07	7.26 ± 3.15	8.04 ± 5.10
Muscle glycogen content (<i>μmol glucosyl equivalents/100 mg tissue</i>)	2.51 ± 0.23	2.99 ± 0.58 ^b	1.89 ± 0.27 ^{aa}	2.05 ± 0.56
Food intake (<i>gr/day</i>)	28.84 ± 1.26	29.50 ± 2.01	59.25 ± 6.93 ^{aa}	58.60 ± 4.17

Values are means ± SEM, after three weeks of daily gavage with Fermented Soy Permeate (FSP) or placebo (water), in control or streptozotocin-induced diabetic rats.

a: effect of diabetes: significant difference between placebo diabetic animals versus placebo controls (**a:** p<0,05; **aa:** p<0.01)

b: effect of supplementation: significant difference between FSP-supplemented versus placebo (**b:** p<0,05), in diabetic or control groups

Etude 3 : L'entraînement en endurance et l'insulinothérapie doivent être associés pour exercer pleinement leurs effets bénéfiques sur le stress oxydant et la régulation glycémique chez des rats diabétiques

INTRODUCTION

Le Stress Oxydant (SO) est bien connu pour être impliqué dans la survenue et le développement des complications du diabète (Oberley, 1988). Il est causé, au moins en partie, par une élévation importante de la glycémie. Chez les sujets diabétiques, la thérapie par l'insuline est essentielle pour réduire l'hyperglycémie. Toutefois, ce traitement insulinique échoue parfois à normaliser le statut glycémique, et le SO, ainsi que les troubles qu'il induit, persistent. C'est pourquoi "l'American Diabetes Association" conseille l'exercice physique régulier pour améliorer la prise en charge de la glycémie. Il a par ailleurs été démontré que l'exercice chronique permet, chez le sujet sain, une diminution du SO. Néanmoins, les effets de l'entraînement sur le SO n'ont été que très peu étudiés dans la population diabétique.

Dans ce contexte, le but de cette étude est de comparer les effets de différentes prises en charge (insuline et entraînement, seule ou en association) sur le SO chez des sujets diabétiques. Nous faisons l'hypothèse d'un effet additif de l'entraînement et du traitement par l'insuline sur la régulation de la glycémie et l'amélioration de la balance pro/antioxydante.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Dans un premier temps, le diabète a été induit par une injection de streptozotocine (45mg/kg) chez 40 rats mâles Wistar âgés de 9 semaines. Dans un second temps, les animaux ont été répartis de manière randomisée en 4 groupes : contrôles, traités à l'insuline, entraînés, traités à l'insuline et entraînés. Après 8 semaines d'entraînement sur tapis roulant et/ou de traitement par l'insuline, les animaux ont été sacrifiés. Le poids de chaque rat a été noté, et le sang et les tissus ont été rapidement prélevés.

Des dosages sanguins ont été réalisés pour évaluer le contrôle glycémique (glucose et fructosamine). Des analyses du muscle squelettique (soléaire) ont été également pratiquées pour étudier des marqueurs du SO (isoprostanes et GSH/GSSG) et le système antioxydant (SOD, GPX, ORAC).

Un groupe contrôle additionnel, non-diabétique, a été étudié pour vérifier les altérations induites par le diabète.

L'ensemble des détails techniques du protocole est présenté en annexe dans la section Fiches techniques.

RESULTATS

Le diabète est caractérisé, comme attendu, par une hyperglycémie, une perte de poids sévère, et des niveaux élevés de fructosamine. Les isoprostanes élevés et le rapport GSH/GSSG réduit chez les rats diabétiques comparés aux contrôles, attestent d'un SO important chez les animaux diabétiques. Pourtant,

l'activité du système antioxydant n'est pas modifiée chez les animaux diabétiques. Cette absence apparente d'adaptations pourrait en fait traduire la mise en jeu de mécanismes aux effets opposés : d'un côté une élévation de l'expression des enzymes antioxydantes pour tente de lutter contre le SO, de l'autre une inactivation de ces mêmes enzymes, résultant notamment de l'hyperglycémie chronique (phénomène de glycation).

Le traitement par insuline s'accompagne d'une amélioration de la régulation de la glycémie, comme le montrent des niveaux plus faibles de fructosamine chez les animaux diabétiques traités à l'insuline comparés aux diabétiques contrôles. Paradoxalement, l'hyperglycémie reste présente malgré les injections d'insuline. Ce résultat pourrait s'expliquer par le délai (20 heures environ) entre la dernière injection d'insuline et la mesure de la glycémie, l'insuline n'exerçant alors plus que très faiblement son action hypoglycémiant. L'amélioration du contrôle métabolique résultant du traitement à l'insuline est associée à une diminution des marqueurs du SO (isoprostanés et GSH/GSSG), ainsi qu'à une élévation de l'activité des enzymes antioxydantes, probablement en lien avec une diminution de la glycation de ces enzymes.

La mise en place d'un entraînement seul, bien qu'il ne réduise pas l'hyperglycémie, s'accompagne d'une diminution des marqueurs du SO. L'activité du système antioxydant n'est toutefois pas modifiée.

Enfin, l'association du traitement à l'insuline et de l'entraînement est la seule prise en charge permettant d'observer une baisse de la glycémie, même à distance de la dernière injection d'insuline. Ce résultat suggère que l'entraînement permet de prolonger l'action de l'insuline, évitant ainsi la survenue d'épisodes hyperglycémiques fréquents. De plus, l'association de l'insuline à l'entraînement permet d'augmenter l'activité de la SOD, celle-ci étant corrélée à l'efficacité de l'entraînement évalué par la citrate synthase (CS). La CS est également corrélée à l'ORAC et inversement corrélée à la CML. Ces observations indiquent que, dès lors que la glycémie est régulée par l'insuline, la balance oxydante dans le muscle squelettique est favorablement impactée par un entraînement. Le traitement à l'insuline est donc nécessaire pour que les bénéfices de l'entraînement sur la balance oxydante puissent s'exercer, et à l'inverse, l'association de l'entraînement à l'insulinothérapie permet à cette dernière d'être plus efficace.

CONCLUSION

Ces résultats démontrent que la combinaison du traitement par insuline et de l'entraînement constitue la prise en charge la plus efficace chez des animaux diabétiques, pour améliorer la régulation de la glycémie et réduire le SO.

Le SO étant par ailleurs impliqué dans le développement des complications diabétiques, notamment les complications vasculaires, il est serait intéressant de déterminer dans ce contexte, si l'association de l'entraînement à l'insuline exerce des effets additifs sur la réduction de la production d'espèces oxydantes.

Endurance training and insulin therapy are both required to obtain the full therapeutic benefit on oxidant stress and glycemic regulation in diabetic rats

L. MALARDE^a; A. GRATAS-DELAMARCHE^a; S. LE DOUAIROU-LAHAYE^a; M.S. ZGUIRA^a; S. VINCENT^a; S. LEMOINE-MOREL^a; C. GROUSSARD^a

^a: Laboratory M2S, Université Rennes 2-ENS Cachan, Avenue Charles Tillon, CS24414 35044 Rennes

Training, insulin, oxidant stress, diabetes

Corresponding author

Ludivine Malardé

Laboratoire M2S – UFR APS

Université Rennes 2-ENS Cachan

2, avenue Charles Tillon

CS24414

35044 RENNES Cedex

Email: ludivine.malarde@gmail.com

Phone number: (+33)2.99.14.17.75

Fax number: (+33)2.99.14.17.74

Endurance training and insulin therapy are both required to obtain the full therapeutic benefit on oxidant stress and glycaemic regulation in diabetic rats

Abstract

In type 1 diabetic subjects, hyperglycaemia-induced oxidant stress (OS) is a central mechanism in the onset and development of diabetic complications. This study aimed to assess the effects of an endurance training program and insulin therapy, alone or in combination, on glycaemic regulation, oxidant stress markers, and the antioxidant system in diabetic rats.

Forty male Wistar rats were divided into diabetic (D), insulin-treated diabetic (D-Ins), diabetic trained (D-Tr), or insulin-treated diabetic trained (D-Ins+Tr) groups. An additional healthy group served as a control group. Insulin therapy (Lantus, insulin glargine, Sanofi) and endurance training (a treadmill run of 60 min/day, 25 m/min, 5 days/week) began one week after diabetes induction by streptozotocine (45 mg/kg) and continued for 8 weeks. At the end of the protocol, blood glycaemia and fructosamine levels were evaluated, and skeletal muscle OS markers (CML, isoprostanes, GSH/GSSG) and the antioxidant system (SOD and GPx activity, ORAC) were measured.

Diabetic rats exhibited altered glycaemic regulation and higher OS markers but no antioxidant system modifications. Insulin treatment improved the pro-antioxidant status and fructosamine levels but failed to correct glycaemia. Endurance training decreased OS markers without improving antioxidant enzyme activity. Endurance training and insulin therapy in combination extended insulin action, leading to decreased glycaemia in the D-Ins+Tr group. Moreover, endurance training, when associated with insulin treatment, exerted antioxidant effect by increasing SOD activity.

Our results demonstrate that a combination of insulin treatment and endurance training potentiates their respective effects on glycaemic regulation and oxidant status.

1. Introduction

Type 1 diabetes is characterised by hyperglycaemia resulting from insulin-secreting pancreatic beta cell destruction. Exogenous insulin administration is essential to keep patients alive, but long-term complications will occur that lead to decreased quality of life and life expectancy. Thus, in addition to insulin treatment, the goal of the therapeutic management of diabetes is the prevention of these complications.

Hyperglycaemia-induced oxidant stress is a key factor in the onset and progression of diabetic complications (Brownlee, 2001). Reactive oxygen species (ROS) overproduction with concomitant antioxidant system alterations are triggered by multiple mechanisms resulting from excess glucose, such as glucose autoxidation (Thornalley et al., 1984), protein glycation and formation of advanced glycated end products (AGE) (Brownlee et al., 1984), and polyol pathway activation (Bonnetfont-Rousselot et al., 2000). This hyperglycaemia-induced oxidant stress is implicated in diabetic complications by different ways: AGE alter signalisation pathways and bind to their specific receptors, leading to NF- κ B pathway activation; the hexosamine and the PKC pathway are stimulated by ROS; and then, these latter induce inflammatory processes (Giacco and Brownlee, 2010). A primary goal of type 1 diabetes mellitus management is to achieve proper glycaemic control via insulin injection, which reduces chronic complications. Nevertheless, even with intensive insulin therapy, hyperglycaemia and associated complications occur. Therefore, Miranda et al. stated in 2007 that "adjuvant therapies are needed to help in preventing or delaying the onset of the diabetic complications" (Miranda et al., 2007).

Physical activity is now integrated into the therapeutic management of diabetes because activity enhances glycaemic control and quality of life (2011). Moreover, in healthy people, endurance training enhances the capacity for antioxidant defence (Gomez-Cabrera et al., 2008). Surprisingly, however, the impact of regular exercise on oxidant stress and its role in type 1 diabetes complications has rarely been studied. In humans, only one study has assessed the effects of training on oxidant stress in children with type 1 diabetes. This study showed antioxidant system improvement with a concomitant increase in oxidative DNA damage (Woo et al., 2010). Some studies of type 1 diabetes animal models have focused on the effects of training in the absence of insulin treatment, highlighting the beneficial effects of a training intervention protocol on oxidative damage and the antioxidant system (Naziroglu and Butterworth, 2005). To our knowledge, no study has evaluated the effects of both insulin therapy and training intervention on glycaemic regulation and muscle oxidant status, even though insulin treatment is essential for diabetes therapy in humans. Furthermore, training may potentiate insulin-mediated effects on oxidant stress via various signalling pathways. Insulin treatment reduces oxidant stress mainly by reducing hyperglycaemia, and training reduces oxidant stress mainly by up-regulating antioxidant enzyme activity.

Thus, the aim of this study was to assess the effects of an endurance training program consisting of 8 weeks of treadmill running and insulin therapy, either alone or in combination, on glycaemic regulation, oxidant stress markers and the antioxidant system. We hypothesised that the effects of insulin and training, acting by different ways, could be additive effects to improve the therapeutic management of type 1 diabetes.

2. Materials and methods

2.1. Animals and diabetes induction

The experimental protocol was approved by the University of Rennes Ethics Committee and was in accordance with the Guide for the Care and Use of the Laboratory Animals. Forty nine-week-old male Wistar rats were obtained from Janvier (St-Gesnet-sur-Isle, France) and were housed individually in an air-conditioned room with a controlled temperature of 23–25°C and a 12/12 h light/dark cycle. Tap water and food were available ad libitum.

Diabetes was induced by intraperitoneal streptozotocin injection (Sigma Aldrich Chemicals, France). Streptozotocin was freshly dissolved in citrate buffer (0.1 mol/L, pH4.5) and administered at a dose of 45 mL/kg of body weight. An additional healthy control group (n=10 rats) received citrate buffer only. Blood glucose concentrations were measured 48 h later (MediSense Optium® glucometer, Abbott, France); animals with blood glucose levels greater than 250 mg.dL⁻¹ were considered diabetic. The other animals received a second streptozotocin injection, and blood glucose was measured again 48 h later (Szkudelski, 2001). Animals with glycaemia less than 250 mg.dL⁻¹ after the two injections were not included in the protocol.

2.2. Insulin therapy and training protocol

One week following confirmation of STZ-induced diabetes, diabetic animals were randomly assigned to one of four groups (n=10 rats per group): diabetic (D), diabetic treated with insulin (D-Ins), diabetic trained (D-Tr), or diabetic trained insulin-treated (D-Ins+Tr). Insulin treatment and the training protocol were started simultaneously and conducted for 8 weeks.

Insulin-treated groups (D-Ins and D-Tr+Ins) received a daily subcutaneous insulin injection (Lantus Insulin Glargine Optiset, Sanofi Aventis, France) at the same time, which corresponded to 4 to 6 hours after the training session for the DT-Tr+Ins group. Insulin doses were adjusted daily according to the blood glucose level as measured from the tail vein and varied between 8 and 15 U/kg⁻¹.

The training protocol consisted of continuous running on a rodent treadmill (Columbus Instruments) with a 10-degree slope 5 days/week. Exercise intensity and duration were progressively increased up to 25 m/min for 60 min, as previously validated in our laboratory in the same models (Le Douairon Lahaye et al., 2011). Untrained groups were placed in the same room during the training sessions to account for potential stress that may be induced by environmental modifications.

During all of the experimental protocols, the animals were weighed daily to monitor adaptation to diabetes, training and insulin therapy.

2.3. Tissue preparation

At the end of the intervention protocol, the animals were anaesthetised with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (50 mg/kg) 24 h after the last exercise session.

Whole blood was collected by cardiac puncture in EDTA tubes, blood glucose levels were measured, and blood samples were immediately centrifuged at 2000 × g for 10 min at 4°C to obtain plasma. Aliquots were stored at -80°C until fructosamine analysis.

Skeletal muscle (soleus) was quickly removed, washed in physiological saline buffer, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analysis. Tissue samples were ground under liquid nitrogen, homogenised in ice-cold 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4, 1:10 w/v) and centrifuged at $10\,000 \times g$ for 10 min at 4°C . The supernatant was aliquoted, and free radical scavengers were added in appropriate amounts to prevent artificial oxidation: 10 μL butylated hydroxytoluene (10 mM) was added for isoprostane analysis, and 10 μL MV2P (the scavenger that was provided in the kit) was added to the aliquots that were used for GSH/GSSG ratio analysis. The results obtained from skeletal muscle were normalised to protein content to account for body weight variation during the experiment.

2.4. Biochemical analysis

2.4.1. Glycaemic regulation

Plasma fructosamine levels were determined using a colorimetric method (Cerba, France).

2.4.2 Oxidant stress markers in skeletal muscle

Carboxymethyl-lysine (CML) levels in soleus muscle were determined with a colorimetric method using a Circulex ELISA kit (CycLex, Japan). Aliquoted homogenates used for CML measurement were diluted four times to a final dilution of 1:40. The assay was performed according to the manufacturer's instructions.

Isoprostanes were extracted from tissue homogenates by thermolysis and LC/MS analysis, as previously described (Youssef et al., 2009; Malarde et al., 2012). Briefly, samples were submitted to alkaline hydrolysis at 37°C for 1h and were loaded into isoprostane affinity columns (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). The isoprostane-containing eluate was evaporated under vacuum in a SpeedVac (Sc110A-UVS400A Savant), dissolved in 20 μL solvent solution, and injected into the high-performance liquid chromatography system (Surveyor, Thermo Finnigan) that was interfaced with an LCQ Deca mass spectrometer (Thermo Finnigan). Samples were analysed in SIM mode for F2 α -isoprostane (m/z 353.2) ions and the deuterated internal standard (m/z 357.2). Sample F2 α -isoprostane concentration was calculated from the area ratio of the peaks m/z 353.2 and m/z 357.2.

Reduced and oxidised glutathione levels were measured with a Bioxytech GSH/GSSH-412 kit (Bioxytech, Oxis International, Inc., Portland, WA, USA) with some modifications to adapt the protocol for muscle homogenates, as previously described (Kim et al., 2009).

2.3.3. Antioxidant system measurements

Ransod and Ransel kits (Randox, France) were used to evaluate SOD and GPX activity, respectively.

Sample antioxidant capacity was assessed by the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay, according to Cao et al. (Cao et al., 1993). The results were expressed as μmol Trolox equivalents.

2.3.4. Citrate synthase activity

Citrate synthase (CS) activity, used as an index of oxidative metabolism adaptations to endurance training, was spectrophotometrically determined, as previously described (Lemoine et al., 2002). The results were expressed as the percentage of CS activity compared with the respective sedentary counterpart values.

2.4. Statistical analysis

Results were expressed as the mean \pm standard error of mean. The effect of diabetes was assessed using a Mann-Whitney test to compare the healthy group and the D group. Effects of the intervention protocols (training and insulin, alone or in combination) on the diabetic groups were determined with a one-way ANOVA. The Dunnett post-hoc test was used to specify the differences of each intervention protocol compared with the control diabetic group (D), and the Student Newman-Keuls post-hoc test was used to determine which therapeutic management was more effective in improving glycaemic regulation and oxidant stress. The Spearman test was used to detect correlations among variables in each group. $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1 Diabetes-induced alterations

The consequences of diabetes on glycaemic control and oxidant balance are reported in table 1. Streptozotocin efficiency was determined by assessing higher blood glucose levels in the D group compared with healthy rats. Elevated fructosamine levels confirmed that hyperglycaemia was sustained throughout the experiment. Diabetes was associated with weight loss, inducing a lower weight in the D group at the end of the protocol.

Metabolic alterations in the D group were coupled with muscle oxidant stress, as indicated by increases in isoprostane levels and CML, a glycoxidation marker, and a decreased GSH/GSSG ratio. Nevertheless, the antioxidant system, as assessed by SOD and GPX activity and total antioxidant capacity, was not modified.

3.2 Effects of therapeutic interventions

Endurance training efficiency was assessed by measuring citrate synthase activity, which was increased by 70% in the D-Tr group compared with the D group and by 59% in the D-Ins+Tr group compared with the D-Ins group.

3.2.1 Glycaemic regulation

Training alone did not modify blood glucose and fructosamine levels. As expected, insulin treatment, alone or in combination with training, improved glycaemic control in diabetic rats, as evidenced by reduced fructosamine levels in the D-Ins and D-Ins+Tr groups compared with the D group (Figure 1 B). However, blood glucose levels were significantly reduced only when insulin treatment was performed in combination with training (Figure 1 A).

3.2.2 Oxidant stress markers

CML levels in skeletal muscle were decreased by insulin treatment and endurance training alone and in combination. The three intervention protocols were effective to the same extent, and no difference was found among the D-Ins, D-Tr and D-Ins+Tr groups (Figure 2A).

Isoprostane levels were decreased in the three groups compared with the diabetic controls, but insulin treatment and endurance training in combination (D-Ins+Tr group) was more effective at reducing isoprostane levels than training alone (D-Tr group) (Figure 2B).

The GSH/GSSG ratio was improved by insulin treatment whether provided alone or in combination with endurance training. Moreover, the ratio was higher in the D-Ins and D-Ins+Tr groups than in the D-Tr group, and was not improved by training alone (Figure 2C).

3.2.3 Antioxidant system

The evolution of the antioxidant system is presented in figure 3.

Insulin treatment alone (D-Ins) or in combination with training (D-Ins+Tr) increased SOD activity compared with the D group and the D-Tr group. SOD activity was unchanged by endurance training.

GPX activity and ORAC were not significantly influenced by any of the three treatments.

3.3 Correlations

In the D-Ins group, glycaemic control, as indicated by blood glucose and fructosamine levels, was inversely correlated with final body weight ($r=-0.80$ and $r=-0.82$, respectively). Fructosamine was also negatively correlated with SOD activity ($r=-0.80$).

In the D-Tr group, positive correlations were found between CS and SOD activity ($r= 0.80$), and negative correlations were found among CS activity, total GSH ($r=-0.75$) and ORAC ($r=-0,80$).

When training was associated with insulin treatment (D-Ins+Tr group), CS was still correlated with SOD activity ($r=0.80$).

4. Discussion

Hyperglycaemia, which is characteristic of streptozotocin-induced diabetes, is associated with oxidant stress (Bonnetfont-Rousselot et al., 2000). Elevated fructosamine levels indicate that hyperglycaemia was sustained throughout the experiment and was associated with a pro-oxidant state, as evidenced by a decrease in the GSH/GSSG ratio and increased isoprostane and CML levels. In diabetes, CML is a general marker of oxidant stress because it is a major product of glycated protein oxidative modifications (Schleicher et al., 1997). Surprisingly, the antioxidant system was not modified despite increased oxidant stress. This lack of antioxidant system adaptation could be the result of two opposite mechanisms. First, oxidant stress may stimulate the antioxidant system, possibly by up-regulating antioxidant enzyme gene and protein expression (Kullik and Storz, 1994) to counteract ROS production and limit oxidative damage. Second, antioxidant enzymes may be, in parallel, inactivated by hyperglycaemia-induced glycation. Glycation of antioxidant enzymes has been previously reported in diabetic people (Kawamura et al., 1992), leading to inactivation of GPX (Miranda et al., 2007) and SOD (Arai et al., 1987). Sindhu et al. hypothesised that this may explain the lack of adaptation or the decrease in the enzymatic antioxidant system in diabetic subjects despite a concomitant increase in oxidant stress (Sindhu et al., 2004).

Insulin therapy improved long-term metabolic control, as demonstrated by a significant decrease (-26%) in blood fructosamine levels. Surprisingly, hyperglycaemia was not significantly reduced by insulin treatment alone (-18%, $p=0.07$). This lack of effectiveness may be explained by a delay between the blood glucose measurement, which was measured at the time of the sacrifice, and the last injection of insulin, which had been given 18 hours prior. Our results demonstrate that the efficiency of this long-acting basal insulin analogue (the manufacturer advises that glargine insulin be injected once daily) decreases gradually after the injection, causing hyperglycaemia before the next injection. Nevertheless, the insulin-therapy-mediated improvement of metabolic control, as measured by fructosamine levels, was associated with oxidant stress marker reduction, thus highlighting the role of sustained hyperglycaemia in diabetes-induced oxidant stress (Bonnetfont-Rousselot et al., 2000). Moreover, the antioxidant system was improved by insulin treatment, as demonstrated by a significant up-regulation in SOD activity. Increased insulin-mediated antioxidant enzyme activity has been previously reported in some tissues (Wohaieb and Godin, 1987; Sindhu et al., 2004). However, this study is the first to demonstrate increased SOD activity in skeletal muscle after insulin treatment in streptozotocin-induced diabetic rats. We explain this insulin-mediated improvement in SOD activity by a possible decrease in SOD glycation resulting from better glycaemic control because fructosamine levels were inversely correlated with SOD activity.

As expected, the endurance training program caused oxidative metabolism adaptations because citrate synthase activity was increased in both trained groups compared with their sedentary counterparts. Endurance training alone failed to improve glycaemic control. Nevertheless, blood glucose levels were so high that they would be difficult to reduce with training only. Endurance training-induced decreases in blood glucose levels were reported by Gul et al., but the hyperglycaemia in their diabetic rats was less pronounced than in our study (approximately 3.5 mg/dL vs. 5.6 mg/dL in the diabetic controls) (Gul et al., 2002). Moreover, endurance training alone decreased isoprostane and CML levels in skeletal muscle,

demonstrating its ability to reduce oxidant stress. These results are in agreement with previous studies that reported decreased TBARS in the vastus lateralis muscle after a similar training program (Gul et al., 2002). Despite oxidant stress marker reduction, antioxidant enzyme activity was not up-regulated by training. However, an adaptive response has nevertheless occurred, as evidenced by the correlation between the SOD and CS activities, meaning that more training is efficient, more antioxidant system is enhanced. The absence of a general increase in SOD activity in the D-Tr group may be explained by the lack of glycaemic improvement in this group because sustained hyperglycaemia inactivates SOD.

Because insulin therapy improves glycaemic control, we chose to test the two intervention protocols together. We hypothesised that insulin treatment and endurance training in combination may be more efficient than each intervention protocol alone by improving glycaemic regulation and oxidant status.

The combination of endurance training and insulin therapy was the only intervention protocol that decreased glycaemia compared with diabetic controls (D group) by improving insulin treatment efficiency. Blood glucose levels were significantly reduced only in the D-Ins+Tr group (-39.8%, $p < 0.0001$) compared with the D group. Blood glucose levels were not decreased in the D-Ins group despite an identical time delay between the last insulin injection and the blood glucose measurement at sacrifice in both the D-Ins and D-Ins+Tr groups. These results suggest that training prolongs insulin action, possibly because of the insulin-sensitising effect of chronic exercise, as previously reported in healthy and diabetic subjects (Wallberg-Henriksson et al., 1982).

When insulin therapy was added to training, correlation between CS and SOD activity noticed in D-Tr group was also observed, and resulted, in this group only, in significant increase of SOD activity. These results suggest that insulin treatment-mediated improvement in glycaemic control is necessary for the endurance training-induced adaptation of the antioxidant system. Moreover, insulin addition rendered endurance training more efficient to reduce skeletal muscle isoprostane levels (-42.3% in D-Tr vs. -73.1% in D-Ins+Tr, $p < 0.05$).

In the D-Ins+Tr group, CS activity was positively correlated with ORAC and inversely correlated with CML. These correlations highlight that endurance training-induced adaptations in oxidative metabolism combined with insulin therapy improved skeletal muscle oxidant balance. Endurance training needs to be associated with insulin therapy to exert its antioxidant effects because there is no correlation between oxidant stress and oxidative metabolism adaptations when training is performed alone.

In summary, insulin therapy improved metabolic control and hyperglycaemia-induced oxidant stress. Eight weeks of endurance training decreased oxidant stress without improving the antioxidant system or metabolic control in streptozotocin-induced diabetic rats. Endurance training in combination with insulin therapy, regulated glucose metabolism by lengthening insulin action time and thus decreasing hyperglycaemic events. Insulin treatment enabled the training to increase antioxidant system activity by limiting hyperglycaemia. When training was performed without insulin treatment, adaptations of the antioxidant system were suppressed.

To conclude, endurance training and insulin therapy are both required to obtain the full therapeutic benefit in the management of type 1 diabetes.

6. References

- [1] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-20
- [2] Thornalley P, Wolff S, Crabbe J, Stern A. The autoxidation of glyceraldehyde and other simple monosaccharides under physiological conditions catalysed by buffer ions. *Biochim Biophys Acta* 1984;797:276-87
- [3] Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med* 1984;101:527-37
- [4] Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab* 2000;26:163-76
- [5] Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 2010;107:1058-70
- [6] Miranda M, Muriach M, Almansa I, Arnal E, Messeguer A, Diaz-Llopis M, et al. CR-6 protects glutathione peroxidase activity in experimental diabetes. *Free Radic Biol Med* 2007;43:1494-8
- [7] Standards of medical care in diabetes--2011. *Diabetes Care* 2011;34 Suppl 1:S11-61
- [8] Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Vina J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med* 2008;44:126-31
- [9] Woo J, Yeo NH, Shin KO, Lee HJ, Yoo J, Kang S. Antioxidant enzyme activities and DNA damage in children with type 1 diabetes mellitus after 12 weeks of exercise. *Acta Paediatr* 2010;99:1263-8
- [10] Naziroglu M, Butterworth PJ. Protective effects of moderate exercise with dietary vitamin C and E on blood antioxidative defense mechanism in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Can J Appl Physiol* 2005;30:172-85
- [11] Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001;50:537-46
- [12] Le Douairon Lahaye S, Rebillard A, Zguira MS, Malarde L, Saiag B, Gratas-Delamarche A, et al. Effects of exercise training combined with insulin treatment on cardiac NOS1 signaling pathways in type 1 diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 2011;347:53-62
- [13] Youssef H, Groussard C, Pincemail J, Moussa E, Jacob C, Lemoine S, et al. Exercise-induced oxidative stress in overweight adolescent girls: roles of basal insulin resistance and inflammation and oxygen overconsumption. *Int J Obes (Lond)* 2009;33:447-55
- [14] Malarde L, Gratas-Delamarche A, Lefevre-Orfila L, Vincent S, Efstathiou T, Groussard C. A Fermented Soy Permeate improves the skeletal muscle glucose level without restoring the glycogen content in streptozotocin-induced diabetic rats (in press). *J Med Food* 2012;
- [15] Kim J, Seok YM, Jung KJ, Park KM. Reactive oxygen species/oxidative stress contributes to progression of kidney fibrosis following transient ischemic injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;297:F461-70

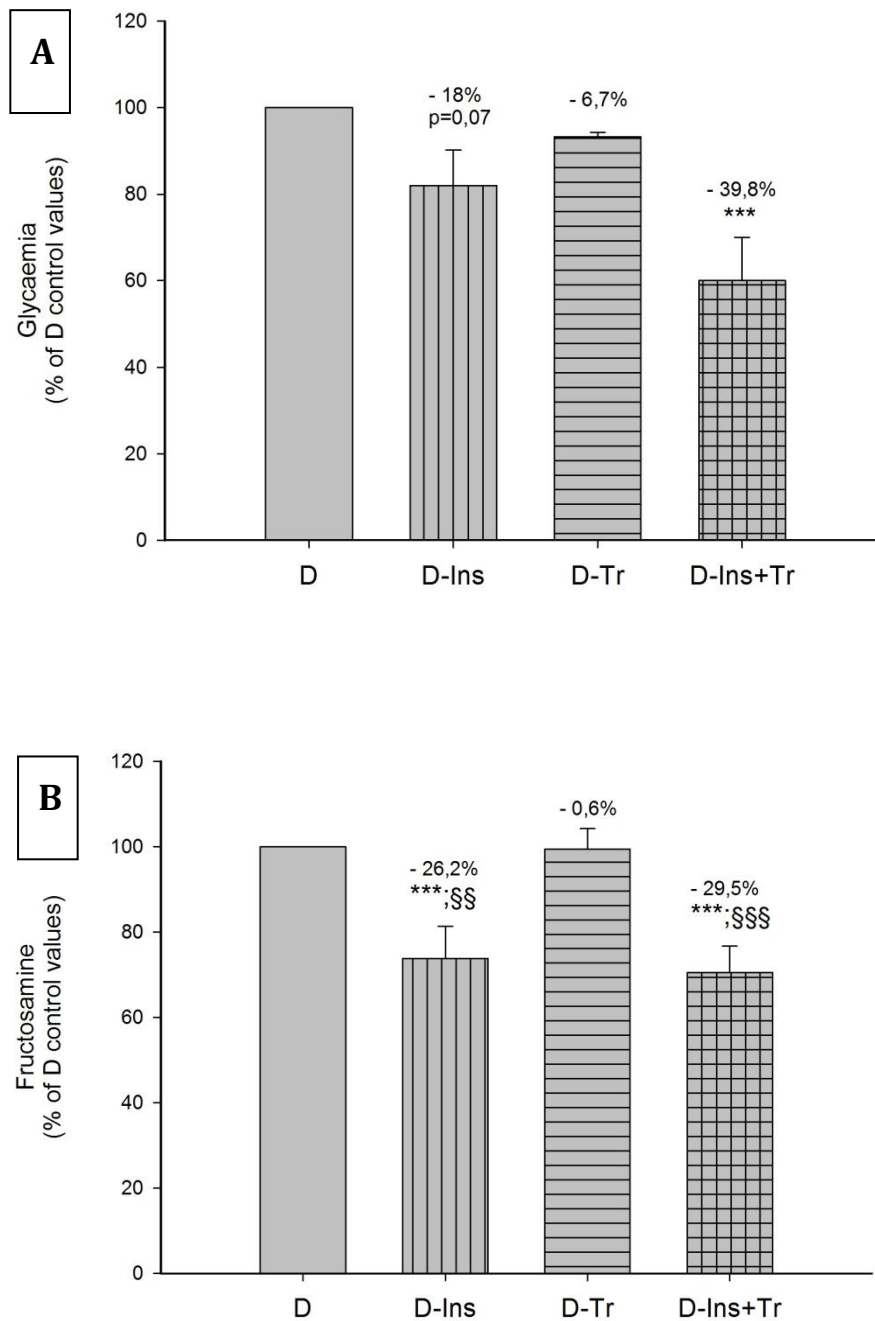
- [16] Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1993;14:303-11
- [17] Lemoine S, Granier P, Tiffoche C, Berthon PM, Rannou-Bekono F, Thieulant ML, et al. Effect of endurance training on oestrogen receptor alpha transcripts in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 2002;174:283-9
- [18] Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycooxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest* 1997;99:457-68
- [19] Kullik I, Storz G. Transcriptional regulators of the oxidative stress response in prokaryotes and eukaryotes. *Redox Report* 1994;1:23-9
- [20] Kawamura N, Ookawara T, Suzuki K, Konishi K, Mino M, Taniguchi N. Increased glycated Cu,Zn-superoxide dismutase levels in erythrocytes of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:1352-4
- [21] Arai K, Iizuka S, Tada Y, Oikawa K, Taniguchi N. Increase in the glycosylated form of erythrocyte Cu-Zn-superoxide dismutase in diabetes and close association of the nonenzymatic glycosylation with the enzyme activity. *Biochim Biophys Acta* 1987;924:292-6
- [22] Sindhu RK, Koo JR, Roberts CK, Vaziri ND. Dysregulation of hepatic superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in diabetes: response to insulin and antioxidant therapies. *Clin Exp Hypertens* 2004;26:43-53
- [23] Wohaieb SA, Godin DV. Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. *Diabetes* 1987;36:1014-8
- [24] Gul M, Laaksonen DE, Atalay M, Vider L, Hanninen O. Effects of endurance training on tissue glutathione homeostasis and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Scand J Med Sci Sports* 2002;12:163-70
- [25] Wallberg-Henriksson H, Gunnarsson R, Henriksson J, DeFronzo R, Felig P, Ostman J, et al. Increased peripheral insulin sensitivity and muscle mitochondrial enzymes but unchanged blood glucose control in type I diabetics after physical training. *Diabetes* 1982;31:1044-50

Table 1: Effects of streptozotocin-induced diabetes (9 weeks) on glycaemic regulation, oxidant stress and the antioxidant system in skeletal muscle

	WEIGHT AND BLOOD GLYCAEMIC REGULATION			MARKERS OF OXIDANT STRESS IN MUSCLE			ANTIOXIDANT SYSTEM IN MUSCLE		
	Weight (gr)	Glycaemia (mg/dL)	Fructosamine (μ mol/L)	CML (mg/mg prot)	Isoprostanes (pg/mg prot)	GSH/GSSG	SOD (U/mg prot)	GPX (U/mg prot)	ORAC (mmol eq Trolox/mg prot)
Healthy controls (n=10)	505 \pm 11	127.9 \pm 6.4	111.5 \pm 5.4	113.3 \pm 12.8	32.0 \pm 4.2	3.6 \pm 0.4	29.7 \pm 2.6	35.3 \pm 3.6	9.0 \pm 1.8
Diabetic controls (n=10)	258*** \pm 19	562.3*** \pm 25.6	230.6*** \pm 10.3	181.4* \pm 25.1	80.1* \pm 16.5	2.2* \pm 0.3	27.4 \pm 3.3	39.1 \pm 4.3	8.3 \pm 0.8

Values are means \pm SEM. *: significant difference between healthy and diabetic animals (*: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$)

Figure 1: Effects of insulin therapy and/or endurance training on glycaemic regulation in streptozotocin-induced diabetic rats

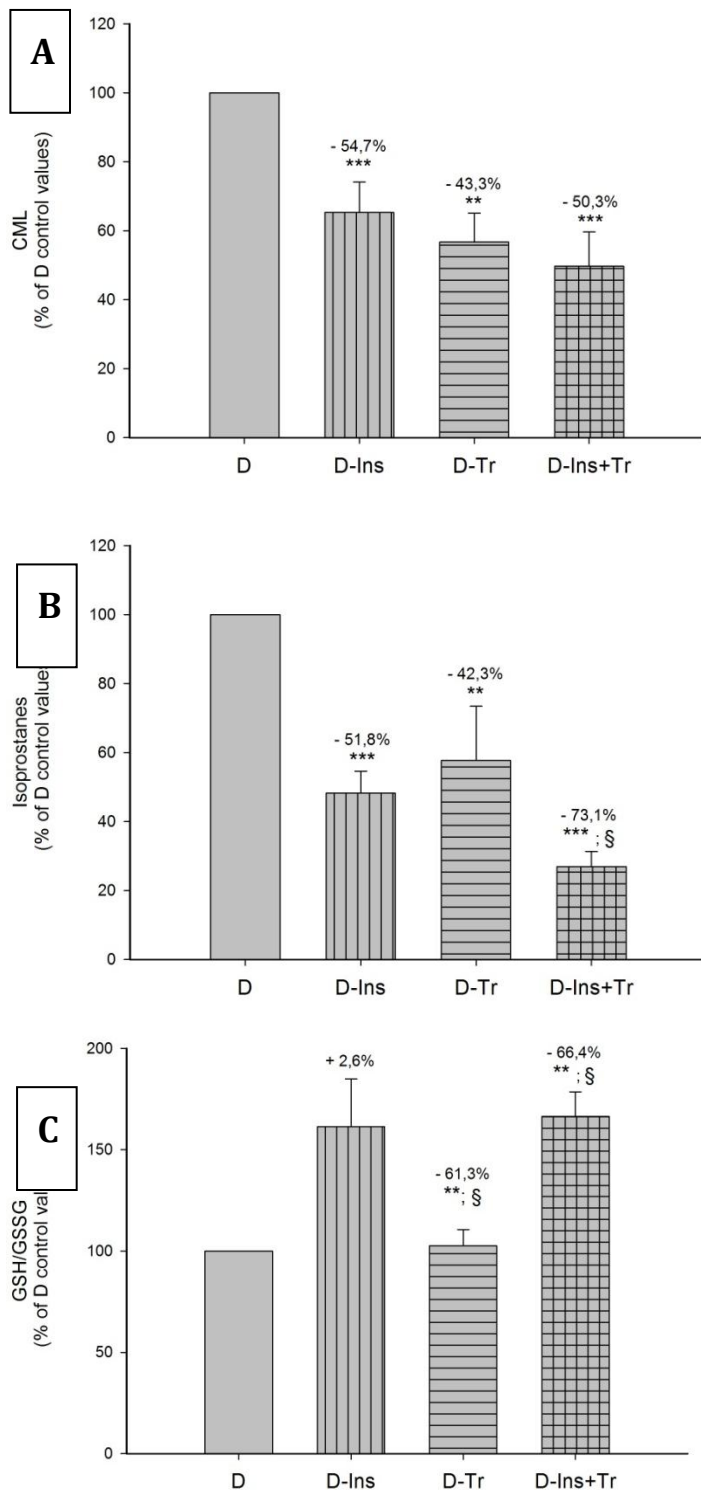


Values are expressed as a percentage of the diabetic control values (D) \pm SEM.

: significant difference vs. the D group (: $p < 0.001$)

§§§: significant difference vs. the D-Tr group (§§§: $p < 0.001$)

Figure 2: Effects of insulin therapy and/or endurance training on skeletal muscle oxidant stress in streptozotocin-induced diabetic rats

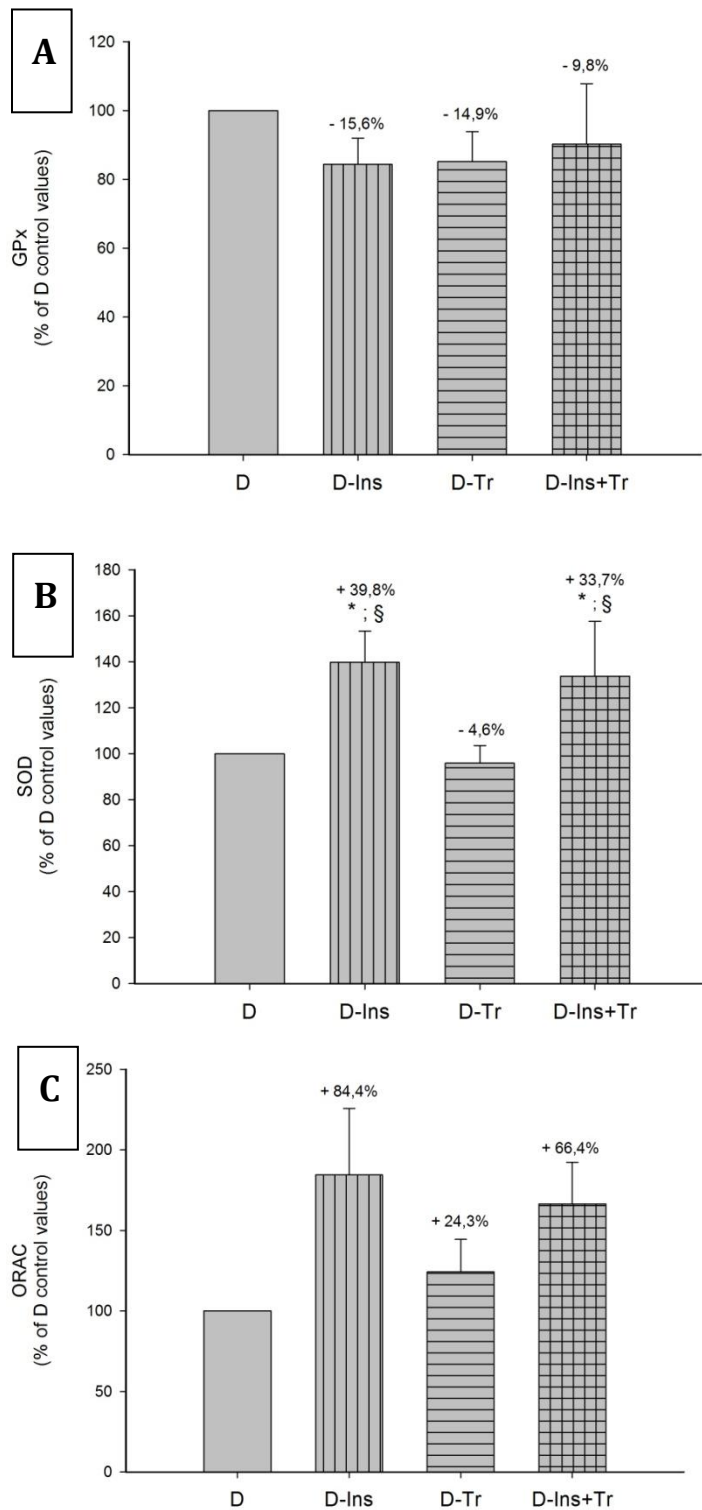


Values are expressed as a percentage of the diabetic control values (D) \pm SEM.

** : significant difference vs. the D group (**: $p < 0.01$)

§ : significant difference vs. the D-Tr group (§: $p < 0.05$)

Figure 3: Effects of insulin therapy and/or endurance training on the skeletal muscle antioxidant system in streptozotocin-induced diabetic rats



Values are expressed as a percentage of the diabetic control values (D) \pm SEM.

: significant difference vs. the D group (: $p < 0.05$)

§: significant difference vs. the D-Tr group (§: $p < 0.05$)

Etude 4 : Voies de production aortique de l'anion superoxyde chez le rat diabétique : bénéfiques de l'insulinothérapie et de l'entraînement

INTRODUCTION

Le diabète de type 1 est associé, à long terme, à de nombreuses complications, notamment d'ordre cardiovasculaire. L'origine des dysfonctions endothéliales (altération de la relaxation endothélium-dépendante,) dans le diabète, est attribuée à la production d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Ce dernier, en se liant avec le monoxyde d'azote ($^{\circ}NO$), forme des peroxynitrites, ce qui diminue la biodisponibilité du $^{\circ}NO$ qui ne peut plus alors exercer son rôle vasodilatateur. L' $O_2^{\cdot-}$ favorise également le découplage de la NO synthase endothéliale (eNOS), qui produit alors de l' $O_2^{\cdot-}$ au détriment du NO. Les principales sources vasculaires d' $O_2^{\cdot-}$ activées dans le diabète incluent la NADPH-oxydase (NOX), la eNOS découplée, et la xanthine oxydase (XO).

L'objectif de cette étude est de déterminer la part respective des différentes sources enzymatiques productrices d' $O_2^{\cdot-}$ dans l'aorte de rats diabétiques, puis d'étudier l'effet d'une prise en charge par l'insuline et/ou l'entraînement sur ces différentes voies. Nous faisons l'hypothèse que ces prises en charge, en agissant par des voies différentes, pourraient lorsqu'elles sont proposées simultanément, réduire l' $O_2^{\cdot-}$ de manière plus importante que lorsqu'elles sont proposées de façon isolée.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Dans un premier temps, le diabète a été induit par une injection de streptozotocine (45mg/kg) chez 40 rats mâles Wistar âgés de 9 semaines. Dans un second temps, les animaux ont été répartis de manière randomisée en 4 groupes : contrôles, traités à l'insuline, entraînés, traités à l'insuline et entraînés. Après 8 semaines d'entraînement sur tapis roulant et/ou de traitement par l'insuline, les animaux ont été sacrifiés, et l'aorte prélevée. La détection de l'anion superoxyde dans l'aorte a été faite par un marquage sur coupes, en utilisant une sonde fluorescente, la dihydroéthidine (DHE). L'importance respective des différentes voies de production enzymatique de l'anion superoxyde a été évaluée en utilisant des inhibiteurs de la NOX (apocynine), de la eNOS (L-Name) et de la XO (allopurinol). Un groupe contrôle additionnel, non-diabétique, a été étudié pour vérifier les altérations induites par le diabète.

L'ensemble des détails techniques du protocole est présenté en annexe dans la section Fiches techniques. L'analyse des images obtenues par le marquage fluorescent a fait l'objet d'une mise au point technique présentée comme travail complémentaire à la fin de cette section (p.192).

RESULTATS

Le diabète est associé à une élévation de la production d' O_2° dans l'aorte, résultant de l'activation des trois voies de production enzymatiques étudiées, celles-ci étant elles-mêmes activées par une hyperglycémie prononcée.

L'insulinothérapie permet de réduire l'hyperglycémie, et par conséquent, la production d' O_2° , en supprimant l'activation des trois enzymes qui, dans le groupe diabétique, sont impliquées dans la production aortique d' O_2° .

L'entraînement est associé à une amélioration moins marquée du contrôle glycémique, mais permet également une réduction de la production d' O_2° . Toutefois, seules la eNOS et la XO ne sont plus activées chez les rats diabétiques entraînés, la NOX continuant de produire de l' O_2° . Malgré le fait que l'entraînement n'agisse que sur deux des trois principales voies impliquées dans la production d' O_2° , et qu'il ne diminue la glycémie que dans une moindre mesure comparé à l'insuline, il réduit la production d' O_2° dans les mêmes proportions que le traitement à l'insuline. Ces résultats suggèrent que l'entraînement exerce ses effets par des voies partiellement différentes de l'insuline, et n'agit pas uniquement en limitant l'hyperglycémie, pour réduire la production d' O_2° .

Malgré la mise en évidence de mécanismes d'action partiellement différents pour l'insuline et l'entraînement, ceux-ci n'exercent pas d'effets additifs lorsqu'ils sont proposés simultanément : la réduction de la production d' O_2° est similaire à celle observée lorsque chacune des prises en charge est proposée de façon isolée. La baisse de la glycémie est comparable à celle observée en réponse à l'entraînement seul, indiquant que des effets bénéfiques s'exercent par un autre mécanisme.

CONCLUSION

Ces résultats démontrent que l'insulinothérapie et l'entraînement en endurance : 1/ sont efficaces pour réduire la production vasculaire d' O_2° dans le diabète, qu'ils soient proposés seuls ou en association ; 2/ agissent par des mécanismes partiellement différents, le principal facteur pour réduire la production d' O_2° étant la régulation de la glycémie ; 3/ n'exercent pas, contrairement à ce que nous pourrions penser, d'effets additifs lorsqu'ils sont proposés simultanément.

Des recherches complémentaires sont donc nécessaires pour déterminer les modalités de prise en charge qui permettraient de bénéficier au mieux des effets bénéfiques respectifs de l'insuline ou de l'entraînement.

Superoxide production pathways in aorta of diabetic rats : beneficial effects of insulin therapy and endurance training

L. MALARDE^a; A. REBILLARD^a; S. LE DOUAIRON-LAHAYE^a; S. VINCENT^a; M.S. ZGUIRA^a; S. LEMOINE-MOREL^a; A. GRATAS-DELAMARCHE^a; C. GROUSSARD^a

^a: Laboratory M2S, Université Rennes 2-ENS Cachan, Avenue Charles Tillon, CS24414
35044 Rennes

Corresponding author

Ludivine Malardé

Laboratoire M2S – UFR APS

Université Rennes 2-ENS Cachan

2, avenue Charles Tillon

CS24414

35044 RENNES Cedex

Email : ludivine.malarde@gmail.com

Phone number : (+33)2.99.14.17.75

Fax number : (+33)2.99.14.17.74

Superoxide production pathways in aorta of diabetic rats : beneficial effects of insulin therapy and endurance training

Abstract

Superoxide ($O_2^{\cdot-}$) overproduction, by decreasing nitric oxide ($^{\circ}NO$) bioavailability, is implicated in vascular complications of type 1 diabetes. Potential sources of vascular $O_2^{\cdot-}$ production in type 1 diabetes include NADPH oxidase (NOX), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), and xanthine oxidase (XO). This study aimed to determine the part of each enzymatic pathway in hyperglycemic-induced $O_2^{\cdot-}$ overproduction, and the effects of an endurance training program and insulin therapy, associated or not, on $O_2^{\cdot-}$ production (amount and sources) in diabetic rats.

Forty male Wistar rats were divided into diabetic (D), diabetic treated with insulin (D-Ins), diabetic trained (D-Tr), or diabetic insulin-treated plus trained (D-Ins+Tr) groups. An additional healthy group served as control. Insulin therapy (Glargine Lantus, Sanofi) and endurance training (treadmill run: 60 min/day, 25m/min, 5 days/weeks) started one week after diabetes induction by streptozotocine (45mg/kg), and continued for 8 weeks. At the end of the protocol, $O_2^{\cdot-}$ production in aorta ring was evaluated by histochemical analyses (DHE staining). Study of each production pathway was performed by inhibiting NOX (apocynine), eNOS (L-Name), or XO (allopurinol) before DHE staining.

Diabetic rats exhibited an hyperglycemic-induced $O_2^{\cdot-}$ overproduction, resulting from activation of NOX, eNOS, and XO. Insulin therapy and endurance training, associated or not, succeeded to decrease $O_2^{\cdot-}$ overproduction in similar amount. Insulin therapy effects was mediated by reduction of hyperglycemia, and decreased the three enzymatic pathways implicated in $O_2^{\cdot-}$ production. Endurance training acted by decreasing directly eNOS and XO activity. Despite acting by different mechanisms, association of both therapeutic strategies didn't exhibit higher benefits in reducing $O_2^{\cdot-}$ overproduction.

1. Introduction

Type 1 diabetes is associated with long-term complications, especially cardiovascular dysfunctions. The endothelial dysfunction is characterized by an impairment of the endothelium-dependent vasorelaxation mechanisms (De Vriese et al., 2000). Although the mechanisms responsible for endothelial dysfunction have not been completely elucidated, oxidant stress (OS) has been recognized as an important factor in the development of endothelial dysfunction, through the uncoupling of endothelial NO synthase (eNOS) or the inactivation of nitric oxide ($^{\circ}\text{NO}$) triggered by superoxide ($\text{O}_2^{\circ-}$) (De Vriese et al., 2000). Indeed, the strong decrease of $^{\circ}\text{NO}$ bioavailability (responsible for impaired endothelium-dependent vasodilatation) reported in type 1 diabetes, mainly results from $^{\circ}\text{NO}$ inactivation by $\text{O}_2^{\circ-}$, which react with $^{\circ}\text{NO}$ to form the highly toxic compound ONOO- (Pacher et al., 2007).

Increased basal production of $\text{O}_2^{\circ-}$ in the aorta has been reported in early studies using diabetic animals (Chang et al., 1993). Potential sources of vascular $\text{O}_2^{\circ-}$ production in type 1 diabetes include NADPH oxidase (NOX), eNOS, and xanthine oxidase (XO) (Guzik et al., 2000). Diabetes-associated high levels of glucose, increases the expression or activation of NOX in vascular cells (Liu et al., 2007). Sustained activation of NOX reduces the intracellular level of NADPH, which is an essential cofactor for eNOS. Moreover, overproduction of reactive oxygen species (ROS) leads to oxidation of tetrahydrobiopterin (BH4), another cofactor of eNOS. Lack of cofactors leads eNOS in an uncoupled state, where $\text{O}_2^{\circ-}$ is produced instead $^{\circ}\text{NO}$, thus reducing endothelium-dependent vasodilatation (Guzik et al., 2002; Dikalova et al., 2010). In addition, XO is increased in plasma of diabetic subjects (Matsumoto et al., 2003), and binding of plasmatic XO to endothelial cells induces $\text{O}_2^{\circ-}$ production, decreases of $^{\circ}\text{NO}$ bioavailability and finally alters endothelium-dependent vasodilatation (Houston et al., 1999).

Thus, inhibition of $\text{O}_2^{\circ-}$ (which is the central factor responsible for the impaired endothelial function) by various therapeutic strategies would prevent OS and the related diabetic vascular complications. In this regard, insulin treatment, which is essential to keep diabetic patients alive, reduces hyperglycemia-induced overproduction of $\text{O}_2^{\circ-}$. Nevertheless, several reports using experimental diabetic models have shown that improving glycemic control by insulin therapy does not sufficiently improve the diabetes-induced OS and associated complications (Wiernsperger, 2003): insulin therapy alone was unable to prevent or restore functional abnormalities in the aorta of type 1 diabetic rats (Karasu and Altan, 1993). Physical activity improves OS-mediated diabetic endothelial dysfunction, despite underlying mechanisms are poorly understood. Endurance training could increase $^{\circ}\text{NO}$ production by increasing eNOS activity and/or could decrease $^{\circ}\text{NO}$ degradation by reducing NOX activity and expression (Adams et al., 2005; Moien-Afshari et al., 2008).

The aim of this study was to assess the effects of insulin therapy and endurance training, alone or in combination, on superoxide formation pathways activated in type 1 diabetes, namely NOX, uncoupling eNOS, and XO. We hypothesized that these two intervention protocols, acting on different pathways, could be additive in reducing $\text{O}_2^{\circ-}$ formation in aorta of type 1 diabetic rats.

2. Materials and methods

2.1. Animals and diabetes induction

The experimental protocol was approved by the University of Rennes Ethics Committee and was in accordance with the Guide for the Care and Use of the Laboratory Animals. Forty nine-week-old male Wistar rats were obtained from Janvier (St-Gesnet-sur-Isle, France) and were housed individually in an air-conditioned room with a controlled temperature of 23–25°C and a 12/12 h light/dark cycle. Tap water and food were available ad libitum.

Diabetes was induced by intraperitoneal streptozotocin injection (Sigma Aldrich Chemicals, France). Streptozotocin was freshly dissolved in citrate buffer (0.1 mol/L, pH4.5) and administered at a dose of 45 mL/kg of body weight. An additional healthy control group (n=10 rats) received citrate buffer only. Blood glucose concentrations were measured 48 h later (MediSense Optium® glucometer, Abbott, France); animals with blood glucose levels greater than 250 mg.dL⁻¹ were considered diabetic. The other animals received a second streptozotocin injection, and blood glucose was measured again 48 h later (Szkudelski, 2001). Animals with glycaemia less than 250 mg.dL⁻¹ after the two injections were not included in the protocol.

2.2. Insulin therapy and training protocol

One week after diabetes confirmation, diabetic animals were randomly assigned to one of four groups (n=10 rats per group): diabetic (D), diabetic treated with insulin (D-Ins), diabetic trained (D-Tr), or diabetic trained insulin-treated (D-Ins+Tr). Insulin treatment and the training protocol were started simultaneously and conducted for 8 weeks.

Insulin-treated groups (D-Ins and D-Tr+Ins) received a daily subcutaneous insulin injection (Lantus Insulin Glargine Optiset, Sanofi Aventis, France) at the same time, which corresponded to 4 to 6 hours after the training session for the DT-Tr+Ins group. Insulin doses were adjusted daily according to the blood glucose level as measured from the tail vein and varied between 8 and 15 U/kg⁻¹.

The training protocol consisted of continuous running on a rodent treadmill (Columbus Instruments) with a 10-degree slope 5 days/week. Exercise intensity and duration were progressively increased up to 25 m/min for 60 min, as previously validated in our laboratory in the same models (Le Douairon Lahaye et al., 2011). Untrained groups were placed in the same room during the training sessions to account for potential stress that may be induced by environmental modifications.

During all of the experimental protocols, the animals were weighed daily to monitor adaptation to diabetes, training and insulin therapy.

2.3. Tissue preparation

At the end of the intervention protocol, the animals were anaesthetised with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (50 mg/kg) 24 h after the last exercise session. Whole blood was collected by cardiac

puncture in EDTA tubes and the blood glucose concentration was measured. Aorta was excised with caution, and one ring was included in Tissue-Tek OCT Compound (Fisher Sci, US), fixed in cold isopentane, and conserved in -80°C until histochemical analyses.

2.5 Histochemical analyses

Dihydroethidine (DHE) was used to detect superoxide production in isolated aorta. Briefly, cells are permeable to DHE, which in the presence of superoxide is oxidized to fluorescent ethidium bromide. Ethidium bromide is trapped by intercalation with DNA, and the intensity of fluorescence in nuclei indicates the relative level of superoxide production. Apocynine, allopurinol and L-Name were used as inhibitors of NOX, XO and NOS, respectively. Pre-incubation of slides with each inhibitor decreases fluorescent intensity proportionally to relative amount of $\text{O}_2^{\cdot-}$ resulting from this enzyme. Drugs were all purchased from Sigma (Sigma Aldrich Chemical, France) and dissolved in distilled water, except for apocynine, which was dissolved in DMSO 5%.

Frozen tissues samples, embedded in Tissue-Tek OCT compound, were cryosectionned at $10\mu\text{m}$, collected onto Superfrost plus slides (VWR, GB) and allowed to air-dry at room temperature. Slides were placed into PBS for 10 minutes at room temperature, incubated with 100mM L-Name, apocynine or allopurinol (PBS was used as control for inhibitors study) in a dark moist chamber at 37°C , during 30 minutes, and then stained with DHE $10\mu\text{M}$ (30 minutes, at 37°C , in a dark moist chamber). After extensive rinsing with PBS, slides were coverslipped and imaged in fluorescence using the NanoZoomer 2.0-HT with Fluorescence Illumination Optics (Hamamatsu Photonics, Japan). Scans were analyzed with ImageJ 1.46j software to evaluate the inhibition (in percent) of fluorescent signal when slides were incubated with inhibitors, compared to incubation in PBS.

2.4. Statistical analysis

Results were expressed as means \pm standard error of mean.

Diabetes-induced modifications of glycaemia and $\text{O}_2^{\cdot-}$ production were assessed using a Mann-Whitney test between the healthy and D groups. Effect of insulin therapy and/or endurance training on $\text{O}_2^{\cdot-}$ production was assessed using a one-way ANOVA test in the four diabetic groups. The Dunnett post-hoc test was used to specify the differences of each intervention protocol compared to control diabetic group (D), and then the Student Newman-Keuls post-hoc test served to determine which therapeutic management was more effective. Relative contribution of each $\text{O}_2^{\cdot-}$ production pathways (determined by the use of inhibitors), was study in each group, by a one-way ANOVA test for repeated measures completed by a Student Newman-Keuls post-hoc test.

$P < 0.05$ was considered significant.

3. Results and discussion

3.1. Diabetes-induced alterations

As expected, blood glucose level was higher in D-group compared to healthy controls (Figure 1). Hyperglycemia observed in D-group was correlated with total $O_2^{\cdot-}$ measurement by DHE staining in aorta in this group ($r=0.81$; $p<0.001$). This result confirms that hyperglycemia constitutes the main factor triggering OS, especially $O_2^{\cdot-}$ production, in type 1 diabetes. Hyperglycemic-induced $O_2^{\cdot-}$ overproduction has been considered as the unifying mechanism underlying diabetic complications (Brownlee, 2005). Concerning vascular function, the superoxide-induced $^{\circ}NO$ inactivation has been recognized as a key factor leading to diabetes-induced endothelial dysfunctions. Indeed, $O_2^{\cdot-}$ reacts then with $^{\circ}NO$, which in turn induces reduction of $^{\circ}NO$ bioavailability for endothelium-dependant vasorelaxation, and formation of highly toxic compound, ONOO-. In addition to effects mediated by scavenging $^{\circ}NO$, $O_2^{\cdot-}$ reduces eNOS expression and activity in endothelial cells (Peterson et al., 1999), and directly stimulates mitogenesis in vascular smooth muscle cells (Suh et al., 1999), promoting atherosclerotic lesions development. Numerous studies have focused on strategies to prevent or reduce diabetes-induced OS, especially $O_2^{\cdot-}$, but some clinical trials failed to provide adequate support for the use of antioxidant strategy in diabetes. According to Karasu et al. (2010) the use of systemic markers of cardiovascular risk (but not precise evaluation of oxidant balance) could explain this lack of conclusive results. Understanding the underlying mechanisms to antioxidant strategies (for example, the specific activated pathways of $O_2^{\cdot-}$ production) is required to better manage type 1 diabetes and associated cardiovascular dysfunctions.

Figure 2 illustrates the DHE fluorescence in the healthy and D groups, using PBS as basal DHE fluorescence (i.e. control value for each treatment). The decrease in fluorescence observed with inhibitors compared to PBS control values represent the importance of $O_2^{\cdot-}$ production by the corresponding enzyme (more fluorescence is decreased by inhibitor, more the corresponding enzyme is implicated in $O_2^{\cdot-}$ production).

Enzymatic endothelial sources of $O_2^{\cdot-}$ were not activated in healthy rats, as inhibition of NOX, NOS or XO didn't induce any decrease in fluorescent staining by DHE. On the contrary, in D-group, increase in $O_2^{\cdot-}$ production was associated with activation of the three enzymes. Indeed, compared to basal DHE fluorescence (incubation with PBS), DHE fluorescence was decreased for each inhibitor tested (Figure 3). Production of $O_2^{\cdot-}$ by eNOS (inhibited by L-Name) was higher than production by XO (inhibited by allopurinol) and NOX (inhibited by apocynin) ($41.6\pm3.5\%$ vs $25.2\pm1.8\%$ vs $27.5\pm1.3\%$, respectively; $p<0.001$) (Figure 2). Superoxide production by eNOS occurs when cofactors of eNOS are in insufficient amounts, leading to "uncoupling" state of eNOS. In diabetes, uncoupling of eNOS has been previously reported, and is mainly triggered by a first step : activation of NOX by hyperglycemia (Shen, 2010). Briefly, hyperglycemia induces Advanced Glycated Endproducts (AGE) formation and PKC pathway activation, the both stimulating NOX activity. Increased activity of NOX consumes NADPH, which is an essential cofactor for eNOS (Takechi and Yabe-Nishimura, 2008). Accordingly to Houston et al. (1999), our results showed

that XO contributes to $O_2^{\circ-}$ production in aorta of diabetic rats, despite mechanisms of its activation are still unknown.

3.2. Benefits of therapeutic management

3.2.1. Insulin therapy

Therapeutic management of diabetes is first of all constituted by insulin therapy, which is essential to avoid fatal outcome in non-treated diabetic patient. As shown in figure 1, efficiency of insulin treatment to improve glycemic control was attested by lower glycaemia in D-Ins group compared to D-group, despite blood glucose level was not normalized compared to healthy rats. This partial correction of hyperglycemia by insulin was associated with reduction of aortic $O_2^{\circ-}$ production, confirming a tight interrelation between high glucose level and OS balance in diabetes.

Insulin treatment decreased hyperglycemic-induced $O_2^{\circ-}$ production (Figure 2), Activation of the three enzymatic sources of $O_2^{\circ-}$ observed in diabetic vessels of D-group was indeed suppressed by insulin therapy (consistently with literature data showing that NOX and eNOS were activated by hyperglycemia). Interestingly, reduction of hyperglycemia by insulin treatment lead also to reduced activation of XO. If increased activity of XO has been shown in type 1 diabetes, underlying mechanisms of this stimulation in vessels remain to elucidate (Shen, 2010). Our results strongly suggest that hyperglycemia itself play an important role in activation of XO.

3.2.2. Endurance training protocol

Regular physical activity is now well integrated into therapeutic management of diabetic people, due to its multiple benefits. Endurance training has been shown to regulate more tightly the glycemia, to improve insulin therapy efficiency (Malardé et al.), and to enhance antioxidant defenses. All these beneficial effects decrease hyperglycemic-induced OS (Malardé et al.; Moien-Afshari et al., 2008), and consequently reduces endothelial dysfunctions (Moien-Afshari et al., 2008).

In our study, training alone reduced hyperglycemia, but in a lesser extent than insulin therapy (Figure 1). However, training succeed to decreased $O_2^{\circ-}$ production when compared to D group, in the same extent than insulin treatment (Figure 2). Among the three enzymatic sources of $O_2^{\circ-}$ activated by diabetes, only eNOS and XO were suppressed by training. Decrease of XO activity in response to training has been previously reported in aged rats with OS, but not in young rats without OS. Training seems to be efficient to reduce XO activity when XO activity is increased and associated with OS (Lambertucci et al., 2007). The decrease of $O_2^{\circ-}$ production by eNOS observed here probably result from improvement in coupling state of eNOS. Uncoupling of eNOS could result from cofactors oxydation induced by oxidative stress. We supposed that training, previously reported to decrease OS markers, limit eNOS uncoupling and associated $O_2^{\circ-}$ production (Malardé et al.). Surprisingly, production of $O_2^{\circ-}$ by NOX was not lowered by endurance training (Figure 2). Inactivation of this enzyme has been previously reported in response to endurance training (Adams et al., 2005; Rush et al., 2005) but no study has evaluated this parameter in type 1 diabetes. Activation of NOX in type 1 diabetes results from multiple alterations, especially AGE

formation and PKC activation pathways, themselves triggered by hyperglycemia. Our results suggest that inhibitory effect of endurance training on NOX is insufficient to counterbalance the activation induced by hyperglycemia, despite hyperglycemia was partially corrected by training. Together with the data in the D-Ins group (reduction of NOX-induced O_2° production consequently to hyperglycemia correction), it highlights that hyperglycemia is the key factor responsible for NOX activation in type 1 diabetes.

3.2.2. Combination of insulin therapy and endurance training protocol

Association of endurance training with insulin therapy reduced less blood glucose level than insulin therapy alone, but the hyperglycemic-induced O_2° overproduction decreased in the same extent for all intervention protocols. As for insulin therapy alone, activation of the three enzymatic sources of O_2° observed in diabetic vessels of D-group was suppressed by insulin combined with endurance training. We hypothesized that training could exert beneficial effects by directly inhibiting enzymes activity, independently of glycemetic regulation

4. Conclusion

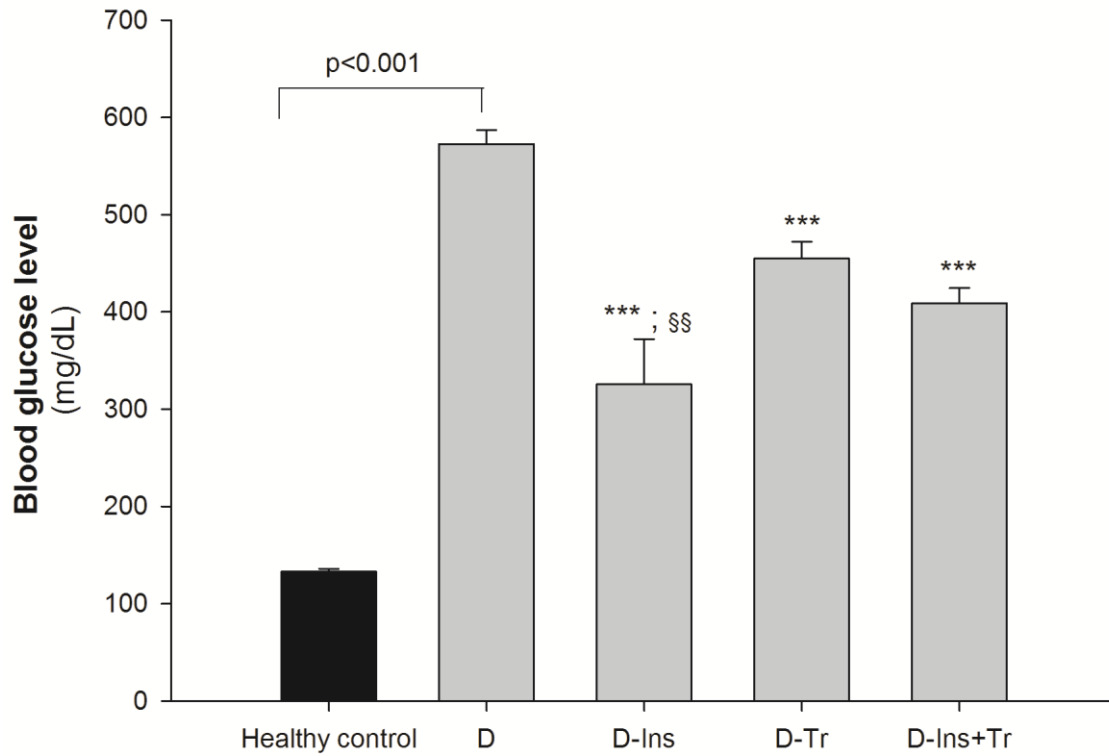
Our results demonstrated that the key factor responsible for O_2° overproduction that we observed in type 1 diabetes is hyperglycemia, which activates the three principal enzymatic vascular sources of O_2° : NOX, uncoupling eNOS and XO. Insulin therapy was the most efficient treatment to decrease hyperglycemia, which in turn lowered O_2° overproduction, by suppressing the activation of NOX, eNOS and XO. Endurance training showed the same beneficial effects on O_2° overproduction than insulin therapy, despite a lower effect on glycemetic regulation, demonstrating specific effects of training. Nevertheless, we didn't show the expected additive effects of both therapeutic strategies. Further studies are needed to elucidate how better associate endurance training to insulin therapy, in order to improve therapeutic management of type 1 diabetes subject.

5.References

- [1] De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 2000;130:963-74
- [2] Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007;87:315-424
- [3] Chang KC, Chung SY, Chong WS, Suh JS, Kim SH, Noh HK, et al. Possible superoxide radical-induced alteration of vascular reactivity in aortas from streptozotocin-treated rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;266:992-1000
- [4] Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res* 2000;86:E85-90
- [5] Liu S, Ma X, Gong M, Shi L, Lincoln T, Wang S. Glucose down-regulation of cGMP-dependent protein kinase I expression in vascular smooth muscle cells involves NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2007;42:852-63
- [6] Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002;105:1656-62
- [7] Dikalova AE, Gongora MC, Harrison DG, Lambeth JD, Dikalov S, Griendling KK. Upregulation of Nox1 in vascular smooth muscle leads to impaired endothelium-dependent relaxation via eNOS uncoupling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299:H673-9
- [8] Matsumoto S, Koshiishi I, Inoguchi T, Nawata H, Utsumi H. Confirmation of superoxide generation via xanthine oxidase in streptozotocin-induced diabetic mice. *Free Radic Res* 2003;37:767-72
- [9] Houston M, Estevez A, Chumley P, Aslan M, Marklund S, Parks DA, et al. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *J Biol Chem* 1999;274:4985-94
- [10] Wiernsperger NF. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metab* 2003;29:579-85
- [11] Karasu C, Altan VM. The role of endothelial cells on the alterations in vascular reactivity induced by insulin-dependent diabetes mellitus: effects of insulin treatment. *Gen Pharmacol* 1993;24:743-55
- [12] Adams V, Linke A, Krankel N, Erbs S, Gielen S, Mobius-Winkler S, et al. Impact of regular physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2005;111:555-62
- [13] Moien-Afshari F, Ghosh S, Elmi S, Rahman MM, Sallam N, Khazaei M, et al. Exercise restores endothelial function independently of weight loss or hyperglycaemic status in db/db mice. *Diabetologia* 2008;51:1327-37
- [14] Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001;50:537-46
- [15] Le Douairon Lahaye S, Rebillard A, Zguira MS, Malarde L, Saiag B, Gratas-Delamarche A, et al. Effects of exercise training combined with insulin treatment on cardiac NOS1 signaling pathways in type 1 diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 2011;347:53-62
- [16] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005;54:1615-25
- [17] Peterson TE, Poppa V, Ueba H, Wu A, Yan C, Berk BC. Opposing effects of reactive oxygen species and cholesterol on endothelial nitric oxide synthase and endothelial cell caveolae. *Circ Res* 1999;85:29-37
- [18] Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, et al. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 1999;401:79-82
- [19] Karasu C. Glycooxidative stress and cardiovascular complications in experimentally-induced diabetes: effects of antioxidant treatment. *Open Cardiovasc Med J* 2010;4:240-56
- [20] Shen GX. Oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders: roles of mitochondria and NADPH oxidase. *Can J Physiol Pharmacol* 2010;88:241-8
- [21] Takehi T, Yabe-Nishimura C. NOX enzymes and diabetic complications. *Semin Immunopathol* 2008;30:301-14

- [22] Malardé L, Gratas-Delamarche A, Le Douairon-Lahaye S, Zguira M, Vincent S, Lemoine-Morel S, et al. Endurance training and insulin therapy need to be associated to fully exert their respective beneficial effects on oxidant stress and glycemic regulation in diabetic rats. Soumis à *Diabetes & Metabolism*
- [23] Lambertucci RH, Levada-Pires AC, Rossoni LV, Curi R, Pithon-Curi TC. Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels in soleus muscle from young and aged rats. *Mech Ageing Dev* 2007;128:267-75
- [24] Rush JW, Denniss SG, Graham DA. Vascular nitric oxide and oxidative stress: determinants of endothelial adaptations to cardiovascular disease and to physical activity. *Can J Appl Physiol* 2005;30:442-74

Figure 1: Diabetes-induced hyperglycaemia, and effects of insulin therapy and/or endurance training on blood glucose level in streptozotocin-induced diabetic rats

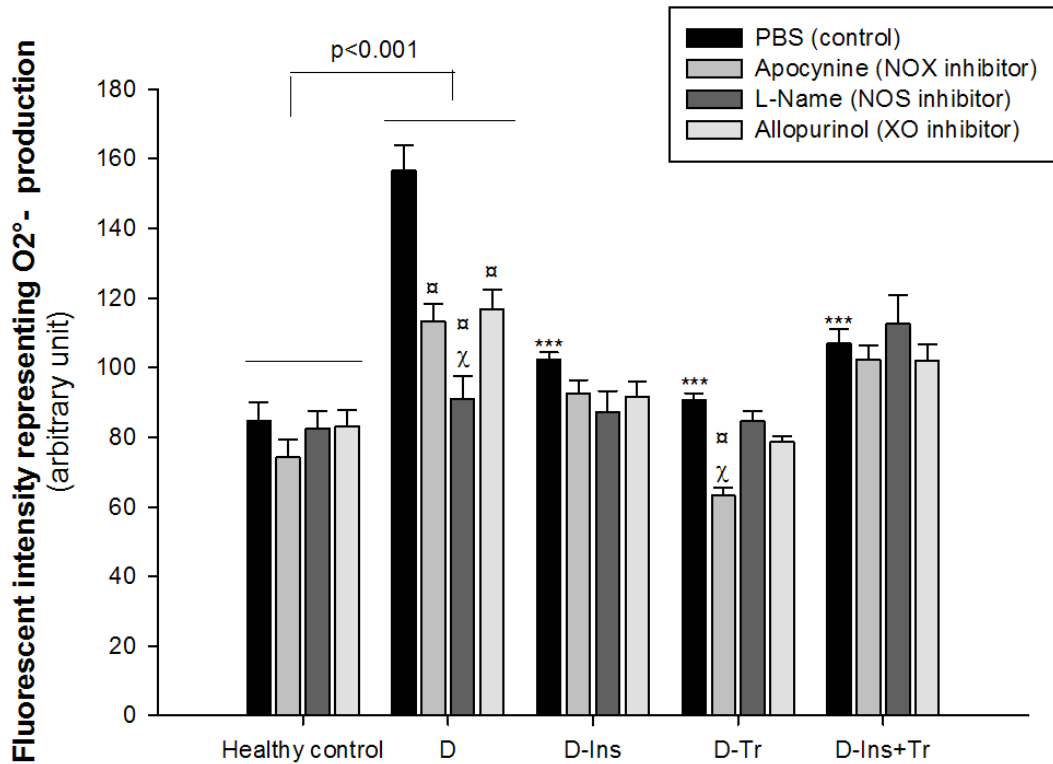


Values are expressed as mean \pm SEM.

***: significant difference vs. the D group ($p < 0.001$)

§§: significant difference vs. the D-Tr and D-Ins+Tr groups ($p < 0.01$)

Figure 2: Effects of insulin therapy and/or endurance training on $O_2^{\cdot-}$ production, evaluated by fluorescent DHE staining, in aorta of streptozotocin-induced diabetic rats



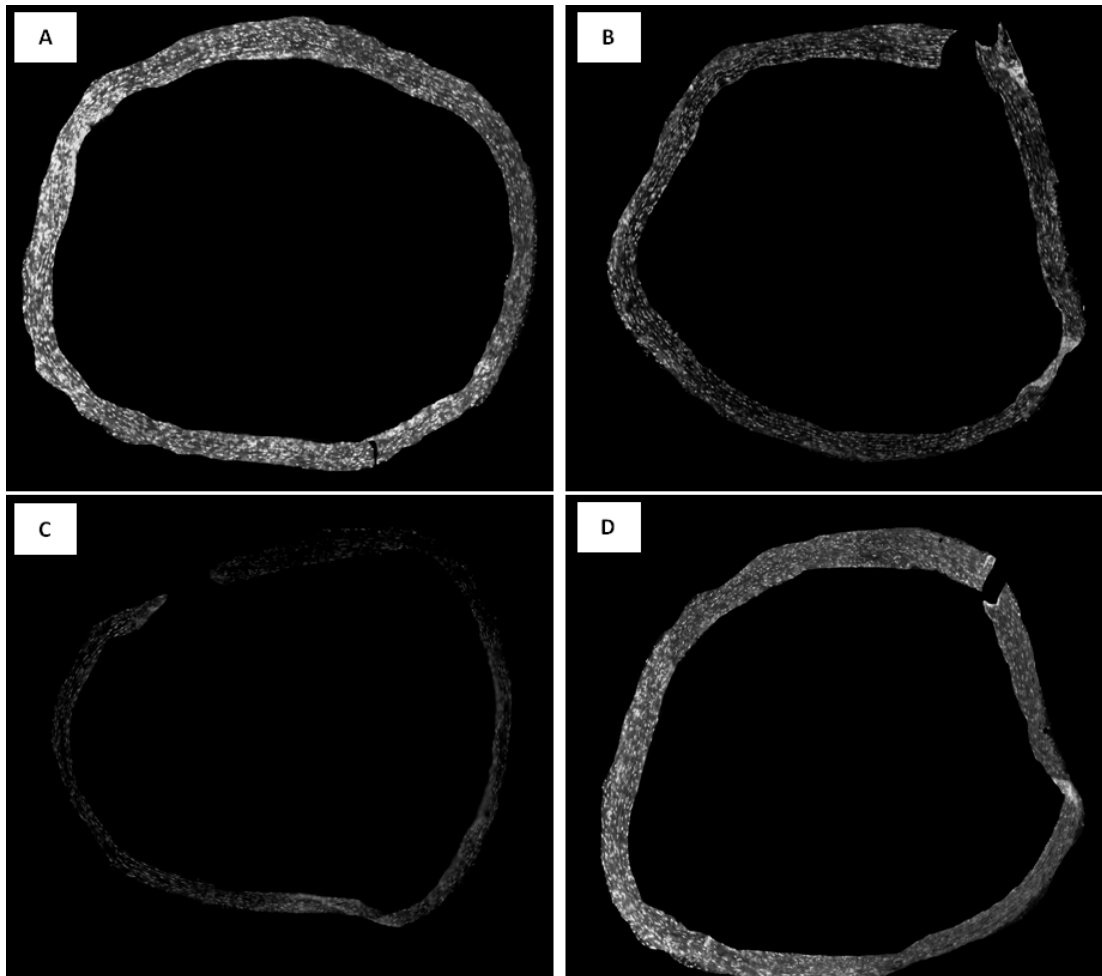
Values are expressed as mean \pm SEM for 5 experiments in each group.

***: significant difference of $O_2^{\cdot-}$ production (represented by intensity of DHE fluorescence) compared to the D group ($p < 0.001$)

□ : significant decrease of fluorescence compared to PBS control values in the same group

γ : significant decrease of fluorescence compared to other inhibitors in the same group

The decrease observed with each inhibitor compared to PBS control values in the same group represent the amount of $O_2^{\cdot-}$ production by the corresponding enzyme

Figure 3 : In situ detection of superoxide by DHE fluorescence in streptozotocin-induced diabetic rats

Aortic rings were incubated 30 min at 37°C with PBS (A) or various inhibitors (B: apocynine; C: L-Name; D: allopurinol) before being stained with DHE (30 min, at 37°C, in a dark moist chamber), and imaged in fluorescence with the NanoZoomer 2.0-HT scanner.

Fluorescent intensity is represented in bar charts of figure 2 (D-group).

Etude 5 : Evaluation de la glycation de la CuZn-SOD chez le rat diabétique : mise au point d'une technique par chromatographie d'affinité et western blot

INTRODUCTION

La prise en charge thérapeutique du diabète de type 1 est avant tout basée sur l'insulinothérapie, qui permet d'éviter l'issue fatale de la pathologie en l'absence de traitement. Néanmoins, diverses complications, notamment cardiovasculaires, vont à long terme se développer, entraînant une diminution de la qualité et de l'espérance de vie. Le stress oxydant (SO) induit par l'hyperglycémie, et plus particulièrement la production d'anion superoxyde par la mitochondrie, est considéré comme le phénomène central à l'origine de ces complications (Brownlee, 2005). Les épisodes récurrents d'hyperglycémie déclenchent, en effet, différents mécanismes (autoxydation du glucose, formation des AGE et fixation sur leurs récepteurs spécifiques, voie des polyols) engendrant à la fois une augmentation de la production d'espèces oxydantes et une altération du système antioxydant (Brownlee, 2001).

Chez le sujet sain, la présence d'un SO est associée à une "up-régulation" de l'expression et du contenu en enzymes antioxydantes, permettant à l'organisme de s'adapter face à ce SO (Kullik and Storz, 1994). Mais dans le cadre du diabète, une absence d'adaptation, voire une diminution, de l'activité enzymatique antioxydante a été rapportée (Wohaieb and Godin, 1987; Szaleczky et al., 1999; Mahesh and Menon, 2004).

La SOD présente ici un intérêt tout particulier, puisque son rôle est d'accélérer la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène, ce dernier étant alors neutralisé par la GPX et la CAT. Elle est donc en première ligne pour lutter contre la production accrue d'anion superoxyde dans le diabète. Mais la persistance d'épisodes hyperglycémiques (même chez un sujet bien traité à l'insuline) induit le phénomène de glycation : la fonction aldéhyde d'un ose se fixe par liaison covalente sur une fonction amine libre et accessible d'une protéine, cette dernière subissant alors un réarrangement conformationnel. La principale conséquence de cette réaction lorsqu'elle touche une enzyme est la perte d'activité de celle-ci, notamment lorsque les liaisons additionnelles se situent à proximité du site actif. Ainsi, les sites de liaisons covalentes de la CuZn-SOD ont été notamment identifiés au niveau des résidus lysine 122 et 128, c'est-à-dire à proximité de son site actif (Arai et al., 1987). La glycation de cette enzyme a été bien démontrée *in vitro* et *in vivo*, que ce soit par le glucose ou par des produits eux-mêmes dérivés de la glycation (méthylglyoxal) (Kang, 2003). La proportion de SOD glyquée se situe physiologiquement aux environs de 10%, alors que chez des sujets diabétiques, elle a été évaluée à 40% (Kawamura et al., 1992). Il s'agit donc d'un élément central dans le développement des complications diabétiques, puisque, la SOD étant moins active, l'anion superoxyde va pouvoir déclencher les différents mécanismes à l'origine des complications. C'est également un élément mécanistique important à prendre en compte dans la compréhension des adaptations face au diabète : nous n'avons, par exemple, pas mis en évidence de différences dans l'activité de la SOD entre des rats sains et diabétiques. Or, ceci pourrait résulter de

phénomènes opposés mis en jeu simultanément : une augmentation de l'expression de la SOD en réaction au SO, masquée par une augmentation concomitante de la glycation. Les diverses prises en charge du diabète (insuline et/ou entraînement en endurance) pourraient agir sur l'un ou l'autre (ou les deux) de ces mécanismes : il est probable que l'insuline, en améliorant la régulation de la glycémie, diminue la glycation, alors que l'entraînement participe à "l'up-régulation" de l'expression et du contenu des enzymes antioxydantes. L'association de ces deux prises en charge aurait donc un effet additif, en agissant par des mécanismes différents. Mais pour discriminer ces mécanismes d'action, il est nécessaire d'évaluer à la fois le contenu enzymatique total, ainsi que la fraction glyquée et celle non-glyquée. En effet, une augmentation de contenu ne sera efficace dans la lutte contre le SO que si la fraction non-glyquée augmente également⁷³.

Malgré l'importance de ce mécanisme dans la prise en charge du diabète, la glycation des enzymes antioxydantes n'a que très rarement été étudiée. Cette constatation surprenante s'explique par les difficultés méthodologiques de cette analyse. Deux techniques ont été utilisées à ce jour : l'utilisation d'anticorps spécifiques du résidu de glycation de la protéine d'intérêt, ou la séparation préalable des fractions glyquées/non-glyquées sur colonne d'immunoaffinité puis l'analyse de leur contenu, par Western Blot ou Elisa en utilisant un anticorps dirigé contre la forme totale de la CuZn-SOD. Ces deux techniques se heurtent à deux problèmes majeurs en routine: les anticorps spécifiques qui ont été développés ne sont pas disponibles commercialement, et la seule équipe les ayant développés ne travaille plus aujourd'hui sur ce sujet ; et les colonnes d'immunoaffinité utilisées pour la séparation des deux fractions ne sont plus commercialisées. C'est pourquoi l'objectif de cette étude est de mettre au point une technique d'analyse robuste de la glycation de la SOD, permettant ensuite de comprendre comment différentes prises en charge du diabète (insuline et/ou entraînement en endurance) vont influencer ce mécanisme fondamental.

MATERIELS ET METHODES

L'organisation des groupes et le déroulement du protocole sont identiques à ceux présentés dans l'étude 3, et sont schématisés sur les figures 1 et 2. A l'issue de l'expérimentation, les muscles sont prélevés, rapidement congelés dans l'azote liquide, puis conservés à -80°C. Ils sont broyés à l'aide d'un pilon dans un mortier refroidi par de l'azote liquide. La poudre obtenue est reprise au 1/10^{ème} dans un tampon de lyse (Tris HCl 200mM, NaCl 20mM, 0,5% Triton X-100, pH 7,4). L'échantillon est ensuite soniqué 60 secondes sur glace, puis le surnageant est récupéré après centrifugation (13 min à 1500g à 4°C). Le surnageant est utilisé pour les analyses ultérieures : d'une part, mesure du contenu enzymatique total par Western Blot, et d'autre part, séparation des deux fractions glyquées et non-glyquées puis mesure du contenu enzymatique dans chacune de ces fractions.

⁷³ Si la proportion de SOD glyquée augmente en même temps que le contenu total, l'activité enzymatique ne sera pas augmentée, malgré un contenu total plus élevé.

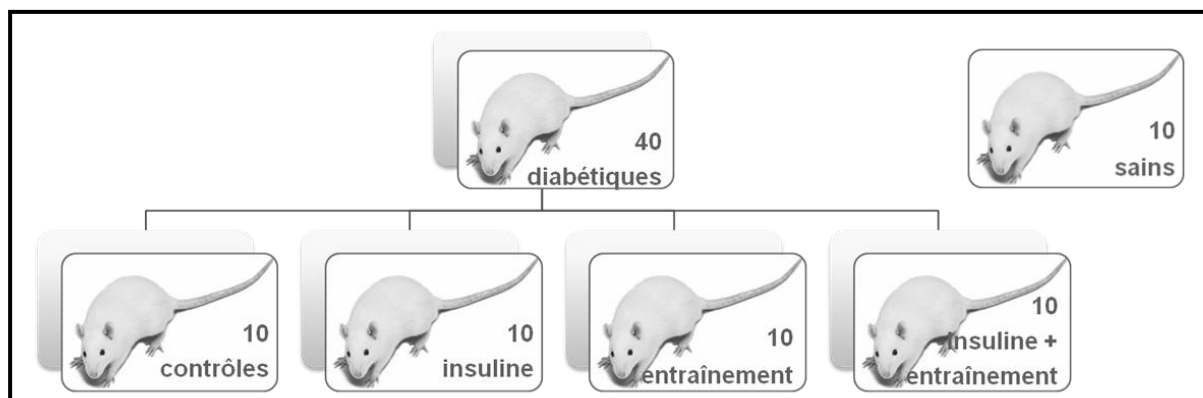


Figure 37 · Répartition des animaux dans les différents groupes

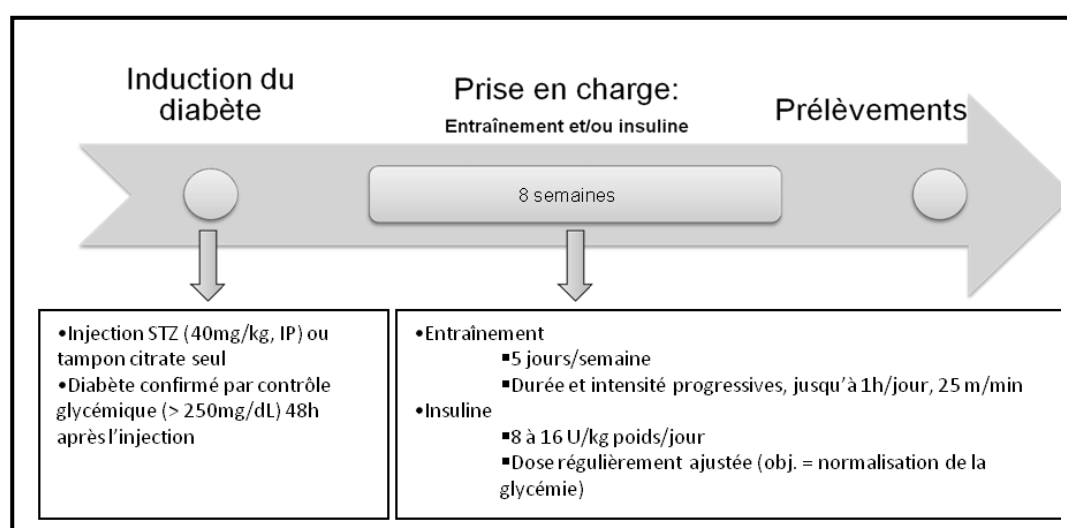


Figure 38 : Déroulement du protocole

La détermination de la concentration en protéines des échantillons a été réalisée par dosage colorimétrique à l'aide d'un spectrophotomètre (Lecteur Microplaque 3 en 1, Biotek Synergy HT, US), selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976), à l'aide du kit Quick Start Bradford Protein Assay.

Quantification de la CuZn-SOD par Western Blot

Une analyse par Western Blot a été utilisée pour déterminer le contenu en CuZn-SOD dans les muscles soléaires (sur homogénat total, fraction glyquée et fraction non-glyquée). Après détermination de la concentration en protéines dans les homogénats de muscles, un volume correspondant à 50µg de protéines dans chaque échantillon est déposé sur un gel de SDS-polyacrylamide à 12,5%. Les échantillons sont alors séparés par électrophorèse en fonction de leur poids moléculaire. Un même échantillon est déposé sur tous les gels afin de normaliser par la suite les résultats obtenus des différents gels. Les protéines d'intérêt sont ensuite transférées sur une membrane en PVDF (Millipore, France) durant 1h30 à 4°C, à 100 Volts. L'efficacité du transfert est vérifiée par un bref marquage de la membrane avec une

solution de rouge Ponceau. Après lavage des membranes dans du tampon Tris/Tween 20 (0,1% TTBS), les sites non-spécifiques sont bloqués par incubation de la membrane durant 1 heure, à température ambiante, dans une solution de TTBS-BSA 5%. La membrane est ensuite lavée puis incubée pendant toute la nuit avec un anticorps souris anti-CuZn-SOD (Superoxyde Dismutase 1, Antibody, NovusBio, France) dilué à 1/5000ème. Après trois lavages, la membrane est incubée durant 1 heure avec un anticorps secondaire fluorescent (infrared-labeled secondary goat anti-mouse IRDye 800 antibodies, LI-COR Biosciences, Etats-Unis). Les complexes anticorps primaires/secondaires sont détectés par le système d'imagerie infrarouge Odyssey (LI-COR Biosciences, Etats-Unis). Les images sont ensuite traitées avec le logiciel Image Gauge 4.0 (Science Lab 2001, Fujifilm, Japon) pour obtenir l'intensité du signal. Les résultats sont normalisés par le signal de la protéine chaperonne constitutive HSC70, et exprimés en pourcentage de la valeur des contrôles.

Séparation des fractions glyquées/non-glyquées

La technique de mise au point consiste à séparer l'homogénat total en deux fractions (glyquée/non-glyquée) par passage sur une colonne, selon le principe de la chromatographie d'affinité. Les colonnes de type GlycoGel-B (Fisher Science), qui permettaient cette séparation, n'étant plus commercialisées, des colonnes reprenant ce principe de fonctionnement ont été élaborées au sein du laboratoire. La phase stationnaire de la colonne est constituée d'acide boronique emprisonné dans un gel de polyacrylamide. L'acide boronique (ou m-aminophénylboronate) présente la caractéristique de se lier aux groupements cis-diol présents sur les produits de glycation, en formant un complexe aromatique (figure 3). Cette liaison est ensuite rompue par adjonction de sorbitol ou diminution du pH. Après rinçage de la colonne avec le tampon de liaison (tampon A: Acétate d'ammonium 250mM; Magnésium chlorure 50mM; Azide de sodium 3mM; pH 8,8), les colonnes sont donc remplies de gel d'acide boronique à 50%, le volume de gel (1 ou 2mL, soit 0,5 ou 1mL d'acide boronique) étant ajusté selon le rendement de la technique, pour assurer une séparation totale des deux fractions. L'ensemble des produits (tampons et gel) est soigneusement dégazé pour éviter la formation de bulles dans la colonne, ce qui gênerait, voire empêcherait, la progression de la phase mobile (l'échantillon).

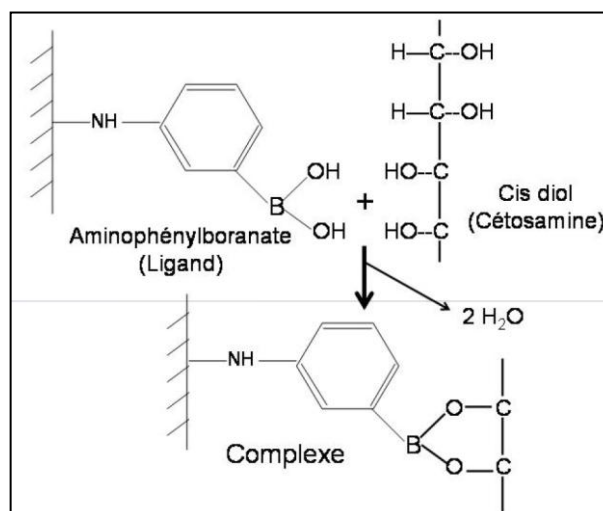


Figure 39 : Liaison de l'acide boronique (aminophénylboronate) fixé sur la colonne au groupement cis-diol d'une protéine glyquée, par formation d'un complexe aromatique

En pratique, l'échantillon dilué dans le tampon de liaison (tampon A) est injecté dans la colonne. Les caractéristiques de l'échantillon à injecter (volume, quantité de protéines) sont déterminées selon le rendement de l'extraction, afin d'obtenir une quantité de protéines suffisante dans l'éluat pour une analyse ultérieure par Western Blot. L'échantillon progresse dans la colonne par gravité, et les produits de glycation se lient à l'acide boronique. La fraction non liée de l'échantillon (i.e. exempte de produits de glycation) est éluée par le tampon de liaison (fraction non-glyquée NG). L'éluat est recueilli tout au long de l'expérimentation par aliquots de 100µL, afin de déterminer le plus précisément possible l'évolution de la concentration en protéines dans l'éluat. Celle-ci est mesurée par Bradford dans chaque aliquot, au fur et à mesure de l'éluat, ce qui permet d'obtenir une cinétique d'éluat des protéines. Lorsque l'éluat ne contient plus de protéines, les complexes acide boronique/protéines glyquées sont dissociés par adjonction de sorbitol 200mM ou HCl 25mM dans le tampon A. L'éluat (fraction B) est recueilli et analysé de la même manière que pour la première fraction.

Les différents aliquots de chaque fraction sont ensuite poolés pour constituer deux échantillons, contenant respectivement toutes les protéines non-glyquées (fraction NG) et toutes les protéines glyquées (fraction G). Les deux fractions sont alors analysées par la technique du Western Blot pour déterminer la quantité de CuZn-SOD dans chacune : le niveau de SOD mesuré dans la fraction NG correspond à la SOD non-glyquée, alors que celui mesuré dans la fraction G correspond à la SOD glyquée.

Les tests de mise au point ont été réalisés à partir d'échantillons provenant d'animaux diabétiques non traités, afin de garantir le niveau de glycation le plus facilement détectable.

RESULTATS

1. Analyse du contenu total en CuZn-SOD par Western Blot

L'effet du diabète et des différentes prises charge par l'insuline et/ou l'entraînement est présenté sur les figures 4 et 5, respectivement. Aucune différence n'est constatée, quel que soit le statut des animaux : diabétiques vs sains (pour l'effet du diabète) et animaux diabétiques non traités vs animaux diabétiques traités (effets des différentes prises charge).

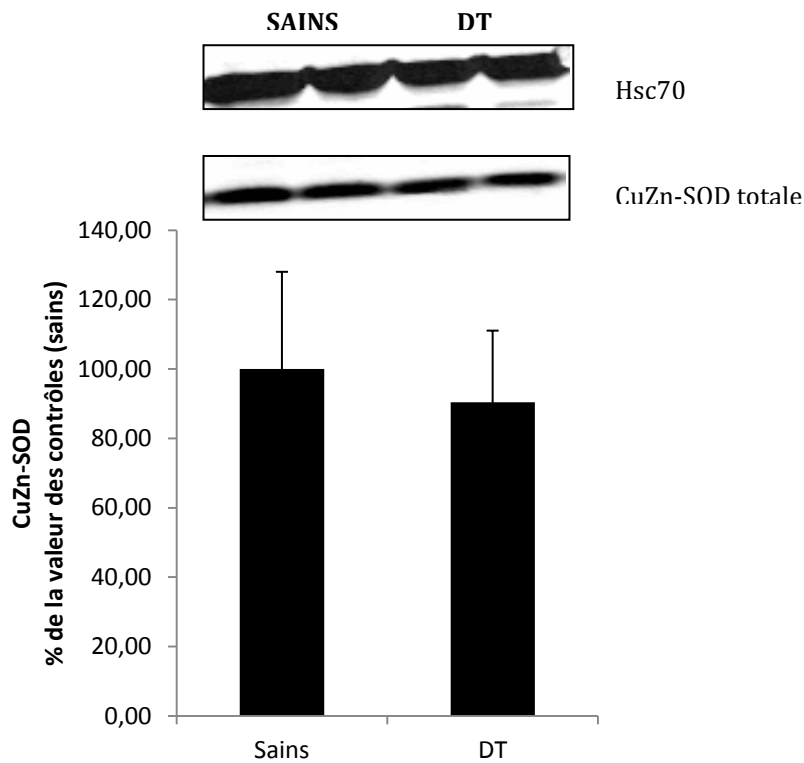


Figure 4 : effet du diabète sur le contenu en CuZn-SOD, évalué par Western Blot, dans le muscle soléaire. Les valeurs sont exprimées en pourcentage des contrôles (rats sains).

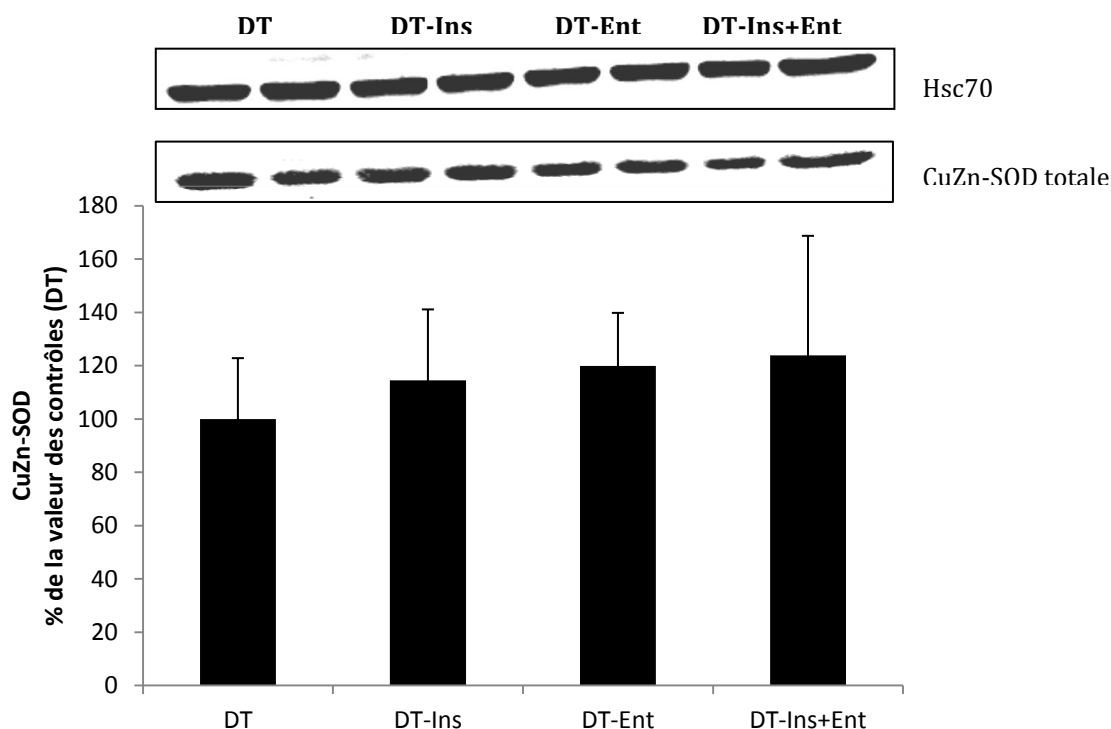


Figure 5 : effet du traitement à l'insuline et/ou de l'entraînement en endurance sur le contenu en CuZn-SOD, évalué par Western Blot, dans le muscle soléaire de rats diabétiques. Les valeurs sont exprimées en pourcentage des contrôles (rats diabétiques).

- Mise au point de la séparation des fractions glyquées/non-glyquées sur colonne par chromatographie d'immunoaffinité

La cinétique d'éluion des protéines est présentée sur la figure 6. Le passage du tampon de liaison A au tampon d'éluion B est indiqué par une flèche grisée. Le premier pic observé correspond à l'éluion des protéines non-glyquées, alors que le second pic, environ 10 fois plus petit, correspond à l'éluion des protéines glyquées. Cette cinétique d'éluion des protéines a été réalisée avec un volume de gel d'acide boronique de 1mL (soit 100 μ mol de boronate), 100 μ L d'échantillon injectés, et un tampon B d'éluion contenant du sorbitol 200mM. La concentration initiale de protéines dans l'échantillon était de 1,90 mg/mL. Ces conditions sont considérées comme les conditions standards.

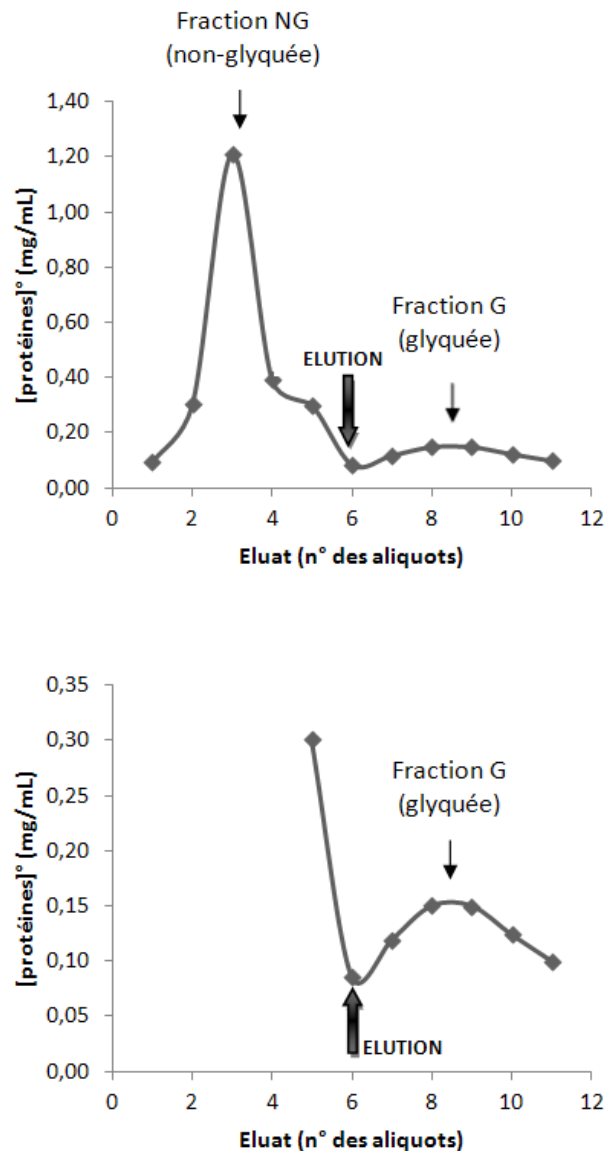


Figure 6 : cinétique d'éluion des protéines séparées par immunoaffinité selon qu'elles soient glyquées ou non (A). Zoom sur l'éluion de la fraction glyquée (B).

Colonne préparée avec 1mL de gel d'acide boronique 50%, Le recueil de l'éluat démarre simultanément à l'injection de l'échantillon (100µL). La fraction G est éluée par un tampon d'éluion sorbitol 200mM.

La figure 7 représente l'éluion du même échantillon, dans les mêmes conditions, lorsqu'un volume de 200µL d'échantillon est injecté. Comparé à l'éluion lorsque seulement 100µL sont injectés, le pic correspondant à la fraction non-glyquée est plus important, et plus étalé. L'éluion de la fraction glyquée démarre plus tardivement, à partir de l'aliquot n°9, alors que le tampon B est injecté dès l'aliquot n°6 dans le premier cas. Toutefois, le pic de la fraction glyquée n'est pas modifié.

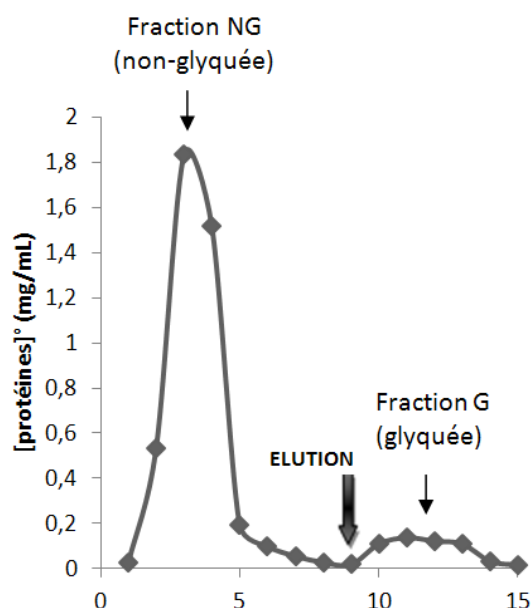


Figure 7 : cinétique d'éluion des protéines séparées par immunoaffinité selon qu'elles soient glyquées ou non (A).

Colonne préparée avec 1 mL de gel d'acide boronique 50%, Le recueil de l'éluat démarre simultanément à l'injection de l'échantillon (200µL). La fraction G est éluée par un tampon d'éluion sorbitol 200 mM.

L'expérimentation a également été reproduite avec un tampon B d'éluion contenant du HCl 25mM, selon les conditions standards (1mL de gel d'acide boronique 50% et 100µL d'échantillon injectés). La cinétique d'éluion ne présente pas de différences avec celle réalisée lorsque le tampon B contient du sorbitol.

Les différents résultats présentés ci-dessus sont similaires lorsque la colonne est préparée avec 2mL de gel d'acide boronique 50% (soit 200µmol d'acide boronique).

Enfin, il a été vérifié l'absence d'interférence des différents tampons dans le dosage des protéines : les gammes de concentration en protéines sont identiques dans l'eau, le tampon A, le tampon B Sorbitol ou HCl, selon la technique de Bradford et de Lowry.

DISCUSSION

Le contenu total en CuZn-SOD, paramètre souvent évalué dans la littérature (Sindhu et al., 2004), n'est ici pas modifié par le diabète ni par les différentes prises en charge de ce dernier. Il semble donc que chez les rats diabétiques, contrairement au sujet sain, l'entraînement ne soit pas associé à une up-régulation de la SOD. Concernant le traitement à l'insuline, il ne permet pas non plus d'augmenter le contenu en CuZn-SOD, alors que nous avons démontré dans notre étude 3 que le traitement à l'insuline, associé ou non à l'entraînement, s'accompagnait d'une amélioration du système antioxydant (augmentation de l'activité de

la SOD). Cette divergence (augmentation d'activité de la SOD sans amélioration concomitante de son contenu), montre que l'évaluation du contenu total en CuZn-SOD ne constitue pas une analyse pertinente dans le cadre du diabète, car elle ne permet pas de différencier les fractions glyquées/non-glyquées. En effet, la glycation (i.e. la fixation du résidu osidique sur la protéine) n'entraîne pas de modifications significatives du poids moléculaire de la protéine. L'analyse du contenu protéique par la technique de western blot donne donc une indication sur le contenu total en protéines d'intérêts, sans distinction entre la forme glyquée ou non-glyquée. Or, dans le cas de la CuZn-SOD, il est bien démontré que la glycation entraîne une perte de son activité enzymatique (Arai et al., 1987; Kang, 2003). Aucun lien ne peut donc être établi entre le contenu protéique et l'activité de l'enzyme, empêchant de comprendre les mécanismes sous-jacents aux adaptations observées (ou à l'absence d'adaptations). En effet, l'insuline peut par exemple diminuer la proportion de SOD glyquée, permettant une augmentation de l'activité enzymatique antioxydante, sans modification du contenu total.

Etre en mesure de déterminer le contenu en CuZn-SOD active (non-glyquée) et inactive (glyquée) est donc une étape nécessaire pour explorer les mécanismes adaptatifs, face au diabète d'une part, puis en réponse aux différentes prises en charge, d'autre part. Toutefois, la mise au point de cette analyse présente de nombreuses difficultés méthodologiques, expliquant sa faible utilisation dans la littérature. La principale difficulté est la faible quantité de protéines contenue dans les éluats respectifs (NG/G) ; cette quantité est insuffisante, que ce soit pour doser les protéines de façon suffisamment sensible, ou pour réaliser une analyse du contenu protéique par Western Blot. En effet, la cinétique d'éluion observée avec les conditions de références (1mL de gel d'acide boronique 50%, 100µL d'échantillon, tampon B d'éluion au sorbitol 200mM) met bien évidence la présence de deux pics, le premier correspondant aux protéines non-glyquées de l'échantillon, le second aux protéines glyquées éluées par le tampon sorbitol. Toutefois, si la concentration en protéines du premier pic est convenable (1,2mg/mL), le second pic est environ 10 fois moins élevé (0,13 mg/mL). Bien que cette différence soit conforme au niveau de protéines glyquées rapporté dans la littérature chez les diabétiques, la faible quantité de protéines dans la fraction glyquée ne permet pas son analyse par Western Blot, analyse qui nécessite le dépôt de 50µg de protéines par puit. Si l'on considère uniquement l'aliquot le plus concentré, cela correspondrait, après dilution de l'échantillon dans le tampon de dépôt, à un volume de dépôt de plus de 500µL. Or, il est techniquement impossible de déposer un tel volume, même dans les système de grands gels. De plus, tous les aliquots de chaque fraction sont poolés, pour que le Western Blot prenne en compte l'ensemble des protéines éluées dans chaque fraction. Les autres aliquots étant moins concentrés que "l'aliquot-pic", cela diminue la concentration globale de protéines dans l'échantillon à analyser par Western.

Pour tenter d'augmenter la concentration en protéines dans la seconde fraction, le protocole de séparation a donc été répété en augmentant le volume d'échantillon injecté de 100 à 200µL, ce qui revient à injecter deux fois plus de protéines. Le premier pic (correspondant aux protéines non-glyquées) est effectivement plus élevé lorsque l'on augmente le volume d'injection (1,20mg/mL pour 100µL injectés vs 1,80mg/mL pour 200µL). Il est également plus étalé dans le temps, ce qui souligne l'importance de la

mesure immédiate de la quantité de protéines dans chaque aliquot. Cela permet d'ajuster le démarrage de l'élution de la fraction glyquée (injection du tampon B d'élution), en s'assurant que toutes les protéines non-glyquées ont bien été éluées. Par contre, le second pic (correspondant aux protéines glyquées) ne varie pas quelle que soit la quantité d'échantillon injecté. Il est toutefois difficile de conclure sur l'effet réel du volume d'échantillon injecté, car dans le cas présent, la concentration en protéines est dans la fourchette basse de l'intervalle de dosage par la méthode de Bradford (le dosage est linéaire pour des concentrations de 0 à 2 mg/mL, et la concentration des échantillons est aux environs de 0,12 à 0,13mg/mL). Il est donc difficile de mettre en évidence une variation de faible amplitude, alors que la valeur se situe déjà dans les limites basses de sensibilité du dosage.

Des alternatives ont donc été envisagées pour obtenir, dans la seconde fraction, une concentration en protéines suffisantes pour réaliser un Western Blot : concentrer les éluats après avoir poolés les différents aliquots, ou concentrer l'échantillon avant injection. La concentration a été réalisée par évaporation à sec au Speed-Vac, puis reprise dans un faible volume du tampon adéquat. Aucune de ces deux techniques n'a pour l'heure permis d'obtenir une concentration protéique suffisante, à l'issue de la séparation sur colonnes, pour réaliser un Western Blot sur les deux fractions. Les échantillons des autres groupes (sains, DT-Ins, DT-Ent, DT-Ins+Ent) n'ont donc pas été soumis à la séparation sur colonne, leur taux de protéines glyquées étant encore inférieur.

L'utilisation d'un tampon d'élution contenant du HCl 25mM à la place du sorbitol 200mM n'ayant pas démontré une efficacité supérieure pour l'élution des protéines glyquées, la solution du tampon sorbitol a été conservé. De même, un volume de 1mL de gel d'acide boronique à 50% semble suffisant, puisque l'élution ne diffère pas lorsque les colonnes sont préparées avec 2mL de gel. Il conviendrait toutefois, pour s'assurer qu'il n'existe pas de phénomène de saturation dans la fixation des protéines glyquées à la colonne, de repasser une fraction non-glyquée une seconde fois sur la colonne. Une séparation efficace lors du premier passage se traduira par l'absence de protéines glyquées, lors du second passage de la fraction non-glyquée. Dans le cas contraire, cela signifierait que des protéines glyquées ont été éluées dans la première fraction (fraction non-glyquée), sans se fixer à la colonne. Cette vérification ne sera possible que lorsque la concentration de la fraction glyquée sera plus conséquente, car dans les conditions actuelles, des traces de protéines glyquées lors du second passage sur la colonne ne seraient pas détectables.

Enfin, l'évaluation de la reproductibilité de la technique reste encore à déterminer, lorsqu'un protocole fonctionnel et optimal sera établi. Il s'agit notamment de déterminer le nombre d'utilisation de chaque colonne sans diminution de la fraction glyquée, puisque l'un des avantages de ce système est d'être réutilisable. En effet, la fixation de notre fraction d'intérêt (fraction glyquée) se faisant par liaison covalente, sa rupture lors de l'élution laisse le site de liaison à nouveau disponible, permettant de réutiliser la colonne. Mais cette régénération n'est bien sûr jamais parfaite, et nécessite donc de connaître le nombre d'utilisation de la colonne sans perte de signal.

CONCLUSION

Pour conclure, l'analyse du contenu total en CuZn-SOD ne permet pas, dans le cadre du diabète, de comprendre pleinement les adaptations du système antioxydant (ou leur absence) face à la maladie et à ces prises en charge. L'évaluation du contenu glyqué et non-glyqué est un paramètre indispensable pour progresser dans la compréhension des mécanismes mis en jeu. Toutefois, la mise au point d'une technique d'analyse fiable, applicable de façon autonome, constitue un challenge méthodologique. La séparation des fractions glyquées/non-glyquées dans les échantillons étant aujourd'hui fonctionnelle, plusieurs pistes sont à présent à l'étude pour concentrer les protéines de ces fractions, et pouvoir ainsi analyser le contenu en CuZn-SOD glyquée et non-glyquée.

REFERENCES

- Arai, K. et al., 1987. Glycation and inactivation of human Cu-Zn-superoxide dismutase. Identification of the in vitro glycosylated sites. *J Biol Chem*, 262(35): 16969-72.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-54.
- Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865): 813-20.
- Brownlee, M., 2005. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, 54(6): 1615-25.
- Kang, J.H., 2003. Modification and inactivation of human Cu,Zn-superoxide dismutase by methylglyoxal. *Mol Cells*, 15(2): 194-9.
- Kawamura, N. et al., 1992. Increased glycosylated Cu,Zn-superoxide dismutase levels in erythrocytes of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 74(6): 1352-4.
- Kullik, I. and Storz, G., 1994. Transcriptional regulators of the oxidative stress response in prokaryotes and eukaryotes. *Redox Report*, 1: 23-29.
- Mahesh, T. and Menon, V.P., 2004. Quercetin alleviates oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res*, 18(2): 123-7.
- Sindhu, R.K., Koo, J.R., Roberts, C.K. and Vaziri, N.D., 2004. Dysregulation of hepatic superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in diabetes: response to insulin and antioxidant therapies. *Clin Exp Hypertens*, 26(1): 43-53.
- Szaleczky, E., Prechl, J., Feher, J. and Somogyi, A., 1999. Alterations in enzymatic antioxidant defence in diabetes mellitus—a rational approach. *Postgrad Med J*, 75(879): 13-7.
- Wohaieb, S.A. and Godin, D.V., 1987. Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozotocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. *Diabetes*, 36(9): 1014-8.

Travail complémentaire : mise au point d'une technique d'analyse d'images (étude de la production aortique d'anion superoxyde par marquage fluorescent à la DHE)

Le rôle de l'anion superoxyde dans les complications vasculaires, et plus particulièrement les complications diabétiques, est bien démontré dans la littérature. Il est même supposé être à l'origine des nombreuses complications résultant du SO dans le DT1 (Brownlee, 2005). C'est pourquoi, l'évaluation de la production d'anion superoxyde (quantité et source) est un paramètre important à identifier. Ceci permettra ensuite de mieux cibler la prise en charge des sujets DT1, en choisissant la plus adaptée pour réduire les sources principales d'anion superoxyde identifiées dans le diabète. Trois grandes sources enzymatiques d'anion superoxyde ont été identifiées dans les vaisseaux : la NADPH-oxydase, la xanthine oxydase, et la eNOS découplée. Dans ce dernier cas, la production concomitante de NO aboutit à la formation de peroxynitrites hautement toxiques pour les cellules endothéliales.

Les techniques d'étude de l'anion superoxyde (voies de production et quantification) reposent sur l'utilisation de sondes fluorescentes, principalement le DiHydroEthidium (DHE). La DHE a pour caractéristique d'être oxydée en 2-hydroxyethidium par l'anion superoxyde, ce produit émettant alors une fluorescence, lorsqu'il est stimulé (longueur d'onde : $\lambda \sim 630\text{nm}$). L'avantage de cette sonde réside dans sa simplicité d'utilisation et sa stabilité : les membranes cellulaires sont perméables au 2-DHE (l'étape habituelle de perméabilisation n'est donc pas nécessaire), celui-ci pénètre dans la cellule, puis après oxydation, dans le noyau, où il se lie à l'ADN. La sonde est ainsi " piégée " et la fluorescence résultante permet d'évaluer la quantité d'anion superoxyde.

Si le protocole de marquage des tissus avec la sonde semble relativement simple et bien décrit, l'exploitation ultérieure des images obtenues pose problème. En effet, cette étape n'est souvent pas détaillée dans les publications, or c'est elle qui, au-delà du marquage en lui-même, conditionne le résultat de l'expérimentation. Lorsque la méthodologie de l'analyse des images est présentée, on constate de nombreuses approximations, qui sont rarement prises en compte dans l'interprétation des résultats. Parmi ces limites, on retiendra principalement une quantification par simple comptage des noyaux marqués et/ou une analyse limitée à une portion restreinte de vaisseaux⁷⁴. Concernant le comptage des noyaux marqués, le manque de précision de la mesure provient du fait qu'on ne prenne pas entièrement en compte l'intensité de la fluorescence mesurée au niveau de chaque noyau, mais seulement le critère "noyau marqué ou non" (en dessous d'un certain degré de fluorescence, le noyau est considéré comme non marqué, au-dessus de cette limite, il est considéré comme marqué). Or, pour un noyau considéré "marqué", il existe toute une échelle d'intensité du signal fluorescent, représentatif de la quantité d'anion superoxyde présent. En effet, la sonde est introduite, au départ, en excès dans le milieu, pour réagir avec la

⁷⁴ En pratique, on sélectionne à partir de l'image entière des zones (sous forme de petits carrés) dans lesquels on réalise l'analyse.

totalité de l'anion superoxyde. Au sein de chaque cellule, une certaine proportion de sonde va être oxydée et aller se lier à l'ADN dans le noyau. La quantité de sonde oxydée, reflet direct de la quantité d'anion superoxyde présent dans la cellule, est un paramètre spécifique à chaque cellule. Fixer un seuil arbitrairement ne permet donc pas d'évaluer ce paramètre. Enfin, lorsque l'intensité de la fluorescence est prise en compte, la technique consiste souvent à moyenniser l'intensité totale de la fluorescence par la surface de section de l'aorte. Or, il existe toujours un bruit de fond plus ou moins important (une fluorescence diffuse qui ne correspond pas à de la DHE oxydée par l'anion superoxyde), qui est dans cette technique, inclus dans la mesure, et peut donc la modifier considérablement. Concernant l'analyse limitée à une portion restreinte de vaisseaux, il n'est jamais fait mention d'une vérification de la représentativité des zones analysées par rapport à l'ensemble de l'image. Or, on peut supposer qu'il existe d'une part, un impact très fort de l'expérimentateur dans le choix des zones d'analyses (expérimentation inter-expérimentateur non-reproductible), et d'autre part, un biais dans le choix des zones en fonction des résultats attendus (l'expérimentateur a tendance à choisir les plus "belles" zones pour l'analyse).

Pour pallier à ces limites, nous avons mis au point, en collaboration avec la plate-forme d'histopathologie H²P² de l'IFR 140 Biosit (Rennes), un protocole d'analyse d'images permettant :

1. une prise en compte de l'intensité de la fluorescence et non un seuillage arbitraire,
2. une prise en compte de la section aortique dans sa totalité,
3. une élimination du bruit de fond non-spécifique.

Le protocole préalable de marquage à la DHE est similaire à celui classiquement décrit dans la littérature : après prélèvement sur l'animal, une section d'aorte est incluse dans un milieu d'enrobage (Tissu-Tek OCT) puis plongée dans un bain d'isopentane préalablement refroidi pour être rapidement congelée. L'échantillon est ensuite stocké à -80°C jusqu'à exploitation. A partir de cet échantillon, des lames de 10µm sont découpées au cryostat. Les lames sont réhydratées dans un bain de PBS, puis incubées 30 minutes avec la solution de DHE 10µM, dans une chambre noire humide, à 37°C. Pour étudier les différentes voies de production de l'anion superoxyde, une incubation préalable avec des inhibiteurs de ces différentes voies est réalisée. Après rinçage au PBS, les lames sont couvertes et la fluorescence est mesurée par le scanner de lames Nanozoomer 2.0-RS (Hamamatsu), avec un filtre TRITC (longueur d'onde d'excitation : $\lambda=540\text{nm}$; longueur d'onde d'émission : $\lambda=625\text{nm}$) et DAPI (longueur d'onde d'excitation : $\lambda=345\text{nm}$; longueur d'onde d'émission : $\lambda=455\text{nm}$), zoom 20X. Les paramètres de gain et d'exposition sont ajustés sur le tissu présentant le signal le plus fort, puis conservés pour chaque session d'expérimentation. Afin de permettre des comparaisons intergroupes dans les mêmes conditions d'analyse, chaque session est composée d'une lame de chaque groupe expérimental).

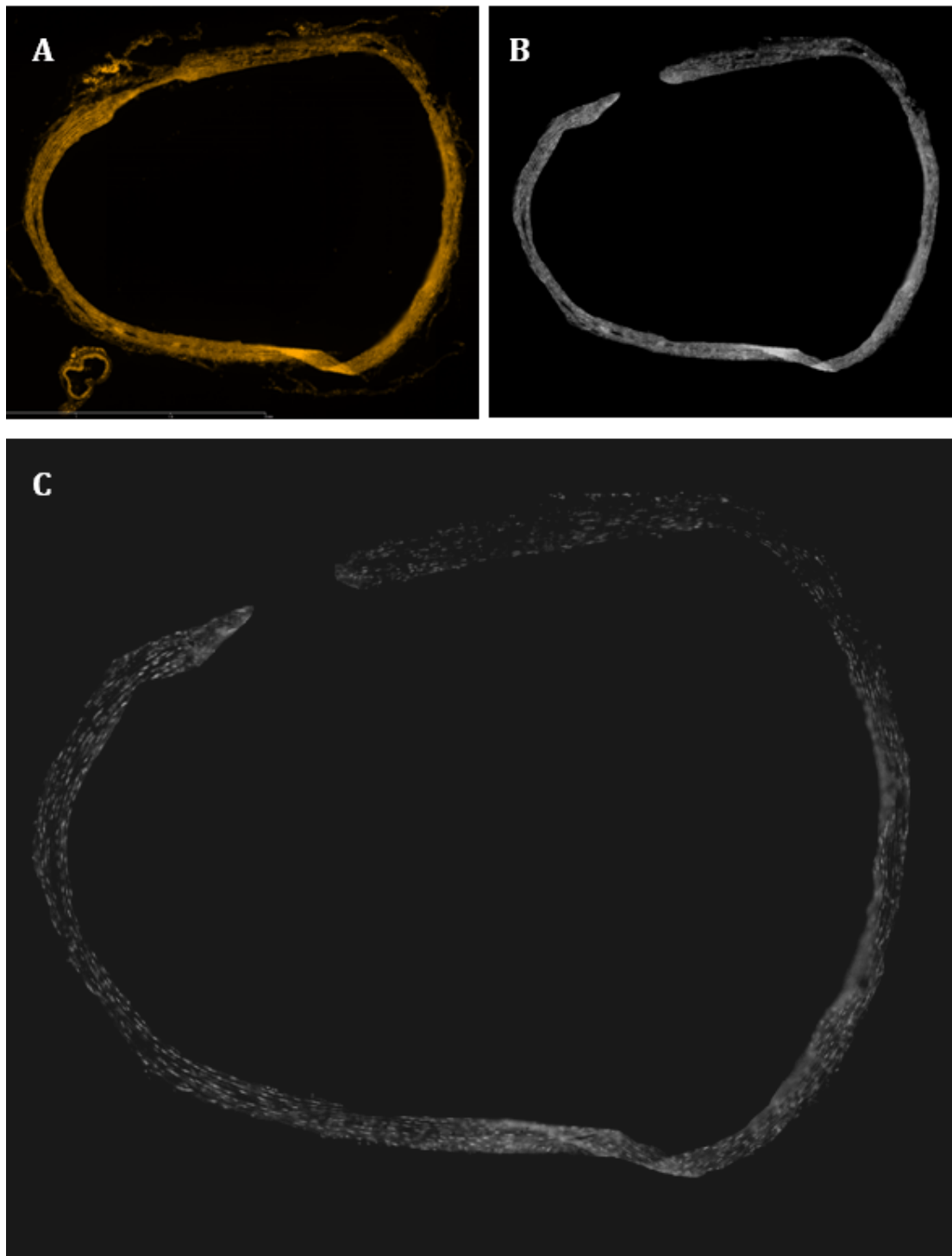


Figure 1 : Représentation des différentes étapes de l'analyse d'images

A : première image obtenue par le scanner de lames

B : séparation des différentes composantes de l'image

C : élimination du bruit de fond et seuillage de l'image pour mettre en évidence les particules représentant le marquage

A partir de la capture des images, nous avons élaboré un protocole d'analyse des images obtenues, en utilisant le logiciel d'analyse d'images scientifique Fiji. Les étapes sont les suivantes :

- ouvrir le fichier contenant l'image de l'aorte entière, avec le signal fluorescent enregistré avec le filtre DAPI et le filtre TRITC (Figure 1A)
- détourner l'aorte et éliminer les parties inutiles de l'image (ne conserver que l'aorte)
- séparer les trois composantes de l'image pour isoler le signal provenant de chacun des filtres. La composante rouge (filtre TRITC) correspond au signal de la DHE oxydée et au bruit de fond, la composante bleue (filtre DAPI) correspond au bruit de fond uniquement (autofluorescence des tissus). La composante verte n'est pas utilisée.
- pour supprimer le bruit de fond, soustraire à la composante rouge (qui représente la DHE oxydée et le bruit de fond) la composante bleue (qui ne représente que le bruit de fond). L'image résultante est utilisée pour l'analyse ultérieure (Figure 1B).
- procéder au seuillage de l'image, c'est-à-dire transformer l'image couleur en une image en niveaux de gris. Ces niveaux de gris traduisent l'intensité du signal fluorescent. Le marquage à la DHE est matérialisé par des "tâches" plus ou moins diffuses, localisées au niveau des noyaux (Figure 1C). La fonction de seuillage automatique proposée par le logiciel a été validée en vérifiant visuellement que les tâches sur l'image en niveaux de gris, obtenue après seuillage, correspondent au marquage à la DHE sur l'image d'origine (vérification visuelle en superposant les deux images).
- utiliser la fonction "analyse de particules" pour déterminer l'intensité moyenne de chaque "tâche" (i.e. particules) et sa surface en pixels. Les particules les plus petites ainsi que les plus grosses sont éliminées. Cette procédure permet de supprimer les "pixels fantômes", ainsi que les zones floues (lorsqu'une particule est trop grosse, il s'agit d'un défaut de l'image et non d'un marquage réel).
- appliquer une pondération : multiplier l'intensité moyenne du signal de chaque particule par sa surface, pour obtenir un indice de signal propre à chaque particule, intégrant à la fois son intensité et sa surface. Les indices de toutes les particules de la section d'aorte sont additionnés et rapportés à la surface totale. On obtient un "score" de marquage pour notre image, représentatif de l'anion superoxyde sur ce tissu.

Les avantages de cette technique sont nombreux. Elle permet de traiter l'aorte en entier, contrairement aux techniques classiques qui ne sélectionnent que des zones, tout en se préservant des défauts de l'image par l'exclusion des particules trop petites/grandes (pixel fantôme/flou). Elle applique un protocole entièrement standardisé (notamment en utilisant la fonction de seuillage automatique), qui n'introduit aucun biais lié à l'expérimentateur. Elle semble donc particulièrement reproductible en inter-expérimentateur, bien que ce paramètre n'ait pas été vérifié. L'élimination du bruit de fond est particulièrement efficace, grâce à la possibilité pour le Nanozoomer de scanner simultanément une même image avec deux filtres (l'un contenant le signal et le bruit, l'autre uniquement le bruit).

Toutefois, certains points pourraient être améliorés ou présentent des limites inhérentes à la technique. La standardisation de la méthode de mesure passe par le seuillage automatique du logiciel. Or, les paramètres pris en compte par le logiciel pour déterminer ce seuil ne sont connus. Néanmoins, ils sont identiques à chaque mesure, garantissant la standardisation de la technique. La détermination de la taille des particules à inclure/exclure dans l'analyse de particules a été déterminée de manière empirique. Une analyse plus approfondie de ce paramètre serait nécessaire. Enfin, les paramètres d'acquisition d'image étant déterminés pour chaque session d'expérimentation, seules les comparaisons entre échantillons de la même session sont réalisables.

Bien que perfectible, la mise au point de cette méthodologie d'analyse d'images nous semble la plus pertinente, dans l'optique d'analyser l'importance relative des différentes voies de production de l'anion superoxyde dans le diabète de type 1. Elle permet de pallier aux principales limites des études similaires que nous avons pu noter dans la littérature.

CONTRIBUTIONS PERSONNELLES :
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif de ces travaux de thèse était d'évaluer si une prise en charge plurielle du DT1 pouvait réduire efficacement le SO, en associant différentes approches qui agissent par des mécanismes différents mais complémentaires, et de déterminer la part respective de chacun de ces mécanismes dans les effets observés. Les différentes approches testées reposaient sur une prise en charge nutritionnelle (via la prise d'un complément alimentaire à base de soja), l'insulinothérapie, et l'activité physique (via un entraînement en endurance).

1. Intérêt d'un produit dérivé du soja dans la prise en charge du diabète

L'importante consommation de soja dans la population asiatique est associée à de nombreux bénéfices pour la santé, notamment une moindre incidence du cancer, des maladies cardiovasculaires ou encore du diabète (Barnes, 1998). La consommation de soja étant largement inférieure dans la population occidentale, notamment pour des raisons culturelles, de nombreuses études ont été menées afin de déterminer la ou les molécule(s) bioactive(s) du soja, dans le but de les intégrer dans des compléments alimentaires. Les isoflavones constituent la classe de molécules la plus étudiée, et démontrent des propriétés particulièrement intéressantes dans le cadre du diabète de type 1 : antioxydantes, anti-inflammatoires, et glucorégulatrices. Les alpha-GOS, autres composés du soja, exercent, quant à eux, une activité prébiotique, qui permet de renforcer favorablement le microbiote intestinal, dont on sait qu'il est altéré dans le diabète. Ils ont également la capacité d'améliorer l'absorption intestinale des isoflavones. Ces deux éléments (isoflavones et alpha-GOS) sont les composés actifs majeurs retrouvés dans le PFS, une poudre hydrosoluble développée par la société Sojasun Technologies à partir de la graine de soja.

L'effet antioxydant de ce produit, déjà démontré *in vitro*, a été dans l'étude 1, confirmé *in vivo* dans un modèle animal de diabète de type 1. Cet effet antioxydant passe par un renforcement du système de défense enzymatique, comme en témoignent l'augmentation de l'activité de la SOD et de la GPX, associée à une augmentation (non-significative mais néanmoins visible sur le western blot) du contenu de la Mn-SOD. Il semble également qu'un produit fermenté de soja possède la capacité d'activer ou d'inhiber directement l'activité de la SOD et de la GPX, puisque Hu et al. (2004) ont rapporté une modification de l'activité de ces enzymes suite au même type de supplémentation (un produit issu de la fermentation du soja), sans noter de différence de contenu enzymatique.

L'effet antioxydant observé ne résulte pas d'une meilleure régulation de la glycémie, contrairement à ce qui a pu être précédemment rapporté pour les isoflavones seuls. Toutefois, les ERO étant impliqués dans le captage de glucose, nous avons démontré que la supplémentation en PFS améliorait le captage musculaire de glucose, bien qu'elle ne permette pas de restaurer les stocks de glycogène diminués dans notre modèle. Ce résultat présente un intérêt particulier pour la population diabétique, car l'activité physique leur est souvent conseillée comme complément thérapeutique au traitement insulinique classique, alors même que leur capacité physique est diminuée, suite aux altérations du métabolisme glucidique. La prise de PFS constitue donc une voie d'exploration intéressante, et des études complémentaires sont nécessaires pour valider son utilité afin d'optimiser au mieux la prise en charge du

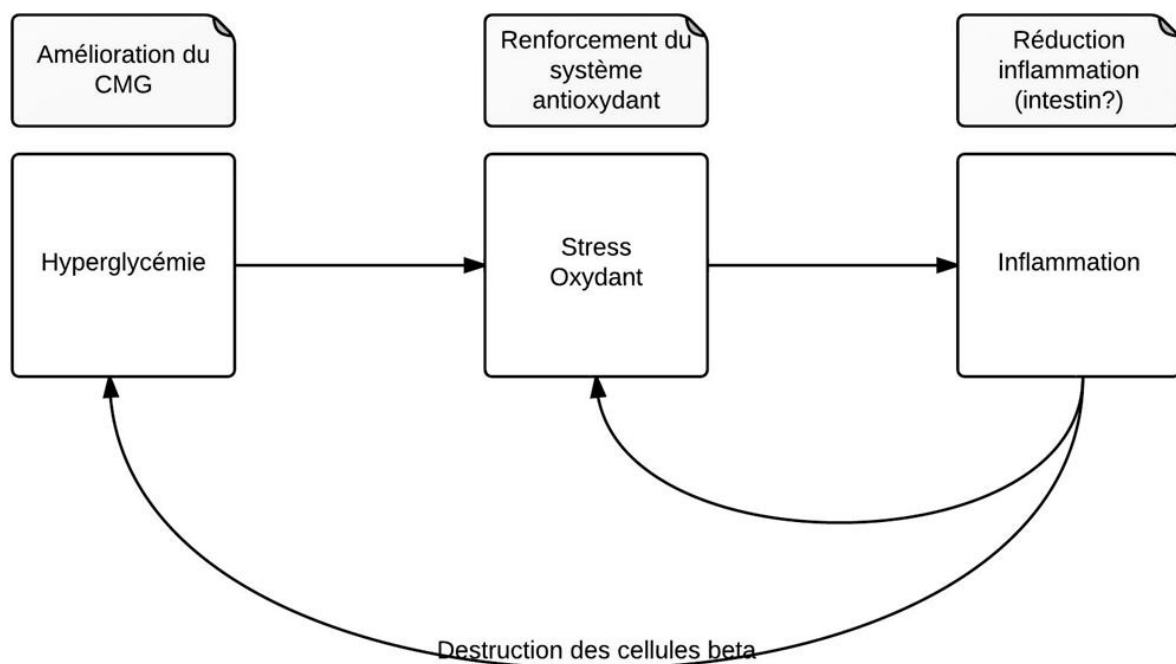
diabète par l'activité physique. Par ailleurs, le PFS a démontré des effets bénéfiques inattendus sur le métabolisme glucidique chez le sujet sain, en augmentant les stocks de glycogène. Ce paramètre conditionnant la performance, le PFS pourrait également trouver une utilité dans la population sportive.

Enfin, l'effet anti-inflammatoire du PFS a également été confirmé *in vivo*. Les mécanismes sous-jacents restent toutefois à éclaircir, puisque la diminution de l'inflammation pourrait résulter:

- de mécanismes directs : le PFS agirait vraisemblablement au niveau du microbiote intestinal, ce qui pourrait limiter la propagation de l'inflammation jusqu'aux cellules beta du pancréas, et ainsi ralentir la progression du diabète
- de mécanismes indirects via la baisse du SO,

La discrimination de ces différents mécanismes passe par l'analyse du microbiote intestinal en réponse au PFS, ainsi que par l'observation de la fonction insulino-sécrétoire du pancréas. Il serait notamment intéressant de réaliser une analyse immunohistochimique du pancréas pour évaluer la préservation des tissus, avec un marquage des cellules contenant encore de l'insuline. Cette technique a été utilisée par Choi et al. (2008) pour mettre en évidence la capacité de la génistéine et de la daidzéine à préserver la fonction insulino-sécrétrice des cellules beta, et permettrait de vérifier si cet effet des isoflavones est retrouvé dans le PFS.

L'originalité du PFS réside dans sa capacité à agir sur les principales altérations induites par le diabète de type 1 : anomalies du métabolisme glucidique, stress oxydant et inflammation, En agissant sur ces trois paramètres interdépendants, le PFS crée ainsi un cercle vertueux dans la prise en charge du diabète.



2. L'activité physique, complément thérapeutique majeur de l'insulinothérapie

Phénomène central dans les complications diabétiques, le SO résulte principalement de l'hyperglycémie associée au diabète, celle-ci déclenchant à la fois la production d'espèces oxydantes tout en altérant le système de défense antioxydant. La prise en charge de ce SO peut donc se faire : 1/en diminuant l'hyperglycémie, 2/en renforçant le système de défense antioxydant, 3 /en couplant ces deux approches (notamment car la première est rarement suffisante).

Le diabète de type 1 est caractérisé par une destruction progressive mais totale des cellules productrices d'insuline, les cellules beta du pancréas. Le traitement par insuline exogène est à la base de toute prise en charge, permettant la survie du patient diabétique. Néanmoins, l'insulinothérapie ne reproduit jamais parfaitement la cinétique naturelle de la sécrétion insulinaire, et des épisodes hyperglycémiques d'ampleur et de fréquence variables persistent. Cette difficulté à réguler la glycémie par l'insulinothérapie a été mise en évidence dans les études 3 et 4. Dans l'étude 3, le traitement à l'insuline ne permet pas de diminuer significativement la glycémie, lorsque celle-ci est mesurée 18 à 20h après la dernière injection. Cela démontre donc que contrairement aux indications du fabricant, l'insuline glargine ne permet pas de maintenir un état normoglycémique pendant l'intégralité de la période entre deux injections. L'efficacité sur le long terme de l'insulinothérapie est tout de même attestée par un niveau de fructosamine plus bas dans le groupe traité à l'insuline, à l'issue du protocole. Dans l'étude 4, si une diminution significative de la glycémie est bien observée en réponse au traitement à l'insuline, l'hyperglycémie reste toujours présente, puisque les valeurs de glycémie se situent aux environs de 300 mg/dL.

Malgré une régulation imparfaite de la glycémie, le traitement à l'insuline permet une large amélioration de la balance oxydante : dans le muscle, les isoprostanes et la CML sont diminués, et l'activité de la SOD est augmentée (étude 3); et dans l'aorte, la production d' $O_2^{\cdot-}$ est diminuée car ses trois principales voies de production dans le diabète (NOX, eNOX, XO) ne sont plus activées (étude 4).

Toutefois, la glycémie n'étant pas parfaitement régulée par l'insulinothérapie, des complications vont se développer, induites par le SO résultant essentiellement de la persistance d'épisodes hyperglycémiques. Ces complications sont les principales causes de la détérioration de la qualité et de l'espérance de vie des patients diabétiques aujourd'hui, et nécessitent une prise en charge adaptée. Parmi les prises en charges possibles, l'entraînement occupe une place de choix dans la double problématique de réduction de l'hyperglycémie et du SO associé. L'entraînement permet en effet, à la fois d'améliorer la régulation de la glycémie chez les patients diabétiques (lorsqu'un entraînement adapté est proposé à des patients présentant un contrôle glycémique correct), et d'améliorer la balance oxydante chez le sujet sain. Cet effet " antioxydant " de l'entraînement n'avait toutefois pas été clairement établi dans le diabète de type 1, les quelques études disponibles sur ce sujet rapportant des résultats contrastés selon la durée de l'entraînement et le tissu considéré. Dans l'étude 3, nous avons mis en évidence qu'un entraînement en endurance de 8 semaines sur tapis roulant, permet de réduire significativement tous les marqueurs de SO dans le muscle. Ces bénéfices de l'entraînement ne sont pas médiés par une amélioration du contrôle

glycémique, puisque ni la glycémie, ni la fructosamine ne sont modifiées par l'entraînement. Les mécanismes sous-tendant l'effet antioxydant de l'entraînement dans le diabète restent à explorer, car le système antioxydant (activité de la SOD et de la GPX, capacité antioxydante totale) n'est pas amélioré en réponse à l'entraînement. Il s'agirait donc plutôt d'une diminution de la production des espèces oxydantes, que nous avons par ailleurs démontrée dans l'aorte, où l'activation des voies de production de l'O₂[•] habituellement observée dans le diabète est supprimée par l'entraînement.

L'association de ces deux prises en charge (insulinothérapie et entraînement) pourrait donc exercer des effets additifs sur la réduction du SO : l'insulinothérapie réduit l'hyperglycémie, ce qui permet une diminution du SO en renforçant les systèmes antioxydants (augmentation de l'activité de la SOD dans l'étude 3 lors du traitement à l'insuline), alors que l'entraînement permet une diminution de la production des espèces oxydantes. Notre étude 3 démontre que lorsqu'ils sont proposés en association, l'entraînement améliore la durée d'action de l'insuline (par un possible effet insulino-sensibilisant), et l'insuline permet à l'entraînement d' " up-réguler " l'activité des systèmes antioxydants⁷⁵. Bien que nous n'ayons pas pu mettre en évidence de différences significatives dans les marqueurs du SO étudiés, entre le traitement à l'insuline seul et son association à l'entraînement⁷⁶, les mécanismes mis en jeu sont complémentaires. L'effet insulin-like probable de l'entraînement ne peut être mis en évidence chez les rats diabétiques non traités, en raison de l'hyperglycémie majeure qu'ils présentent. Mais l'originalité de nos résultats est de montrer que cet effet insulin-like s'exerce en complément du traitement insulinique classique, dont on a vu qu'il n'était pas pleinement satisfaisant.

Les bénéfices de l'entraînement sur le système antioxydant ne peuvent s'exprimer que lorsque l'hyperglycémie est modérée par le traitement à l'insuline. Dans une approche clinique, ces résultats soulignent l'importance d'une régulation efficace de la glycémie lorsque l'entraînement est proposé comme prise en charge additionnelle.

Par ailleurs, nous avons constaté que l'effet de l'insuline est fortement modulé par l'entraînement. Ainsi, dans le cadre de nos travaux, nous avons démontré dans l'étude 3 que l'entraînement, qui n'avait pas d'effet en lui-même sur la glycémie, prolongeait l'action de l'insuline. Ce résultat pourrait s'expliquer par une amélioration de la sensibilité à l'insuline en réponse à l'exercice, paramètre qu'il serait intéressant de tester chez les sujets diabétiques. Mais dans l'étude 4, l'entraînement démontre un effet bénéfique sur la glycémie. Cet effet est modeste (mais significatif), puisque l'hyperglycémie est toujours présente, avec des valeurs de glycémie aux environs de 450 mg/dL. Mais dans ce cas, l'effet de l'entraînement associé à l'insuline sur la glycémie est inférieur à l'effet de l'insuline seul. Ce paradoxe souligne la difficulté d'ajuster la dose insulinique, notamment car la mesure de glycémie réalisée dans ce but a pu être affectée par l'effet insulin-like résiduel de l'exercice, ce qui peut conduire à sous-estimer les doses nécessaires pour réguler

⁷⁵ L'entraînement seul ne permet pas d'augmenter l'activité des enzymes antioxydantes. en raison de la persistance d'une hyperglycémie massive qui bloque les adaptations (glycation possible).

⁷⁶ L'écart en terme de pourcentage entre les traitements, bien que conséquent, n'est pas significatif : les isoprostanes musculaires sont par exemple diminués de 42% par l'entraînement, de 51% par l'insuline, et de 73% lorsque les deux sont associés.

la glycémie. Les interrelations complexes entre l'insuline et l'activité physique expliquent pourquoi, lorsque l'insulinothérapie a été introduite dans le traitement des diabétiques, la pratique d'une activité physique leur a été fortement déconseillée. De nombreux travaux ont été nécessaires pour comprendre comment intégrer l'entraînement à l'insulinothérapie pour en cumuler les bénéfices, et non les annuler. D'autres études sont encore à conduire pour préciser les modalités d'exercice les plus à même d'exercer des effets bénéfiques en association avec l'insuline, avec notamment l'émergence de nouvelles formes de pratique sportive, telles que les exercices intermittents de haute intensité (HIE)

3. Le rôle prépondérant de l'anion superoxyde dans les complications diabétiques : de l'importance d'inhiber ses voies de production et d'améliorer sa neutralisation par la SOD

Dans la littérature, les complications diabétiques ont été attribuées essentiellement au SO, et plus particulièrement à l'augmentation de la production d'anion superoxyde. Les nombreuses études tentant de réduire le SO à l'origine des complications, par diverses interventions (prise de composés alimentaires antioxydants, activité physique, notamment), n'ont souvent rencontré que peu de succès. Pour Brownlee (2005), cette absence de résultats probants proviendrait du caractère " partiel " des prises en charge testées : l'objectif est souvent de bloquer l'un ou l'autre des mécanismes par lesquels le SO génère des complications, alors que pour être réellement efficace, il conviendrait de s'attaquer à la source du SO : l' $O_2^{\cdot-}$ produit en excès. Deux solutions sont alors possibles : bloquer les mécanismes à l'origine de la production de l' $O_2^{\cdot-}$ (en bloquant l'hyperglycémie ou les enzymes productrices) ou piéger l' $O_2^{\cdot-}$ dès qu'il est produit. Dans cette démarche, la SOD joue un rôle clé, puisque c'est la seule enzyme capable de prendre en charge l' $O_2^{\cdot-}$, pour le réduire en d'autres composés moins réactifs. Or, dans le diabète, son activité dans le sang et différents tissus a souvent été rapportée comme diminuée, alors même que son contenu et/ou son expression étaient augmentés en réponse au SO. Le paradoxe que constitue l'augmentation de l'expression de l'enzyme associée à une diminution ou une absence de modifications de son activité, suggère l'existence de modifications post-traductionnelles. Parmi celles-ci, la plus importante semble la glycation (fixation d'une fonction aldéhyde d'un ose sur une fonction amine de la protéine). Il a été démontré que ce phénomène de glycation entraînait une inactivation de la CuZn-SOD, et une diminution d'affinité de l'EC-SOD pour l'héparine, ce qui entraîne une baisse de son efficacité, puisqu'elle doit être liée à l'héparine pour se fixer à l'endothélium, où elle exerce son activité antioxydante⁷⁷. La réduction du phénomène de glycation par une prise en charge efficace constitue un enjeu majeur dans la lutte contre le SO et les complications qu'il induit chez le DT1. Pourtant, si ce phénomène est très souvent évoqué dans la littérature, seule une dizaine d'études l'ont effectivement évalué, alors que sa mise en évidence remonte à plus de 25 ans. Et à notre connaissance, aucune étude n'a analysé l'effet de différentes prises en charge sur ce mécanisme. Ce constat surprenant résulte de difficultés méthodologiques majeures : la mise en

⁷⁷ En piégeant l'anion superoxyde produit au niveau vasculaire, pour éviter sa liaison avec le NO et la formation de peroxy-nitrites.

évidence de l'augmentation de SOD glyquée dans le diabète nécessite la séparation des deux fractions (glyquée/non-glyquée) et leur quantification respective. Les quelques études disponibles ont réalisé la séparation des deux fractions par chromatographie d'affinité, en utilisant des colonnes de type " GlycoGel B " qui ne sont plus fabriquées depuis plusieurs années. C'est pourquoi nous avons travaillé à la mise au point d'une nouvelle technique d'analyse permettant, après une étape de séparation des fractions glyquées/non-glyquées par chromatographie d'affinité, d'étudier le contenu respectif en SOD glyquée et non-glyquée dans nos échantillons. Cette analyse permettra de mieux comprendre les résultats observés, qui pourraient paraître surprenant à première vue. En effet, 8 semaines après l'induction du diabète, l'activité de la SOD n'était pas modifiée chez les rats diabétiques, alors même qu'ils présentaient un SO élevé. Cette absence apparente d'adaptations dans l'activité de l'enzyme pourrait résulter de mécanismes sous-jacents, aux effets opposés : une augmentation de son expression, masquée par une inactivation concomitante résultant du phénomène de glycation. Dans un premier temps, nous avons analysé le contenu total en CuZn-SOD par Western Blot. La fixation d'un résidu osidique sur la protéine ne modifie pas significativement son poids moléculaire, et ne modifie pas la liaison de l'anticorps sur la protéine. Le western blot quantifie donc l'ensemble de la CuZn-SOD, qu'elle soit glyquée ou non.

Nous avons ainsi mis en évidence que dans le diabète non-traité, l'absence d'adaptation de l'activité de la CuZn-SOD résultait d'une absence de variation de son contenu total. La glycation ne semble pas ici impliquée, et deux hypothèses pourraient expliquer l'absence de variation du contenu protéique alors même qu'un SO existe : 1/ les capacités d'adaptation de l'organisme, soumis à un SO important et persistant, sont dépassées, et l'organisme n'est plus capable de réagir, 2/ l'hyperglycémie majeure perturbe les voies de signalisation par lesquelles le SO " up-régule " le système antioxydant. Pour préciser cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier l'effet de variations prolongées de la glycémie sur la voie de signalisation NRF2-Keap1, qui permet l'expression de gènes codant pour les protéines antioxydantes en réponse à un SO. En effet, si une élévation transitoire de la concentration en glucose déclenche une réponse adaptative au niveau de cette voie de signalisation, cette réponse disparaît lorsque les sujets sont soumis à un SO chronique (résultant de l'avance en âge) (Ungvari et al., 2011). On peut donc supposer que dans le cadre du diabète, l'hyperglycémie persistante et le SO associé vont perturber l'activation de NRF2-Keap1, ne permettant pas une "up-régulation" des protéines antioxydantes en réponse au SO. Ce phénomène n'exclut toutefois pas l'existence de modifications post-traductionnelles des enzymes antioxydantes. Dans le cadre des différentes prises en charge testées dans nos travaux, nous n'avons observé aucune variation du contenu total en CuZn-SOD (étude 5). Par contre, l'activité de la SOD était bien augmentée en réponse au traitement à l'insuline, associé ou non à l'entraînement (étude 3). Ces divergences confirment la survenue de modifications post-traductionnelles, parmi lesquelles la glycation semble la plus plausible. En effet, pour un contenu protéique total identique, l'activité de la SOD est augmentée avec le traitement par insuline, associé ou non à l'entraînement, c'est-à-dire les deux prises en charge qui permettent une amélioration de la régulation de la glycémie. Cette hypothèse reste à confirmer par la quantification des fractions glyquées et non-glyquées, ainsi que par le dosage de l'activité des fractions respectives, pour vérifier l'inactivation de la CuZn-SOD suite à sa glycation.

4. L'induction expérimentale du diabète et ses conséquences : considérations méthodologiques

L'ensemble des études présentées dans ces travaux de thèse se sont appuyées sur deux grands protocoles expérimentaux (répétés plusieurs fois pour les besoins des différentes études): un protocole de supplémentation en PFS d'une durée totale de 4 semaines, dont 3 semaines de supplémentation (étude 1 et 2), et un protocole d'insulinothérapie et/ou d'entraînement d'une durée totale de 9 semaines, dont 8 semaines de prise en charge (études 3, 4, 5). Dans chacune des études réalisées, la première étape a été de vérifier les altérations induites par le diabète. Un groupe de rats sains a donc été inclus dans les deux protocoles.

Le modèle animal est identique dans toutes les études : il s'agit d'un modèle de diabète de type 1 induit par injection de streptozotocine à 45mg/kg, une seconde injection étant réalisée 48 à 72h après la première si le diabète n'est pas déclaré. L'utilisation d'une dose qui peut être considérée comme relativement faible par rapport à d'autres études, présente deux avantages principaux : d'une part, elle évite une réaction excessive de l'organisme, notamment une apoptose massive des cellules pouvant conduire au décès de l'animal, suite à cette injection ou au décours de l'entraînement. D'autre part, l'induction du diabète par de multiples injections de streptozotocine, plus faiblement dosées, passe essentiellement par des mécanismes immunitaires. Ces mécanismes sont donc beaucoup plus proches de ceux intervenants chez l'Homme, où le diabète de type 1 résulte essentiellement d'altérations des processus immunitaires. Ce modèle nous semble donc plus proche de la physiopathologie humaine du DT1.

Les adaptations de la balance oxydante constatées en réponse à ce diabète sont variables selon nos protocoles. Ainsi, après 4 semaines de diabète, l'activité des enzymes antioxydantes (SOD et GPX) ainsi que l'expression de la Mn-SOD sont diminuées dans le muscle soléaire (étude 1), alors que les isoprostanes et le rapport GSH/GSSG ne sont pas modifiés dans le gastrocnémien (étude 1). A l'inverse, au bout de 9 semaines de diabète, nous n'observons plus de différences que ce soit dans l'activité ou dans l'expression des enzymes antioxydantes⁷⁸, alors que les marqueurs du SO (isoprostanes et GSH/GSSG) sont augmentés, dans le muscle soléaire (étude 3). Ayant observé des résultats similaires lors d'une expérimentation préalable (non inclus dans cette thèse) dans le muscle gastrocnémien après 9 semaines de diabète (i.e. pas variations du système antioxydant mais une augmentation des marqueurs du SO), il est vraisemblable que les différences observées résultent de la durée du diabète, et non du muscle observé⁷⁹. Entre 4 et 9 semaines après l'induction du diabète, l'activité et l'expression des enzymes antioxydantes, qui étaient diminuées chez les diabétiques comparés aux sains à 4 semaines de diabète, se normalisent. Mais dans le même temps, des dommages apparaissent, indiquant que ces évolutions du système antioxydant sont insuffisantes pour lutter contre le SO. L'élévation progressive des dommages oxydatifs

⁷⁸ Activité de la SOD et de la GPX, contenu en CuZn-SOD et Mn-SOD

⁷⁹ La différence dans le muscle analysé se traduit essentiellement par la valeur absolue mesurée pour chacun des paramètres, qui sont très différentes selon les muscles.

va aboutir, à long terme, à la survenue et au développement des complications diabétiques. Ces constatations mettent en exergue l'importance des facteurs méthodologiques dans la compréhension des résultats observés. Il serait ainsi intéressant d'établir une cinétique des adaptations de la balance oxydante en réponse au diabète. Toutefois, les adaptations sont également spécifiques au tissu étudié (Wohaieb and Godin, 1987), il est donc difficile de dresser un tableau global de la réponse oxydante à l'induction du diabète expérimental.

Concernant les tissus analysés dans nos travaux, le gastrocnémien a été étudié dans le premier protocole car en tant que muscle mixte, il représente bien les adaptations générales du tissu musculaire squelettique. Dans le protocole incluant l'entraînement, l'analyse du muscle soléaire a été privilégiée car il s'agit d'un muscle lent, siège privilégié des adaptations en réponse à l'entraînement d'endurance.

Pour conclure, les résultats parfois discordants observés dans le diabète de type 1 ont la plupart du temps une origine méthodologique. En effet, de nombreux facteurs sont à prendre en compte dans l'interprétation des résultats.

CONCLUSION

Conclusion

Le diabète de type 1 est caractérisé par une destruction des cellules insulino-sécrétrices, menant rapidement à une insulino-pénie partielle, puis totale. La survie des personnes atteintes de DT1 passe par une insulinothérapie exogène, dont l'objectif est de reproduire au mieux la cinétique physiologique de l'insuline (notamment par l'intermédiaire des pompes à insuline). Mais à long terme, de nombreuses complications se développent, conduisant à une altération de la qualité et de l'espérance de vie. Le stress oxydant induit par l'hyperglycémie constitue le mécanisme central impliqué dans la survenue et le développement de ces complications. Si l'insuline assure la survie des patients, elle ne parvient pas toujours à normaliser la glycémie : les épisodes hyperglycémiques persistent, engendrant un SO et les complications associées. C'est pourquoi une prise en charge plurielle, associant à l'insulinothérapie une prise en charge nutritionnelle et l'activité physique, est primordiale pour lutter de manière optimale contre le SO.

Ainsi, l'objectif de ce travail était d'évaluer l'effet de différentes prises en charge (complément alimentaire ou activité physique) proposées de manière additionnelle ou alternative au traitement insulinique classique sur la réduction du SO, dans l'objectif futur de prévenir/retarder les complications associées au diabète de type 1 sur le long terme.

Dans nos deux premières études, nous avons mis en évidence l'intérêt d'un complément alimentaire à base de soja, le PFS, dans la prise en charge du diabète de type 1. Nous avons démontré que le PFS exerçait, *in vivo*, des effets antioxydants, en renforçant le système de défense enzymatique, des effets anti-inflammatoires, et améliorait le métabolisme glucidique, probablement en favorisant le captage de glucose au niveau musculaire.

Dans notre troisième étude, nous avons démontré que l'association du traitement à l'insuline et d'un entraînement en endurance est nécessaire pour bénéficier pleinement des effets bénéfiques respectifs de ces deux prises en charge. La régulation de la glycémie par l'insulinothérapie est nécessaire pour que l'entraînement exerce un effet antioxydant, et à l'inverse, l'entraînement permet de renforcer l'efficacité du traitement à l'insuline, notamment en prolongeant la durée de son action.

La quatrième étude a montré que ces deux prises en charge se révélaient également efficaces pour limiter la production aortique de l'anion superoxyde, responsable principal des dysfonctions endothéliales dans le diabète, et qu'elles agissaient par des mécanismes différents. Leur association ne présente toutefois pas d'effets additifs.

Enfin, la dernière étude a tenté de discriminer la part des effets bénéfiques revenant à la régulation de la glycémie, de celle revenant aux effets antioxydants des prises en charge testées (traitement à l'insuline et entraînement). La compréhension des mécanismes mis en jeu dans les adaptations observées a nécessité la mise au point d'une nouvelle technique d'analyse, actuellement en cours.

Conclusion

Ces travaux de thèse ont étudié, pour mieux les comprendre, les adaptations de la balance oxydante en réponse à une prise en charge globale du diabète de type 1, telle qu'elle peut se faire chez l'Homme. L'originalité de notre approche, à la fois dans le modèle expérimental (diabète induit par streptozotocine) et dans les protocoles d'étude, était de proposer des prises en charge physiologiques (dose d'antioxydants, insulinothérapie, protocole d'entraînement) qui pourraient, par la suite, être aisément transposables à l'Homme. Ces prises en charge (complément alimentaire et activité physique), non médicamenteuses, s'intègrent à une hygiène de vie globale. L'intérêt est de susciter l'adhésion des patients, déjà soumis à un protocole médical très lourd, à de nouvelles prises en charge qui ne seraient pas perçues comme une médication supplémentaire.

Par ailleurs, ce travail démontre la place prépondérante de l'activité physique en général, dans la prise en charge des pathologies, pour profiter à la fois de ses bénéfices dans la dimension sociale (amélioration du bien-être et de l'intégration sociale des sujets diabétiques) et dans la dimension physiologique (effets antioxydants, potentialisateur de l'insulinothérapie...).

Enfin, nous nous sommes efforcés tout au long de ces travaux, de poser un regard critique sur les techniques employées pour répondre à nos questions, ce qui nécessite la mise au point de nouvelles techniques ou l'amélioration de techniques existantes.

Nous espérons que ces travaux permettront, pour les patients atteints de diabète de type 1, de bénéficier d'une meilleure prise en charge visant à réduire leurs complications les plus sévères, et pour les scientifiques, de bénéficier de nouvelles techniques pertinentes pour l'analyse des mécanismes impliqués.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bibliographie

- The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med.* 1993 329(14): 977-86.
- Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial. The Diabetes Control and Complications (DCCT) Research Group. *Kidney Int.* 1995 47(6): 1703-20.
- The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the diabetes control and complications trial. *Diabetes.* 1995 44(8): 968-83.
- Influence of intensive diabetes treatment on quality-of-life outcomes in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care.* 1996 19(3): 195-203.
- Hypoglycemia in the Diabetes Control and Complications Trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Diabetes.* 1997 46(2): 271-86.
- Influence of intensive diabetes treatment on body weight and composition of adults with type 1 diabetes in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care.* 2001 24(10): 1711-21.
- Standards of medical care in diabetes--2011. *Diabetes Care.* 2011 34 Suppl 1: S11-61.
- Abiru, N., Kawasaki, E. and Eguchi, K. Current knowledge of Japanese type 1 diabetic syndrome. *Diabetes Metab Res Rev.* 2002 18(5): 357-66.
- ADA, A. D. A. Standards of medical care in diabetes--2011. *Diabetes Care.* 2011 34 Suppl 1: S11-61.
- Adachi, T., Ohta, H., Hirano, K., Hayashi, K. and Marklund, S. L. Non-enzymic glycation of human extracellular superoxide dismutase. *Biochem J.* 1991 279 (Pt 1): 263-7.
- Adams, V., Linke, A., Krankel, N., Erbs, S., Gielen, S., Mobius-Winkler, S., Gummert, J. F., Mohr, F. W., Schuler, G. and Hambrecht, R. Impact of regular physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2005 111(5): 555-62.
- Adlercreutz, H. Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ Health Perspect.* 1995 103 Suppl 7: 103-12.
- Ahmed, N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005 67(1): 3-21.
- Akerblom, H. K., Vaarala, O., Hyoty, H., Ilonen, J. and Knip, M. Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. *Am J Med Genet.* 2002 115(1): 18-29.
- Akil, M., Gurbuz, U., Bicer, M., Sivrikaya, A., Mogulkoc, R. and Baltaci, A. K. Effect of selenium supplementation on lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and lactate levels in rats immediately after acute swimming exercise. *Biol Trace Elem Res.* 2011 142(3): 651-9.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. and Fukami, Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem.* 1987 262(12): 5592-5.
- Alberti, K. G. and Zimmet, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998 15(7): 539-53.
- Alezandro, M. R., Granato, D., Lajolo, F. M. and Genovese, M. I. Nutritional aspects of second generation soy foods. *J Agric Food Chem.* 2011 59(10): 5490-7.
- Aliev, G., Shi, J., Perry, G., Friedland, R. P. and Lamanna, J. C. Decreased constitutive nitric oxide synthase, but increased inducible nitric oxide synthase and endothelin-1 immunoreactivity in aortic endothelial cells of donryu rats on a cholesterol-enriched diet. *Anat Rec.* 2000 260(1): 16-25.
- Alipour, M., Salehi, I. and Ghadiri Soufi, F. Effect of exercise on diabetes-induced oxidative stress in the rat hippocampus. *Iran Red Crescent Med J.* 2012 14(4): 222-8.
- Alles, M. S., Hartemink, R., Meyboom, S., Harryvan, J. L., Van Laere, K. M., Nagengast, F. M. and Hautvast, J. G. Effect of transgalactooligosaccharides on the composition of the human intestinal microflora and on putative risk markers for colon cancer. *Am J Clin Nutr.* 1999 69(5): 980-91.
- Anderson, J. W., Smith, B. M. and Washnock, C. S. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. *Am J Clin Nutr.* 1999 70(3 Suppl): 464S-74S.
- Andrew, P. J. and Mayer, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res.* 1999 43(3): 521-31.

Bibliographie

- Ankrah, N. A. and Appiah-Opong, R. Toxicity of low levels of methylglyoxal: depletion of blood glutathione and adverse effect on glucose tolerance in mice. *Toxicol Lett.* 1999 109(1-2): 61-7.
- Arai, K., Iizuka, S., Tada, Y., Oikawa, K. and Taniguchi, N. Increase in the glycosylated form of erythrocyte Cu-Zn-superoxide dismutase in diabetes and close association of the nonenzymatic glycosylation with the enzyme activity. *Biochim Biophys Acta.* 1987 924(2): 292-6.
- Arai, K., Maguchi, S., Fujii, S., Ishibashi, H., Oikawa, K. and Taniguchi, N. Glycation and inactivation of human Cu-Zn-superoxide dismutase. Identification of the in vitro glycated sites. *J Biol Chem.* 1987 262(35): 16969-72.
- Arai, Y., Uehara, M., Sato, Y., Kimira, M., Eboshida, A., Adlercreutz, H. and Watanabe, S. Comparison of isoflavones among dietary intake, plasma concentration and urinary excretion for accurate estimation of phytoestrogen intake. *J Epidemiol.* 2000 10(2): 127-35.
- Ardigo, S. and Philippe, J. [Hypoglycemia and diabetes]. *Rev Med Suisse.* 2008 4(160): 1376-8, 80-2.
- Aronson, D. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. *Adv Cardiol.* 2008 45: 1-16.
- Arora, A., Nair, M. G. and Strasburg, G. M. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Arch Biochem Biophys.* 1998 356(2): 133-41.
- Ashwell, S. G. and Home, P. D. Insulin glargine: the first clinically useful extended-action insulin analogue. *Expert Opin Pharmacother.* 2001 2(11): 1891-902.
- Atalay, M., Laaksonen, D. E., Niskanen, L., Uusitupa, M., Hanninen, O. and Sen, C. K. Altered antioxidant enzyme defences in insulin-dependent diabetic men with increased resting and exercise-induced oxidative stress. *Acta Physiol Scand.* 1997 161(2): 195-201.
- Atalay, M., Oksala, N. K., Laaksonen, D. E., Khanna, S., Nakao, C., Lappalainen, J., Roy, S., Hanninen, O. and Sen, C. K. Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats. *J Appl Physiol.* 2004 97(2): 605-11.
- Atkinson, M. A. and Leiter, E. H. The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? *Nat Med.* 1999 5(6): 601-4.
- Babior, B. M. NADPH oxidase: an update. *Blood.* 1999 93(5): 1464-76.
- Baldwin, J. S., Lee, L., Leung, T. K., Muruganandam, A. and Mutus, B. Identification of the site of non-enzymatic glycation of glutathione peroxidase: rationalization of the glycation-related catalytic alterations on the basis of three-dimensional protein structure. *Biochim Biophys Acta.* 1995 1247(1): 60-4.
- Balon, T. W. and Nadler, J. L. Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1997 82(1): 359-63.
- Bantle, J. P., Wylie-Rosett, J., Albright, A. L., Apovian, C. M., Clark, N. G., Franz, M. J., Hoogwerf, B. J., Lichtenstein, A. H., Mayer-Davis, E., Mooradian, A. D. and Wheeler, M. L. Nutrition recommendations and interventions for diabetes--2006: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 2006 29(9): 2140-57.
- Barbieri, E. and Sestili, P. Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. *J Signal Transduct.* 2012 2012: 982794.
- Barbosa, A. C., Lajolo, F. M. and Genovese, M. I. Effect of free or protein-associated soy isoflavones on the antioxidant status in rats. *J Sci Food Agric.* 2011 91(4): 721-31.
- Barnes, S. Evolution of the health benefits of soy isoflavones. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1998 217(3): 386-92.
- Barnett, A. H. A review of basal insulins. *Diabet Med.* 2003 20(11): 873-85.
- Barnett, A. H. Insulin glargine in the treatment of type 1 and type 2 diabetes. *Vasc Health Risk Manag.* 2006 2(1): 59-67.
- Barouki, R. and Morel, Y. [Oxidative stress and gene expression]. *J Soc Biol.* 2001 195(4): 377-82.
- Bartosz, G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol.* 2009 77(8): 1303-15.
- Baynes, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes.* 1991 40(4): 405-12.
- Baynes, J. W. AGEing growth factors: a role in diabetic vascular disease? *J Clin Invest.* 1994 94(1): 2.
- Baynes, J. W. and Thorpe, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes.* 1999 48(1): 1-9.

Bibliographie

- Berger, M., Berchtold, P., Cuppers, H. J., Drost, H., Kley, H. K., Muller, W. A., Wiegelmann, W., Zimmermann-Telschow, H., Gries, F. A., Kruskemper, H. L. and Zimmermann, H. Metabolic and hormonal effects of muscular exercise in juvenile type diabetics. *Diabetologia*. 1977 13(4): 355-65.
- Bernardini, A. L., Vanelli, M., Chiari, G., Iovane, B., Gelmetti, C., Vitale, R. and Errico, M. K. Adherence to physical activity in young people with type 1 diabetes. *Acta Biomed*. 2004 75(3): 153-7.
- Bicer, M., Gunay, M., Baltaci, A. K., Uney, K., Mogulkoc, R. and Akil, M. Effect of zinc supplementation on lipid peroxidation and lactate levels in rats with diabetes induced by streptozotocin and subjected to acute swimming exercise. *Bratisl Lek Listy*. 2012 113(4): 199-205.
- Bierhaus, A., Chevion, S., Chevion, M., Hofmann, M., Quehenberger, P., Illmer, T., Luther, T., Berentshtein, E., Tritschler, H., Muller, M., Wahl, P., Ziegler, R. and Nawroth, P. P. Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes*. 1997 46(9): 1481-90.
- Bierhaus, A., Hofmann, M. A., Ziegler, R. and Nawroth, P. P. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res*. 1998 37(3): 586-600.
- Bister, V., Kolho, K. L., Karikoski, R., Westerholm-Ormio, M., Savilahti, E. and Saarialho-Kere, U. Metalloelastase (MMP-12) is upregulated in the gut of pediatric patients with potential celiac disease and in type 1 diabetes. *Scand J Gastroenterol*. 2005 40(12): 1413-22.
- Blanas, E., Carbone, F. R., Allison, J., Miller, J. F. and Heath, W. R. Induction of autoimmune diabetes by oral administration of autoantigen. *Science*. 1996 274(5293): 1707-9.
- Blaut, M. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *Eur J Nutr*. 2002 41 Suppl 1: I11-6.
- Blay, M., Espinel, A. E., Delgado, M. A., Baiges, I., Blade, C., Arola, L. and Salvado, J. Isoflavone effect on gene expression profile and biomarkers of inflammation. *J Pharm Biomed Anal*. 2010 51(2): 382-90.
- Bohr, V. A., Stevnsner, T. and de Souza-Pinto, N. C. Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. *Gene*. 2002 286(1): 127-34.
- Bonnefont-Rousselot, D., Bastard, J. P., Jaudon, M. C. and Delattre, J. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab*. 2000 26(3): 163-76.
- Borras, C., Gambini, J., Gomez-Cabrera, M. C., Sastre, J., Pallardo, F. V., Mann, G. E. and Vina, J. Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NFkappaB. *FASEB J*. 2006 20(12): 2136-8.
- Borras, C., Gambini, J., Lopez-Gruoso, R., Pallardo, F. V. and Vina, J. Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2010 1802(1): 205-11.
- Boulton, A. J., Vinik, A. I., Arezzo, J. C., Bril, V., Feldman, E. L., Freeman, R., Malik, R. A., Maser, R. E., Sosenko, J. M. and Ziegler, D. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2005 28(4): 956-62.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 72: 248-54.
- Brown, C. T., Davis-Richardson, A. G., Giongo, A., Gano, K. A., Crabb, D. B., Mukherjee, N., Casella, G., Drew, J. C., Ilonen, J., Knip, M., Hyoty, H., Veijola, R., Simell, T., Simell, O., Neu, J., Wasserfall, C. H., Schatz, D., Atkinson, M. A. and Triplett, E. W. Gut microbiome metagenomics analysis suggests a functional model for the development of autoimmunity for type 1 diabetes. *PLoS One*. 2011 6(10): e25792.
- Brownlee, M. The pathological implications of protein glycation. *Clin Invest Med*. 1995 18(4): 275-81.
- 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.
- Brownlee, M., Vlassara, H. and Cerami, A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med*. 1984 101(4): 527-37.
- Bussau, V. A., Ferreira, L. D., Jones, T. W. and Fournier, P. A. The 10-s maximal sprint: a novel approach to counter an exercise-mediated fall in glycemia in individuals with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2006 29(3): 601-6.

Bibliographie

- Bussau, V. A., Ferreira, L. D., Jones, T. W. and Fournier, P. A. A 10-s sprint performed prior to moderate-intensity exercise prevents early post-exercise fall in glycaemia in individuals with type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2007 50(9): 1815-8.
- Cai, H. and Harrison, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000 87(10): 840-4.
- Cai, Q. and Wei, H. Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice. *Nutr Cancer*. 1996 25(1): 1-7.
- Cakatay, U., Telci, A., Salman, S., Satman, L. and Sivas, A. Oxidative protein damage in type I diabetic patients with and without complications. *Endocr Res*. 2000 26(3): 365-79.
- Calcinaro, F., Dionisi, S., Marinaro, M., Candeloro, P., Bonato, V., Marzotti, S., Corneli, R. B., Ferretti, E., Gulino, A., Grasso, F., De Simone, C., Di Mario, U., Falorni, A., Boirivant, M. and Dotta, F. Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia*. 2005 48(8): 1565-75.
- Cameron, N. E., Cotter, M. A., Horrobin, D. H. and Tritschler, H. J. Effects of alpha-lipoic acid on neurovascular function in diabetic rats: interaction with essential fatty acids. *Diabetologia*. 1998 41(4): 390-9.
- Cao, G., Alessio, H. M. and Cutler, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med*. 1993 14(3): 303-11.
- Capeau, J. [Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]. *Med Sci (Paris)*. 2003 19(8-9): 834-9.
- Capron, L. [Atherosclerosis and cardio-vascular complications of diabetes]. *Ann Endocrinol (Paris)*. 1996 57(3): 161-5.
- Cardenas, C., Bordiu, E., Bagazgoitia, J. and Calle-Pascual, A. L. Polyunsaturated fatty acid consumption may play a role in the onset and regression of microalbuminuria in well-controlled type 1 and type 2 diabetic people: a 7-year, prospective, population-based, observational multicenter study. *Diabetes Care*. 2004 27(6): 1454-7.
- Carey, P. E., Halliday, J., Snaar, J. E., Morris, P. G. and Taylor, R. Direct assessment of muscle glycogen storage after mixed meals in normal and type 2 diabetic subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 284(4): E688-94.
- Carral San Laureano, F., Gutierrez Manzanedo, J. V., Ayala Ortega, C., Garcia Calzado, C., Silva Rodriguez, J. J. and Aguilar Diosdado, M. [Impact of physical activity on metabolic control and the development of chronic complications in patients with type 1 diabetes mellitus]. *Endocrinol Nutr*. 2010 57(6): 268-76.
- Ceriello, A., dello Russo, P., Amstad, P. and Cerutti, P. High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes*. 1996 45(4): 471-7.
- Ceriello, A., Giugliano, D., Quatraro, A., Dello Russo, P. and Lefebvre, P. J. Metabolic control may influence the increased superoxide generation in diabetic serum. *Diabet Med*. 1991 8(6): 540-2.
- Chang, H. C., Churchwell, M. I., Delclos, K. B., Newbold, R. R. and Doerge, D. R. Mass spectrometric determination of Genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. *J Nutr*. 2000 130(8): 1963-70.
- Chang, K. C., Chung, S. Y., Chong, W. S., Suh, J. S., Kim, S. H., Noh, H. K., Seong, B. W., Ko, H. J. and Chun, K. W. Possible superoxide radical-induced alteration of vascular reactivity in aortas from streptozotocin-treated rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993 266(2): 992-1000.
- Charles, C., Yuskavage, J., Carlson, O., John, M., Tagalicud, A. S., Maggio, M., Muller, D. C., Egan, J. and Basaria, S. Effects of high-dose isoflavones on metabolic and inflammatory markers in healthy postmenopausal women. *Menopause*. 2009 16(2): 395-400.
- Chast, F. [Apollinaire Bouchardat, pharmacist, nutritionist]. *Ann Pharm Fr*. 2000 58(6 Suppl): 435-42.
- Chen, H., Li, X. and Epstein, P. N. MnSOD and catalase transgenes demonstrate that protection of islets from oxidative stress does not alter cytokine toxicity. *Diabetes*. 2005 54(5): 1437-46.
- Chen, S. W., Zhang, L. S., Zhang, H. M. and Feng, X. F. [Effects of soy isoflavone on levels of low-grade inflammatory peptides in rats with insulin resistance]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2006 26(10): 1484-6.

Bibliographie

- Chen, V. and Ianuzzo, C. D. Dosage effect of streptozotocin on rat tissue enzyme activities and glycogen concentration. *Can J Physiol Pharmacol.* 1982 60(10): 1251-6.
- Cherednichenko, G., Zima, A. V., Feng, W., Schaefer, S., Blatter, L. A. and Pessah, I. N. NADH oxidase activity of rat cardiac sarcoplasmic reticulum regulates calcium-induced calcium release. *Circ Res.* 2004 94(4): 478-86.
- Chillaron, J. J., Goday, A., Flores-Le-Roux, J. A., Benaiges, D., Carrera, M. J., Puig, J., Cano-Perez, J. F. and Pedro-Botet, J. Estimated glucose disposal rate in assessment of the metabolic syndrome and microvascular complications in patients with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 94(9): 3530-4.
- Choi, M. S., Jung, U. J., Yeo, J., Kim, M. J. and Lee, M. K. Genistein and daidzein prevent diabetes onset by elevating insulin level and altering hepatic gluconeogenic and lipogenic enzyme activities in non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metab Res Rev.* 2008 24(1): 74-81.
- Chugh, S. N., Kakkar, R., Kalra, S. and Sharma, A. An evaluation of oxidative stress in diabetes mellitus during uncontrolled and controlled state and after vitamin E supplementation. *J Assoc Physicians India.* 1999 47(4): 380-3.
- Chun, O. K., Chung, S. J., Claycombe, K. J. and Song, W. O. Serum C-reactive protein concentrations are inversely associated with dietary flavonoid intake in U.S. adults. *J Nutr.* 2008 138(4): 753-60.
- Chung, S. S., Ho, E. C., Lam, K. S. and Chung, S. K. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol.* 2003 14(8 Suppl 3): S233-6.
- Ciechanowski, K., Kedzierska, K., Golembiewska, E., Safranow, K., Bober, J., Domanski, L., Rozanski, J. and Myslak, M. Impaired synthesis is not the reason for decreased activity of extracellular superoxide dismutase in patients with diabetes. *Arch Med Res.* 2005 36(2): 148-53.
- Clark, M. G., Wallis, M. G., Barrett, E. J., Vincent, M. A., Richards, S. M., Clerk, L. H. and Rattigan, S. Blood flow and muscle metabolism: a focus on insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 284(2): E241-58.
- Cline, G. W., Magnusson, I., Rothman, D. L., Petersen, K. F., Laurent, D. and Shulman, G. I. Mechanism of impaired insulin-stimulated muscle glucose metabolism in subjects with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1997 99(9): 2219-24.
- Cohen, G. and Heikkila, R. E. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J Biol Chem.* 1974 249(8): 2447-52.
- Collins, A. R., Raslova, K., Somorovska, M., Petrovska, H., Ondrusova, A., Vohnout, B., Fabry, R. and Dusinska, M. DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Radic Biol Med.* 1998 25(3): 373-7.
- Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A. and Oter, S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res.* 2005 51(2): 117-23.
- Coskun, O., Ocakci, A., Bayraktaroglu, T. and Kanter, M. Exercise training prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Tohoku J Exp Med.* 2004 203(3): 145-54.
- Coux, O., Tanaka, K. and Goldberg, A. L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem.* 1996 65: 801-47.
- Crouch, R. K., Gandy, S. E., Kimsey, G., Galbraith, R. A., Galbraith, G. M. and Buse, M. G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes.* 1981 30(3): 235-41.
- Dandona, P. Endothelium, inflammation, and diabetes. *Curr Diab Rep.* 2002 2(4): 311-5.
- Dandona, P., Chaudhuri, A., Ghanim, H. and Mohanty, P. Proinflammatory effects of glucose and anti-inflammatory effect of insulin: relevance to cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2007 99(4A): 15B-26B.
- Dandona, P., Thusu, K., Cook, S., Snyder, B., Makowski, J., Armstrong, D. and Nicotera, T. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet.* 1996 347(8999): 444-5.
- Daneman, D. Type 1 diabetes. *Lancet.* 2006 367(9513): 847-58.

Bibliographie

- Davi, G., Chiarelli, F., Santilli, F., Pomilio, M., Vigneri, S., Falco, A., Basili, S., Ciabattone, G. and Patrono, C. Enhanced lipid peroxidation and platelet activation in the early phase of type 1 diabetes mellitus: role of interleukin-6 and disease duration. *Circulation*. 2003 107(25): 3199-203.
- Davi, G., Ciabattone, G., Consoli, A., Mezzetti, A., Falco, A., Santarone, S., Pennese, E., Vitacolonna, E., Bucciarelli, T., Costantini, F., Capani, F. and Patrono, C. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f₂alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation*. 1999 99(2): 224-9.
- David, S. S., O'Shea, V. L. and Kundu, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*. 2007 447(7147): 941-50.
- Davison, G. W., Ashton, T., George, L., Young, I. S., McEneny, J., Davies, B., Jackson, S. K., Peters, J. R. and Bailey, D. M. Molecular detection of exercise-induced free radicals following ascorbate prophylaxis in type 1 diabetes mellitus: a randomised controlled trial. *Diabetologia*. 2008 51(11): 2049-59.
- Davison, G. W., George, L., Jackson, S. K., Young, I. S., Davies, B., Bailey, D. M., Peters, J. R. and Ashton, T. Exercise, free radicals, and lipid peroxidation in type 1 diabetes mellitus. *Free Radic Biol Med*. 2002 33(11): 1543-51.
- DCCTRG. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med*. 1993 329(14): 977-86.
- De Feo, P., Di Loreto, C., Ranchelli, A., Fatone, C., Gambelunghe, G., Lucidi, P. and Santeusano, F. Exercise and diabetes. *Acta Biomed*. 2006 77 Suppl 1: 14-7.
- De Vriese, A. S., Verbeuren, T. J., Van de Voorde, J., Lameire, N. H. and Vanhoutte, P. M. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol*. 2000 130(5): 963-74.
- DeFronzo, R. A., Simonson, D. and Ferrannini, E. Hepatic and peripheral insulin resistance: a common feature of type 2 (non-insulin-dependent) and type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1982 23(4): 313-9.
- Delahanty, L. M. and Halford, B. N. The role of diet behaviors in achieving improved glycemic control in intensively treated patients in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care*. 1993 16(11): 1453-8.
- Devaraj, S., Dasu, M. R. and Jialal, I. Diabetes is a proinflammatory state: a translational perspective. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 2010 5(1): 19-28.
- Devasagayam, T. P., Tilak, J. C., Boloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S. and Lele, R. D. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India*. 2004 52: 794-804.
- Dhindsa, S., Tripathy, D., Mohanty, P., Ghanim, H., Syed, T., Aljada, A. and Dandona, P. Differential effects of glucose and alcohol on reactive oxygen species generation and intranuclear nuclear factor-kappaB in mononuclear cells. *Metabolism*. 2004 53(3): 330-4.
- Dikalova, A. E., Gongora, M. C., Harrison, D. G., Lambeth, J. D., Dikalov, S. and Griendling, K. K. Upregulation of Nox1 in vascular smooth muscle leads to impaired endothelium-dependent relaxation via eNOS uncoupling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 299(3): H673-9.
- Djuric, Z., Chen, G., Doerge, D. R., Heilbrun, L. K. and Kucuk, O. Effect of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women. *Cancer Lett*. 2001 172(1): 1-6.
- Doerge, D. R. and Sheehan, D. M. Goitrogenic and estrogenic activity of soy isoflavones. *Environ Health Perspect*. 2002 110 Suppl 3: 349-53.
- Dogan, A., Yarlioglues, M., Kaya, M. G., Karadag, Z., Dogan, S., Ardic, I., Dogdu, O., Kilinc, Y., Zencir, C., Akpek, M., Ozdogru, I., Oguzhan, A. and Kalay, N. Effect of long-term and high-dose allopurinol therapy on endothelial function in normotensive diabetic patients. *Blood Press*. 2011 20(3): 182-7.
- Durak, E. P., Jovanovic-Peterson, L. and Peterson, C. M. Randomized crossover study of effect of resistance training on glycemic control, muscular strength, and cholesterol in type I diabetic men. *Diabetes Care*. 1990 13(10): 1039-43.
- Efstathiou, T., Driss, Fathi. Method for production of active extracts from soya beans and corresponding uses of the produced extracts, Sojasun Technologies.2010.

Bibliographie

- Eisenbarth, G. S. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med.* 1986 314(21): 1360-8.
- Elangovan, V., Shohami, E., Gati, I. and Kohen, R. Increased hepatic lipid soluble antioxidant capacity as compared to other organs of streptozotocin-induced diabetic rats: a cyclic voltammetry study. *Free Radic Res.* 2000 32(2): 125-34.
- Engelman, H. M., Alekel, D. L., Hanson, L. N., Kanthasamy, A. G. and Reddy, M. B. Blood lipid and oxidative stress responses to soy protein with isoflavones and phytic acid in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 2005 81(3): 590-6.
- Espinosa, A., Leiva, A., Pena, M., Muller, M., Debandi, A., Hidalgo, C., Carrasco, M. A. and Jaimovich, E. Myotube depolarization generates reactive oxygen species through NAD(P)H oxidase; ROS-elicited Ca²⁺ stimulates ERK, CREB, early genes. *J Cell Physiol.* 2006 209(2): 379-88.
- Esposito, K., Nappo, F., Marfella, R., Giugliano, G., Giugliano, F., Ciotola, M., Quagliari, L., Ceriello, A. and Giugliano, D. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation.* 2002 106(16): 2067-72.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H. and Jurgens, G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med.* 1992 13(4): 341-90.
- Exner, M., Hermann, M., Hofbauer, R., Kapiotis, S., Quehenberger, P., Speiser, W., Held, I. and Gmeiner, B. M. Genistein prevents the glucose autoxidation mediated atherogenic modification of low density lipoprotein. *Free Radic Res.* 2001 34(1): 101-12.
- Fang, Y. C., Chen, B. H., Huang, R. F. and Lu, Y. F. Effect of genistein supplementation on tissue genistein and lipid peroxidation of serum, liver and low-density lipoprotein in hamsters. *J Nutr Biochem.* 2004 15(3): 142-8.
- Farrace, S. and Rossetti, L. Hyperglycemia markedly enhances skeletal muscle glycogen synthase activity in diabetic, but not in normal conscious rats. *Diabetes.* 1992 41(11): 1453-63.
- Faure, P., Corticelli, P., Richard, M. J., Arnaud, J., Coudray, C., Halimi, S., Favier, A. and Roussel, A. M. Lipid peroxidation and trace element status in diabetic ketotic patients: influence of insulin therapy. *Clin Chem.* 1993 39(5): 789-93.
- Fayh, A. P., Krause, M., Rodrigues-Krause, J., Ribeiro, J. L., Ribeiro, J. P., Friedman, R., Moreira, J. C. and Reischak-Oliveira, A. Effects of L-arginine supplementation on blood flow, oxidative stress status and exercise responses in young adults with uncomplicated type I diabetes. *Eur J Nutr.* 2012.
- FDA. Food labeling: health claims; soy protein and coronary heart disease. Food and Drug Administration, HHS. Final rule. *Fed Regist.* 1999 64(206): 57700-33.
- Feillet-Coudray, C., Rock, E., Coudray, C., Grzelkowska, K., Azais-Braesco, V., Dardevet, D. and Mazur, A. Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental diabetes. *Clin Chim Acta.* 1999 284(1): 31-43.
- Ferreira, L. D., Brau, L., Nikolovski, S., Raja, G., Palmer, T. N. and Fournier, P. A. Effect of streptozotocin-induced diabetes on glycogen resynthesis in fasted rats post-high-intensity exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 280(1): E83-91.
- FID. Atlas du diabète de la FID. 2011.
- Flores, L., Rodela, S., Abian, J., Claria, J. and Esmatjes, E. F2 isoprostane is already increased at the onset of type 1 diabetes mellitus: effect of glycemetic control. *Metabolism.* 2004 53(9): 1118-20.
- Fong, D. S., Aiello, L. P., Ferris, F. L., 3rd and Klein, R. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care.* 2004 27(10): 2540-53.
- Forman, H. J., Torres, M. and Fukuto, J. Redox signaling. *Mol Cell Biochem.* 2002 234-235(1-2): 49-62.
- Franz, M. J., Bantle, J. P., Beebe, C. A., Brunzell, J. D., Chiasson, J. L., Garg, A., Holzmeister, L. A., Hoogwerf, B., Mayer-Davis, E., Mooradian, A. D., Purnell, J. Q. and Wheeler, M. Evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications. *Diabetes Care.* 2002 25(1): 148-98.
- Fukagawa, N. K., Li, M., Liang, P., Russell, J. C., Sobel, B. E. and Absher, P. M. Aging and high concentrations of glucose potentiate injury to mitochondrial DNA. *Free Radic Biol Med.* 1999 27(11-12): 1437-43.
- Gandy, S. E., 3rd, Galbraith, R. A., Crouch, R. K., Buse, M. G. and Galbraith, G. M. Superoxide dismutase in human islets of Langerhans. *N Engl J Med.* 1981 304(25): 1547-8.

Bibliographie

- Gandy, S. E., Buse, M. G. and Crouch, R. K. Protective role of superoxide dismutase against diabetogenic drugs. *J Clin Invest.* 1982 70(3): 650-8.
- Gao, L. and Mann, G. E. Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: a double-edged sword in redox signalling. *Cardiovasc Res.* 2009 82(1): 9-20.
- Giacco, F. and Brownlee, M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res.* 2010 107(9): 1058-70.
- Giannini, C., Lombardo, F., Curro, F., Pomilio, M., Bucciarelli, T., Chiarelli, F. and Mohn, A. Effects of high-dose vitamin E supplementation on oxidative stress and microalbuminuria in young adult patients with childhood onset type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev.* 2007 23(7): 539-46.
- Giardino, I., Edelstein, D. and Brownlee, M. Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes. *J Clin Invest.* 1994 94(1): 110-7.
- Giardino, I., Edelstein, D. and Brownlee, M. BCL-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation endproducts in bovine endothelial cells. *J Clin Invest.* 1996 97(6): 1422-8.
- Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995 125(6): 1401-12.
- Gil-del Valle, L., de la, C. M. L., Toledo, A., Vilaro, N., Tapanes, R. and Otero, M. A. Altered redox status in patients with diabetes mellitus type I. *Pharmacol Res.* 2005 51(4): 375-80.
- Gillery, P., Monboisse, J. C., Maquart, F. X. and Borel, J. P. Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabete Metab.* 1988 14(1): 25-30.
- Giongo, A., Gano, K. A., Crabb, D. B., Mukherjee, N., Novelo, L. L., Casella, G., Drew, J. C., Ilonen, J., Knip, M., Hyoty, H., Veijola, R., Simell, T., Simell, O., Neu, J., Wasserfall, C. H., Schatz, D., Atkinson, M. A. and Triplett, E. W. Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. *ISME J.* 2011 5(1): 82-91.
- Gleisner, A., Martinez, L., Pino, R., Rojas, I. G., Martinez, A., Asenjo, S. and Rudolph, M. I. Oxidative stress markers in plasma and urine of prepubertal patients with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2006 19(8): 995-1000.
- Goldstein, B. J., Mahadev, K., Wu, X., Zhu, L. and Motoshima, H. Role of insulin-induced reactive oxygen species in the insulin signaling pathway. *Antioxid Redox Signal.* 2005 7(7-8): 1021-31.
- Gomez-Cabrera, M. C., Domenech, E. and Vina, J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med.* 2008 44(2): 126-31.
- Graham, S., Courtois, P., Malaisse, W. J., Rozing, J., Scott, F. W. and Mowat, A. M. Enteropathy precedes type 1 diabetes in the BB rat. *Gut.* 2004 53(10): 1437-44.
- Grassi, D., Lippi, C., Necozione, S., Desideri, G. and 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.
- Green, K., Brand, M. D. and Murphy, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes.* 2004 53 Suppl 1: S110-8.
- Griesmacher, A., Kindhauser, M., Andert, S. E., Schreiner, W., Toma, C., Knoebl, P., Pietschmann, P., Prager, R., Schnack, C., Schernthaner, G. and et al. Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid-reactive substances in diabetes mellitus. *Am J Med.* 1995 98(5): 469-75.
- Grimaldi, A., Ed. *Traité de diabétologie* 2ème édition. 2009, Flammarion.
- Grimaldi, A. and Heurtier, A. [Epidemiology of cardio-vascular complications of diabetes]. *Diabetes Metab.* 1999 25 Suppl 3: 12-20.
- Gross, J. L., de Azevedo, M. J., Silveiro, S. P., Canani, L. H., Caramori, M. L. and Zelmanovitz, T. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care.* 2005 28(1): 164-76.
- Grover, J. K., Vats, V. and Yadav, S. Effect of feeding aqueous extract of *Pterocarpus marsupium* on glycogen content of tissues and the key enzymes of carbohydrate metabolism. *Mol Cell Biochem.* 2002 241(1-2): 53-9.

Bibliographie

- Gudbrandsen, O. A., Wergedahl, H. and Berge, R. K. A casein diet added isoflavone-enriched soy protein favorably affects biomarkers of steatohepatitis in obese Zucker rats. *Nutrition*. 2009 25(5): 574-80.
- Guelfi, K. J., Jones, T. W. and Fournier, P. A. The decline in blood glucose levels is less with intermittent high-intensity compared with moderate exercise in individuals with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2005 28(6): 1289-94.
- Guelfi, K. J., Jones, T. W. and Fournier, P. A. Intermittent high-intensity exercise does not increase the risk of early postexercise hypoglycemia in individuals with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2005 28(2): 416-8.
- Guelfi, K. J., Ratnam, N., Smythe, G. A., Jones, T. W. and Fournier, P. A. Effect of intermittent high-intensity compared with continuous moderate exercise on glucose production and utilization in individuals with type 1 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 292(3): E865-70.
- Gul, H. I., Gul, M. and Hanninen, O. Cytotoxic activities of some mono and bis Mannich bases derived from acetophenone in brine shrimp bioassay. *Arzneimittelforschung*. 2002 52(11): 840-3.
- Gul, M., Atalay, M. and Hanninen, O. Endurance training and glutathione-dependant antioxidant defense mechanism in heart of the diabetic rats. *J Sci Med Sport*. 2003 2(2): 52-61.
- Gul, M., Laaksonen, D. E., Atalay, M., Vider, L. and Hanninen, 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.
- Gulve, E. A. Exercise and glycemic control in diabetes: benefits, challenges, and adjustments to pharmacotherapy. *Phys Ther*. 2008 88(11): 1297-321.
- Gutteridge, J. M. and Halliwell, B. Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin Haematol*. 1989 2(2): 195-256.
- Guzel, S., Seven, A., Satman, I. and Burcak, G. Comparison of oxidative stress indicators in plasma of recent-onset and long-term type 1 diabetic patients. *J Toxicol Environ Health A*. 2000 59(1): 7-14.
- Guzik, T. J., Mussa, S., Gastaldi, D., Sadowski, J., Ratnatunga, C., Pillai, R. and Channon, K. M. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002 105(14): 1656-62.
- Guzik, T. J., West, N. E., Black, E., McDonald, D., Ratnatunga, C., Pillai, R. and Channon, K. M. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res*. 2000 86(9): E85-90.
- Hagenfeldt, L. Metabolism of free fatty acids and ketone bodies during exercise in normal and diabetic man. *Diabetes*. 1979 28 Suppl 1: 66-70.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*. 1990 280(1): 1-8.
- Halse, R., Bonavaud, S. M., Armstrong, J. L., McCormack, J. G. and Yeaman, S. J. Control of glycogen synthesis by glucose, glycogen, and insulin in cultured human muscle cells. *Diabetes*. 2001 50(4): 720-6.
- Harmer, A. R., Chisholm, D. J., McKenna, M. J., Hunter, S. K., Ruell, P. A., Naylor, J. M., Maxwell, L. J. and Flack, J. R. Sprint training increases muscle oxidative metabolism during high-intensity exercise in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2008 31(11): 2097-102.
- Harmer, A. R., Chisholm, D. J., McKenna, M. J., Morris, N. R., Thom, J. M., Bennett, G. and Flack, J. R. High-intensity training improves plasma glucose and acid-base regulation during intermittent maximal exercise in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2007 30(5): 1269-71.
- Hayashi, T., Wojtaszewski, J. F. and Goodyear, L. J. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1997 273(6 Pt 1): E1039-51.
- Heinecke, J. W. Mechanisms of oxidative damage of low density lipoprotein in human atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 1997 8(5): 268-74.
- Herbst, A., Bachran, R., Kapellen, T. and Holl, R. W. Effects of regular physical activity on control of glycemia in pediatric patients with type 1 diabetes mellitus. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2006 160(6): 573-7.
- Herlein, J. A., Fink, B. D., O'Malley, Y. and Sivitz, W. I. Superoxide and respiratory coupling in mitochondria of insulin-deficient diabetic rats. *Endocrinology*. 2009 150(1): 46-55.

Bibliographie

- Hernandez-Marco, R., Codoner-Franch, P., Pons Morales, S., Del Castillo Villaescusa, C., Boix Garcia, L. and Valls Belles, V. Oxidant/antioxidant status and hyperfiltration in young patients with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Nephrol.* 2009 24(1): 121-7.
- Heyman, E., Toutain, C., Delamarche, P., Berthon, P., Briard, D., Youssef, H., Dekerdanet, M. and Gratas-Delamarche, A. Exercise training and cardiovascular risk factors in type 1 diabetic adolescent girls. *Pediatr Exerc Sci.* 2007 19(4): 408-19.
- Higuchi, Y. Lipid peroxides and alpha-tocopherol in rat streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Acta Med Okayama.* 1982 36(3): 165-75.
- Holloszy, J. O. Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity. *J Appl Physiol.* 2005 99(1): 338-43.
- Holma, R., Juvonen, P., Asmawi, M. Z., Vapaatalo, H. and Korpela, R. Galacto-oligosaccharides stimulate the growth of bifidobacteria but fail to attenuate inflammation in experimental colitis in rats. *Scand J Gastroenterol.* 2002 37(9): 1042-7.
- Horton, E. S. Exercise and diabetes mellitus. *Med Clin North Am.* 1988 72(6): 1301-21.
- Houston, M., Estevez, A., Chumley, P., Aslan, M., Marklund, S., Parks, D. A. and Freeman, B. A. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *J Biol Chem.* 1999 274(8): 4985-94.
- Hsu, W. T., Tsai, L. Y., Lin, S. K., Hsiao, J. K. and Chen, B. H. Effects of diabetes duration and glycemic control on free radicals in children with type 1 diabetes mellitus. *Ann Clin Lab Sci.* 2006 36(2): 174-8.
- Hu, C. C., Hsiao, C. H., Huang, S. Y., Fu, S. H., Lai, C. C., Hong, T. M., Chen, H. H. and Lu, F. J. Antioxidant activity of fermented soybean extract. *J Agric Food Chem.* 2004 52(18): 5735-9.
- Hunt, J. V. and Wolff, S. P. Is glucose the sole source of tissue browning in diabetes mellitus? *FEBS Lett.* 1990 269(1): 258-60.
- Hutchins, A. M., Slavin, J. L. and Lampe, J. W. Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. *J Am Diet Assoc.* 1995 95(5): 545-51.
- Huttunen, N. P., Lankela, S. L., Knip, M., Lautala, P., Kaar, M. L., Laasonen, K. and Puukka, R. Effect of once-a-week training program on physical fitness and metabolic control in children with IDDM. *Diabetes Care.* 1989 12(10): 737-40.
- Ibrahim, A. S., El-Shishtawy, M. M., Pena, A., Jr. and Liou, G. I. Genistein attenuates retinal inflammation associated with diabetes by targeting of microglial activation. *Mol Vis.* 2010 16: 2033-42.
- Ibrahim, W. H., Habib, H. M., Chow, C. K. and Bruckner, G. G. Isoflavone-rich soy isolate reduces lipid peroxidation in mouse liver. *Int J Vitam Nutr Res.* 2008 78(4-5): 217-22.
- Ingaramo, P. I., Ronco, M. T., Frances, D. E., Monti, J. A., Pisani, G. B., Ceballos, M. P., Galleano, M., Carrillo, M. C. and Carnovale, C. E. Tumor necrosis factor alpha pathways develops liver apoptosis in type 1 diabetes mellitus. *Mol Immunol.* 2011 48(12-13): 1397-407.
- Inkster, M. E., Cotter, M. A. and Cameron, N. E. Treatment with the xanthine oxidase inhibitor, allopurinol, improves nerve and vascular function in diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2007 561(1-3): 63-71.
- Iscoe, K. E. and Riddell, M. C. Continuous moderate-intensity exercise with or without intermittent high-intensity work: effects on acute and late glycaemia in athletes with Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2011 28(7): 824-32.
- Jacobson, A. M., Musen, G., Ryan, C. M., Silvers, N., Cleary, P., Waberski, B., Burwood, A., Weinger, K., Bayless, M., Dahms, W. and Harth, J. Long-term effect of diabetes and its treatment on cognitive function. *N Engl J Med.* 2007 356(18): 1842-52.
- Jakus, V. and Rietbrock, N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res.* 2004 53(2): 131-42.
- Javesghani, D., Magder, S. A., Barreiro, E., Quinn, M. T. and Hussain, S. N. Molecular characterization of a superoxide-generating NAD(P)H oxidase in the ventilatory muscles. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 165(3): 412-8.
- Ji, G., Yang, Q., Hao, J., Guo, L., Chen, X., Hu, J., Leng, L. and Jiang, Z. Anti-inflammatory effect of genistein on non-alcoholic steatohepatitis rats induced by high fat diet and its potential mechanisms. *Int Immunopharmacol.* 2011 11(6): 762-8.
- Takehi, T. and Yabe-Nishimura, C. NOX enzymes and diabetic complications. *Semin Immunopathol.* 2008 30(3): 301-14.

Bibliographie

- Kalousova, M., Skrha, J. and Zima, T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res.* 2002 51(6): 597-604.
- Kamenova, P. Improvement of insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus after oral administration of alpha-lipoic acid. *Hormones (Athens).* 2006 5(4): 251-8.
- Kang, J. H. Modification and inactivation of human Cu,Zn-superoxide dismutase by methylglyoxal. *Mol Cells.* 2003 15(2): 194-9.
- Kang, J. L., Lee, H. W., Lee, H. S., Pack, I. S., Chong, Y., Castranova, V. and Koh, Y. Genistein prevents nuclear factor-kappa B activation and acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 164(12): 2206-12.
- Kanter, M., Coskun, O., Korkmaz, A. and Oter, S. Effects of *Nigella sativa* on oxidative stress and beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004 279(1): 685-91.
- Kaplan, H. and Hutkins, R. W. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2000 66(6): 2682-4.
- Karasu, C. Glycooxidative stress and cardiovascular complications in experimentally-induced diabetes: effects of antioxidant treatment. *Open Cardiovasc Med J.* 2010 4: 240-56.
- Karasu, C. and Altan, V. M. The role of endothelial cells on the alterations in vascular reactivity induced by insulin-dependent diabetes mellitus: effects of insulin treatment. *Gen Pharmacol.* 1993 24(3): 743-55.
- Karunanayake, E. H., Hearse, D. J. and Mellows, G. The synthesis of [¹⁴C] streptozotocin and its distribution and excretion in the rat. *Biochem J.* 1974 142(3): 673-83.
- Kawamura, N., Ookawara, T., Suzuki, K., Konishi, K., Mino, M. and Taniguchi, N. Increased glycated Cu,Zn-superoxide dismutase levels in erythrocytes of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992 74(6): 1352-4.
- Kilpatrick, E. S., Rigby, A. S. and Atkin, S. L. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and complication risk in type 1 diabetes: "double diabetes" in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care.* 2007 30(3): 707-12.
- Kim, E., Sohn, S., Lee, M., Jung, J., Kineman, R. D. and Park, S. Differential responses of the growth hormone axis in two rat models of streptozotocin-induced insulinopenic diabetes. *J Endocrinol.* 2006 188(2): 263-70.
- Kim, H., Peterson, T. G. and Barnes, S. Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor beta signaling pathways. *Am J Clin Nutr.* 1998 68(6 Suppl): 1418S-25S.
- Kim, J., Seok, Y. M., Jung, K. J. and Park, K. M. Reactive oxygen species/oxidative stress contributes to progression of kidney fibrosis following transient ischemic injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009 297(2): F461-70.
- Kim, M. H., Kang, K. S. and Lee, Y. S. The inhibitory effect of genistein on hepatic steatosis is linked to visceral adipocyte metabolism in mice with diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Br J Nutr.* 2010 104(9): 1333-42.
- King, R. A. Daidzein conjugates are more bioavailable than genistein conjugates in rats. *Am J Clin Nutr.* 1998 68(6 Suppl): 1496S-99S.
- Kitabchi, A. E., Umpierrez, G. E., Miles, J. M. and Fisher, J. N. Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes. *Diabetes Care.* 2009 32(7): 1335-43.
- Kjaer, M., Engfred, K., Fernandes, A., Secher, N. H. and Galbo, H. Regulation of hepatic glucose production during exercise in humans: role of sympathoadrenergic activity. *Am J Physiol.* 1993 265(2 Pt 1): E275-83.
- Klein, C. B. and King, A. A. Genistein genotoxicity: critical considerations of in vitro exposure dose. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007 224(1): 1-11.
- Kloppel, G., Lohr, M., Habich, K., Oberholzer, M. and Heitz, P. U. Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv Synth Pathol Res.* 1985 4(2): 110-25.
- Knip, M. and Simell, O. Environmental triggers of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 2(7): a007690.

Bibliographie

- Koivisto, V. A., Pelkonen, R., Nikkila, E. A. and Heding, L. G. Human and porcine insulins are equally effective in the regulation of glucose kinetics of diabetic patients during exercise. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1984 107(4): 500-5.
- Kostolanska, J., Jakus, V. and Barak, L. HbA1c and serum levels of advanced glycation and oxidation protein products in poorly and well controlled children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2009 22(5): 433-42.
- Kullik, I. and Storz, G. Transcriptional regulators of the oxidative stress response in prokaryotes and eukaryotes. *Redox Report*. 1994 1: 23-29.
- Kumazawa, Y., Kawaguchi, K. and Takimoto, H. Immunomodulating effects of flavonoids on acute and chronic inflammatory responses caused by tumor necrosis factor alpha. *Curr Pharm Des*. 2006 12(32): 4271-9.
- Kutlu, M., Naziroglu, M., Simsek, H., Yilmaz, T. and Sahap Kukner, A. Moderate exercise combined with dietary vitamins C and E counteracts oxidative stress in the kidney and lens of streptozotocin-induced diabetic-rat. *Int J Vitam Nutr Res*. 2005 75(1): 71-80.
- Laaksonen, D. E., Atalay, M., Niskanen, L., Uusitupa, M., Hanninen, O. and Sen, C. K. Increased resting and exercise-induced oxidative stress in young IDDM men. *Diabetes Care*. 1996 19(6): 569-74.
- Laaksonen, D. E., Atalay, M., Niskanen, L. K., Mustonen, J., Sen, C. K., Lakka, T. A. and Uusitupa, M. I. Aerobic exercise and the lipid profile in type 1 diabetic men: a randomized controlled trial. *Med Sci Sports Exerc*. 2000 32(9): 1541-8.
- Lambertucci, R. H., Levada-Pires, A. C., Rossoni, L. V., Curi, R. and Pithon-Curi, T. C. Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels in soleus muscle from young and aged rats. *Mech Ageing Dev*. 2007 128(3): 267-75.
- Lampe, J. W., Karr, S. C., Hutchins, A. M. and Slavin, J. L. Urinary equol excretion with a soy challenge: influence of habitual diet. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1998 217(3): 335-9.
- Landt, K. W., Campaigne, B. N., James, F. W. and Sperling, M. A. Effects of exercise training on insulin sensitivity in adolescents with type I diabetes. *Diabetes Care*. 1985 8(5): 461-5.
- Lappalainen, Z., Lappalainen, J., Oksala, N. K., Laaksonen, D. E., Khanna, S., Sen, C. K. and Atalay, M. Diabetes impairs exercise training-associated thioredoxin response and glutathione status in rat brain. *J Appl Physiol*. 2009 106(2): 461-7.
- Le Douairon Lahaye, S., Rebillard, A., Zguira, M. S., Malarde, L., Saiag, B., Gratas-Delamarche, A., Carre, F. and Bekono, F. R. Effects of exercise training combined with insulin treatment on cardiac NOS1 signaling pathways in type 1 diabetic rats. *Mol Cell Biochem*. 2011 347(1-2): 53-62.
- Lee, A. Y. and Chung, S. S. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J*. 1999 13(1): 23-30.
- Lee, J. S. Effects of soy protein and genistein on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci*. 2006 79(16): 1578-84.
- Lee, Y. W. and Lee, W. H. Protective effects of genistein on proinflammatory pathways in human brain microvascular endothelial cells. *J Nutr Biochem*. 2008 19(12): 819-25.
- Lefèvre, H. Quelques cas typiques d'acidocétose diabétique. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie*. 1999 2(4): 285-91.
- Lei, X. G. and Vatamaniuk, M. Z. Two tales of antioxidant enzymes on beta cells and diabetes. *Antioxid Redox Signal*. 2011 14(3): 489-503.
- Leinonen, J. S., Alho, H., Harmoinen, A., Lehtimäki, T. and Knip, M. Unaltered antioxidant activity of plasma in subjects at increased risk for IDDM. *Free Radic Res*. 1998 29(2): 159-64.
- Lemoine, S., Granier, P., Tiffoche, C., Berthon, P. M., Rannou-Bekono, F., Thieulant, M. L., Carre, F. and Delamarche, P. Effect of endurance training on oestrogen receptor alpha transcripts in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 2002 174(3): 283-9.
- Lenzen, S., Drinkgern, J. and 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.
- Li, L. and Renier, G. Activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form) oxidase by advanced glycation end products links oxidative stress to altered retinal vascular endothelial growth factor expression. *Metabolism*. 2006 55(11): 1516-23.

Bibliographie

- Ligtenberg, P. C., Blans, M., Hoekstra, J. B., van der Tweel, I. and Erkelens, D. W. No effect of long-term physical activity on the glycemic control in type 1 diabetes patients: a cross-sectional study. *Neth J Med.* 1999 55(2): 59-63.
- Limaye, P. V., Raghuram, N. and Sivakami, S. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 2003 243(1-2): 147-52.
- Liu, D., Zhen, W., Yang, Z., Carter, J. D., Si, H. and Reynolds, K. A. Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic beta-cells through a cAMP-dependent protein kinase pathway. *Diabetes.* 2006 55(4): 1043-50.
- Liu, J., Chang, S. K. and Wiesenborn, D. Antioxidant properties of soybean isoflavone extract and tofu in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem.* 2005 53(6): 2333-40.
- Liu, S., Ma, X., Gong, M., Shi, L., Lincoln, T. and Wang, S. Glucose down-regulation of cGMP-dependent protein kinase I expression in vascular smooth muscle cells involves NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2007 42(6): 852-63.
- Lopes Barbosa, A. C., Lajolo, F. M. and Genovese, M. I. Influence of temperature, pH and ionic strength on the production of isoflavone-rich soy protein isolates. *Food Chemistry.* 2006 98(4): 757-66.
- Loschen, G., Azzi, A., Richter, C. and Flohe, L. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett.* 1974 42(1): 68-72.
- Low, P. A., Nickander, K. K. and Tritschler, H. J. The roles of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes.* 1997 46 Suppl 2: S38-42.
- Lu, M. P., Wang, R., Song, X., Chibbar, R., Wang, X., Wu, L. and Meng, Q. H. Dietary soy isoflavones increase insulin secretion and prevent the development of diabetic cataracts in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr Res.* 2008 28(7): 464-71.
- Lyons, T. J. and Jenkins, A. J. Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Curr Opin Lipidol.* 1997 8(3): 174-80.
- Machlin, L. J. and Bendich, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.* 1987 1(6): 441-5.
- Maegawa, H., Kobayashi, M., Watanabe, N., Ishibashi, O., Takata, Y., Kitamura, E. and Shigeta, Y. Effect of duration of diabetic state on insulin action in isolated rat soleus muscles. *Metabolism.* 1986 35(6): 499-504.
- Mahesh, T. and Menon, V. P. Quercetin alleviates oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res.* 2004 18(2): 123-7.
- Mahn, K., Borrás, C., Knock, G. A., Taylor, P., Khan, I. Y., Sugden, D., Poston, L., Ward, J. P., Sharpe, R. M., Vina, J., Aaronson, P. I. and Mann, G. E. Dietary soy isoflavone induced increases in antioxidant and eNOS gene expression lead to improved endothelial function and reduced blood pressure in vivo. *FASEB J.* 2005 19(12): 1755-7.
- Maitra, I., Serbinova, E., Trischler, H. and Packer, L. Alpha-lipoic acid prevents buthionine sulfoximine-induced cataract formation in newborn rats. *Free Radic Biol Med.* 1995 18(4): 823-9.
- Malardé, L., Gratas-Delamarche, A., Le Douairon-Lahaye, S., Zguira, M., Vincent, S., Lemoine-Morel, S. and Groussard, C. Endurance training and insulin therapy need to be associated to fully exert their respective beneficial effects on oxidant stress and glycemic regulation in diabetic rats. *Soumis à Diabetes & Metabolism.*
- Malarde, L., Gratas-Delamarche, A., Lefeuvre-Orfila, L., Vincent, S., Efstathiou, T. and Groussard, C. A Fermented Soy Permeate improves the skeletal muscle glucose level without restoring the glycogen content in streptozotocin-induced diabetic rats (in press). *J Med Food.* 2012.
- Maran, A., Pavan, P., Bonsembiante, B., Brugin, E., Ermolao, A., Avogaro, A. and Zaccaria, M. Continuous glucose monitoring reveals delayed nocturnal hypoglycemia after intermittent high-intensity exercise in nontrained patients with type 1 diabetes. *Diabetes Technol Ther.* 2010 12(10): 763-8.
- Maritim, A. C., Sanders, R. A. and Watkins, J. B., 3rd. Effects of alpha-lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr Biochem.* 2003 14(5): 288-94.
- Marrero, D. G., Fremion, A. S. and Golden, M. P. Improving compliance with exercise in adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus: results of a self-motivated home exercise program. *Pediatrics.* 1988 81(4): 519-25.

Bibliographie

- Martin-Gallan, P., Carrascosa, A., Gussinye, M. and Dominguez, C. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radic Biol Med.* 2003 34(12): 1563-74.
- Martin-Gallan, P., Carrascosa, A., Gussinye, M. and Dominguez, C. Changes in oxidant-antioxidant status in young diabetic patients from clinical onset onwards. *J Cell Mol Med.* 2007 11(6): 1352-66.
- Martinon, F. Signaling by ROS drives inflammasome activation. *Eur J Immunol.* 2010 40(3): 616-9.
- Masiello, P., De Paoli, A. A. and Bergamini, E. Influence of age on the sensitivity of the rat to streptozotocin. *Horm Res.* 1979 11(5): 262-74.
- Matkovics, B., Kotorman, M., Varga, I. S., Hai, D. Q. and Varga, C. Oxidative stress in experimental diabetes induced by streptozotocin. *Acta Physiol Hung.* 1997 85(1): 29-38.
- Matsumoto, S., Koshiishi, I., Inoguchi, T., Nawata, H. and Utsumi, H. Confirmation of superoxide generation via xanthine oxidase in streptozotocin-induced diabetic mice. *Free Radic Res.* 2003 37(7): 767-72.
- Matteucci, E. and Giampietro, O. Oxidative stress in families of type 1 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2000 23(8): 1182-6.
- Matteucci, E. and Giampietro, O. Building a bridge between clinical and basic research: the phenotypic elements of familial predisposition to type 1 diabetes. *Curr Med Chem.* 2007 14(5): 555-67.
- Mayer-Davis, E. J., Bell, R. A., Reboussin, B. A., Rushing, J., Marshall, J. A. and Hamman, R. F. Antioxidant nutrient intake and diabetic retinopathy: the San Luis Valley Diabetes Study. *Ophthalmology.* 1998 105(12): 2264-70.
- Meddings, J. B., Jarand, J., Urbanski, S. J., Hardin, J. and Gall, D. G. Increased gastrointestinal permeability is an early lesion in the spontaneously diabetic BB rat. *Am J Physiol.* 1999 276(4 Pt 1): G951-7.
- Mello, V. D., Azevedo, M. J., Zelmanovitz, T. and Gross, J. L. [The role of the diet as a risk factor for the development and progression of diabetic nephropathy]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2005 49(4): 485-94.
- Migdal, C. and Serres, M. [Reactive oxygen species and oxidative stress]. *Med Sci (Paris).* 2011 27(4): 405-12.
- Milstien, S. and Katusic, Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 263(3): 681-4.
- Miranda, M., Muriach, M., Almansa, I., Arnal, E., Messeguer, A., Diaz-Llopis, M., Romero, F. J. and Bosch-Morell, F. CR-6 protects glutathione peroxidase activity in experimental diabetes. *Free Radic Biol Med.* 2007 43(11): 1494-8.
- Mitchell, T. H., Abraham, G., Schiffrin, A., Leiter, L. A. and Marliiss, E. B. Hyperglycemia after intense exercise in IDDM subjects during continuous subcutaneous insulin infusion. *Diabetes Care.* 1988 11(4): 311-7.
- Miyata, T., van Ypersele de Strihou, C., Kurokawa, K. and Baynes, J. W. Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications. *Kidney Int.* 1999 55(2): 389-99.
- Moien-Afshari, F., Ghosh, S., Elmi, S., Rahman, M. M., Sallam, N., Khazaei, M., Kieffer, T. J., Brownsey, R. W. and Laher, I. Exercise restores endothelial function independently of weight loss or hyperglycaemic status in db/db mice. *Diabetologia.* 2008 51(7): 1327-37.
- Morgan, P. E., Dean, R. T. and Davies, M. J. Inactivation of cellular enzymes by carbonyls and protein-bound glycation/glycoxidation products. *Arch Biochem Biophys.* 2002 403(2): 259-69.
- Morris, P. E., Olmstead, L. E., Howard-Carroll, A. E., Dickens, G. R., Goltz, M. L., Courtney-Shapiro, C. and Fanti, P. In vitro and in vivo effects of genistein on murine alveolar macrophage TNF alpha production. *Inflammation.* 1999 23(3): 231-9.
- Mosher, P. E., Nash, M. S., Perry, A. C., LaPerriere, A. R. and Goldberg, R. B. Aerobic circuit exercise training: effect on adolescents with well-controlled insulin-dependent diabetes mellitus. *Arch Phys Med Rehabil.* 1998 79(6): 652-7.
- Moy, C. S., Songer, T. J., LaPorte, R. E., Dorman, J. S., Kriska, A. M., Orchard, T. J., Becker, D. J. and Drash, A. L. Insulin-dependent diabetes mellitus, physical activity, and death. *Am J Epidemiol.* 1993 137(1): 74-81.

Bibliographie

- Nakajima, M., Cooney, M. J., Tu, A. H., Chang, K. Y., Cao, J., Ando, A., An, G. J., Melia, M. and de Juan, E., Jr. Normalization of retinal vascular permeability in experimental diabetes with genistein. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001 42(9): 2110-4.
- Naziroglu, M. and Butterworth, P. J. Protective effects of moderate exercise with dietary vitamin C and E on blood antioxidative defense mechanism in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Can J Appl Physiol.* 2005 30(2): 172-85.
- Neu, J., Reverte, C. M., Mackey, A. D., Liboni, K., Tuhacek-Tenace, L. M., Hatch, M., Li, N., Caicedo, R. A., Schatz, D. A. and Atkinson, M. Changes in intestinal morphology and permeability in the biobreeding rat before the onset of type 1 diabetes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005 40(5): 589-95.
- Neumann, A., Schinzel, R., Palm, D., Riederer, P. and Munch, G. High molecular weight hyaluronic acid inhibits advanced glycation endproduct-induced NF-kappaB activation and cytokine expression. *FEBS Lett.* 1999 453(3): 283-7.
- Nielsen, P. J., Hafdahl, A. R., Conn, V. S., Lemaster, J. W. and Brown, S. A. Meta-analysis of the effect of exercise interventions on fitness outcomes among adults with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2006 74(2): 111-20.
- Oak, J. H. and Cai, H. Attenuation of angiotensin II signaling recouples eNOS and inhibits nonendothelial NOX activity in diabetic mice. *Diabetes.* 2007 56(1): 118-26.
- Oberley, L. W. Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med.* 1988 5(2): 113-24.
- Ohkuwa, T., Sato, Y. and Naoi, M. Hydroxyl radical formation in diabetic rats induced by streptozotocin. *Life Sci.* 1995 56(21): 1789-98.
- Olson, J. S., Ballou, D. P., Palmer, G. and Massey, V. The mechanism of action of xanthine oxidase. *J Biol Chem.* 1974 249(14): 4363-82.
- Ozkaya, Y. G., Agar, A., Yargicoglu, P., Hacıoglu, G., Bilmen-Sarikcioglu, S., Ozen, I. and Aliciguzel, Y. The effect of exercise on brain antioxidant status of diabetic rats. *Diabetes Metab.* 2002 28(5): 377-84.
- Pacher, P., Beckman, J. S. and Liaudet, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007 87(1): 315-424.
- Packer, L. Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *J Sports Sci.* 1997 15(3): 353-63.
- Palanisamy, N., Kannappan, S. and Anuradha, C. V. Genistein modulates NF-kappaB-associated renal inflammation, fibrosis and podocyte abnormalities in fructose-fed rats. *Eur J Pharmacol.* 2011 667(1-3): 355-64.
- Pang, T. T. and Narendran, P. Addressing insulin resistance in Type 1 diabetes. *Diabet Med.* 2008 25(9): 1015-24.
- Papaccio, G., Pisanti, F. A. and Frascatore, S. Acetyl-homocysteine-thiolactone-induced increase of superoxide dismutase counteracts the effect of subdiabetogenic doses of streptozocin. *Diabetes.* 1986 35(4): 470-4.
- Paradkar, P. N., Blum, P. S., Berhow, M. A., Baumann, H. and Kuo, S. M. Dietary isoflavones suppress endotoxin-induced inflammatory reaction in liver and intestine. *Cancer Lett.* 2004 215(1): 21-8.
- Peterson, T. E., Poppa, V., Ueba, H., Wu, A., Yan, C. and Berk, B. C. Opposing effects of reactive oxygen species and cholesterol on endothelial nitric oxide synthase and endothelial cell caveolae. *Circ Res.* 1999 85(1): 29-37.
- Pi, J., Bai, Y., Zhang, Q., Wong, V., Floering, L. M., Daniel, K., Reece, J. M., Deeney, J. T., Andersen, M. E., Corkey, B. E. and Collins, S. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes.* 2007 56(7): 1783-91.
- Powers, S. K. and Jackson, M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 2008 88(4): 1243-76.
- Prasad, M., Takkinen, H. M., Nevalainen, J., Ovaskainen, M. L., Alfthan, G., Uusitalo, L., Kenward, M. G., Veijola, R., Simell, O., Ilonen, J., Knip, M. and Virtanen, S. M. Are serum alpha- and beta-carotene concentrations associated with the development of advanced beta-cell autoimmunity in children with increased genetic susceptibility to type 1 diabetes? *Diabetes Metab.* 2011 37(2): 162-7.
- Ramalho, A. C., de Lourdes Lima, M., Nunes, F., Cambui, Z., Barbosa, C., Andrade, A., Viana, A., Martins, M., Abrantes, V., Aragao, C. and Temistocles, M. The effect of resistance versus aerobic training on

Bibliographie

- metabolic control in patients with type-1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2006 72(3): 271-6.
- Ramires, P. R., Forjaz, C. L., Silva, M. E., Diamant, J., Nicolau, W., Liberman, B. and Negrao, C. E. Exercise tolerance is lower in type I diabetics compared with normal young men. *Metabolism.* 1993 42(2): 191-5.
- Raschke, M., Rowland, I. R., Magee, P. J. and Pool-Zobel, B. L. Genistein protects prostate cells against hydrogen peroxide-induced DNA damage and induces expression of genes involved in the defence against oxidative stress. *Carcinogenesis.* 2006 27(11): 2322-30.
- Rasmusen, C., Cynober, L. and Couderc, R. [Arginine and statins: relationship between the nitric oxide pathway and the atherosclerosis development]. *Ann Biol Clin (Paris).* 2005 63(5): 443-55.
- Ray, P. D., Huang, B. W. and Tsuji, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012 24(5): 981-90.
- Raynaud, E., Brun, J. F., Perez-Martin, A., Fedou, C. and Mercier, J. [In vivo evaluation of insulin sensitivity and clinical applications]. *Ann Biol Clin (Paris).* 1998 56(4): 407-16.
- Reddi, A. S. and Bollineni, J. S. Renal cortical expression of mRNAs for antioxidant enzymes in normal and diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 235(3): 598-601.
- Redondo, M. J., Rewers, M., Yu, L., Garg, S., Pilcher, C. C., Elliott, R. B. and Eisenbarth, G. S. 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.
- Rees, D. A. and Alcolado, J. C. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2005 22(4): 359-70.
- Reinwald, S., Akabas, S. R. and Weaver, C. M. Whole versus the piecemeal approach to evaluating soy. *J Nutr.* 2010 140(12): 2335S-43S.
- Rhee, S. G. Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science.* 2006 312(5782): 1882-3.
- Ricci, P., Blottière, P., Weill, A., Simon, D., Tuppin, P., Ricordeau, P. and Allemand, H. Treated diabetes: which trends between 2000 and 2009 in France? *Bull Epidemiol Hebd.* 2010 42-43: 425-31.
- Rimbach, G., De Pascual-Teresa, S., Ewins, B. A., Matsugo, S., Uchida, Y., Minihane, A. M., Turner, R., VafeiAdou, K. and Weinberg, P. D. Antioxidant and free radical scavenging activity of isoflavone metabolites. *Xenobiotica.* 2003 33(9): 913-25.
- Ristow, M., Zarse, K., Oberbach, A., Kloting, N., Birringer, M., Kiehnopf, M., Stumvoll, M., Kahn, C. R. and Bluher, M. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 106(21): 8665-70.
- Ritchie, S. A., Kohlhaas, C. F., Boyd, A. R., Yalla, K. C., Walsh, K., Connell, J. M. and Salt, I. P. Insulin-stimulated phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase at serine-615 contributes to nitric oxide synthesis. *Biochem J.* 2010 426(1): 85-90.
- Roberfroid, M. B. Health benefits of non-digestible oligosaccharides. *Adv Exp Med Biol.* 1997 427: 211-9.
- Roberts, L., Jones, T. W. and Fournier, P. A. Exercise training and glycemic control in adolescents with poorly controlled type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2002 15(5): 621-7.
- Romon, I., Fosse, S., Eschwege, E., Simon, D., Weill, A., Varroud-Vial, M., Detournay, B. and Fagot-Campagna, A. Prevalence of macrovascular complications and cardiovascular risk factors in people treated for diabetes and living in France: the ENTRED study 2001. *Diabetes Metab.* 2008 34(2): 140-7.
- Rosa, J. S., Oliver, S. R., Flores, R. L., Ngo, J., Milne, G. L., Zaldivar, F. P. and Galassetti, P. R. Altered inflammatory, oxidative, and metabolic responses to exercise in pediatric obesity and type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes.* 2011 12(5): 464-72.
- Rosen, P., Nawroth, P. P., King, G., Moller, W., Tritschler, H. J. and Packer, L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev.* 2001 17(3): 189-212.
- Rosenbloom, A. L. The management of diabetic ketoacidosis in children. *Diabetes Ther.* 2010 1(2): 103-20.
- Rowland, I. R., Wiseman, H., Sanders, T. A., Adlercreutz, H. and Bowey, E. A. Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutr Cancer.* 2000 36(1): 27-32.

Bibliographie

- Rufer, C. E. and Kulling, S. E. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different *in vitro* assays. *J Agric Food Chem.* 2006 54(8): 2926-31.
- Ruiz, C., Alegria, A., Barbera, R., Farre, R. and Lagarda, M. J. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in patients with type 1 diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest.* 1999 59(2): 99-105.
- Rush, J. W., Denniss, S. G. and Graham, D. A. Vascular nitric oxide and oxidative stress: determinants of endothelial adaptations to cardiovascular disease and to physical activity. *Can J Appl Physiol.* 2005 30(4): 442-74.
- Sakurai, T. and Tsuchiya, S. Superoxide production from nonenzymatically glycated protein. *FEBS Lett.* 1988 236(2): 406-10.
- Salem, M. A., Aboelasar, M. A., Elbarbary, N. S., Elhilaly, R. A. and Refaat, Y. M. Is exercise a therapeutic tool for improvement of cardiovascular risk factors in adolescents with type 1 diabetes mellitus? A randomised controlled trial. *Diabetol Metab Syndr.* 2010 2(1): 47.
- Salzman, A. L., Preiser, J. C., Setchell, K. D. and Szabo, C. Isoflavone-mediated inhibition of tyrosine kinase: a novel antiinflammatory approach. *J Med Food.* 1999 2(3-4): 179-81.
- Sano, T., Umeda, F., Hashimoto, T., Nawata, H. and Utsumi, H. Oxidative stress measurement by *in vivo* electron spin resonance spectroscopy in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 1998 41(11): 1355-60.
- Saudek, C. D. and Brick, J. C. The clinical use of hemoglobin A1c. *J Diabetes Sci Technol.* 2009 3(4): 629-34.
- Schleicher, E. D., Wagner, E. and Nerlich, A. G. Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest.* 1997 99(3): 457-68.
- Schmidt, A. M., Hori, O., Cao, R., Yan, S. D., Brett, J., Wautier, J. L., Ogawa, S., Kuwabara, K., Matsumoto, M. and Stern, D. RAGE: a novel cellular receptor for advanced glycation end products. *Diabetes.* 1996 45 Suppl 3: S77-80.
- Schmidt, A. M., Yan, S. D., Wautier, J. L. and Stern, D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res.* 1999 84(5): 489-97.
- Schwartz, N. S., Clutter, W. E., Shah, S. D. and Cryer, P. E. Glycemic thresholds for activation of glucose counterregulatory systems are higher than the threshold for symptoms. *J Clin Invest.* 1987 79(3): 777-81.
- Scott, F. W., Cloutier, H. E., Kleemann, R., Woerz-Pagenstert, U., Rowsell, P., Modler, H. W. and Kolb, H. Potential mechanisms by which certain foods promote or inhibit the development of spontaneous diabetes in BB rats: dose, timing, early effect on islet area, and switch in infiltrate from Th1 to Th2 cells. *Diabetes.* 1997 46(4): 589-98.
- Setchell, K. D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr.* 1998 68(6 Suppl): 1333S-46S.
- Setchell, K. D., Brown, N. M. and Lydeking-Olsen, E. The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr.* 2002 132(12): 3577-84.
- Sharma, A., Kharb, S., Chugh, S. N., Kakkar, R. and Singh, G. P. Evaluation of oxidative stress before and after control of glycemia and after vitamin E supplementation in diabetic patients. *Metabolism.* 2000 49(2): 160-2.
- Shen, G. X. Oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders: roles of mitochondria and NADPH oxidase. *Can J Physiol Pharmacol.* 2010 88(3): 241-8.
- Shen, W., Liu, K., Tian, C., Yang, L., Li, X., Ren, J., Packer, L., Cotman, C. W. and Liu, J. R-alpha-lipoic acid and acetyl-L-carnitine complementarily promote mitochondrial biogenesis in murine 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia.* 2008 51(1): 165-74.
- Sies, H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem.* 1993 215(2): 213-9.
- Sies, H. and Jones, D. P. *Encyclopedia of Stress.* 2007. Elsevier.
- Sindhu, R. K., Koo, J. R., Roberts, C. K. and Vaziri, N. D. Dysregulation of hepatic superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in diabetes: response to insulin and antioxidant therapies. *Clin Exp Hypertens.* 2004 26(1): 43-53.

Bibliographie

- Singh, R., Barden, A., Mori, T. and Beilin, L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 2001 44(2): 129-46.
- Singh, U. and Jialal, I. Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes. *Nutr Rev*. 2008 66(11): 646-57.
- Sivitz, W. I. and Yorek, M. A. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2010 12(4): 537-77.
- Slavin, J. L., Martini, M. C., Jacobs, D. R., Jr. and Marquart, L. Plausible mechanisms for the protectiveness of whole grains. *Am J Clin Nutr*. 1999 70(3 Suppl): 459S-63S.
- Snow, L. M. and Thompson, L. V. Influence of insulin and muscle fiber type in nepsilon-(carboxymethyl)-lysine accumulation in soleus muscle of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Pathobiology*. 2009 76(5): 227-34.
- Song, W., Kwak, H. B., Kim, J. H. and Lawler, J. M. Exercise training modulates the nitric oxide synthase profile in skeletal muscle from old rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2009 64(5): 540-9.
- St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J. and Brand, M. D. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem*. 2002 277(47): 44784-90.
- Stamler, J. S. and Meissner, G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev*. 2001 81(1): 209-37.
- Stary, H. C., Chandler, A. B., Glagov, S., Guyton, J. R., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M. E., Schaffer, S. A., Schwartz, C. J., Wagner, W. D. and Wissler, R. W. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb*. 1994 14(5): 840-56.
- Stephenson, T. J., Setchell, K. D., Kendall, C. W., Jenkins, D. J., Anderson, J. W. and Fanti, P. Effect of soy protein-rich diet on renal function in young adults with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Nephrol*. 2005 64(1): 1-11.
- Steppel, J. H. and Horton, E. S. Exercise in the management of type 1 diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab Disord*. 2003 4(4): 355-60.
- Stitt, A. W., Li, Y. M., Gardiner, T. A., Bucala, R., Archer, D. B. and Vlassara, H. Advanced glycation end products (AGEs) co-localize with AGE receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-infused rats. *Am J Pathol*. 1997 150(2): 523-31.
- Stoppa, G. R., Cesquini, M., Roman, E. A., Ogo, S. H. and Torsoni, M. A. Aminoguanidine prevented impairment of blood antioxidant system in insulin-dependent diabetic rats. *Life Sci*. 2006 78(12): 1352-61.
- Su, P., Henriksson, A. and Mitchell, H. Selected prebiotics support the growth of probiotic mono-cultures in vitro. *Anaerobe*. 2007 13(3-4): 134-9.
- Suh, Y. A., Arnold, R. S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A. B., Griendling, K. K. and Lambeth, J. D. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*. 1999 401(6748): 79-82.
- Sumimoto, H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J*. 2008 275(13): 3249-77.
- Suzuki, D. and Miyata, T. Carbonyl stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Intern Med*. 1999 38(4): 309-14.
- Sysi-Aho, M., Ermolov, A., Gopalacharyulu, P. V., Tripathi, A., Seppanen-Laakso, T., Maukonen, J., Mattila, I., Ruohonen, S. T., Vahatalo, L., Yetukuri, L., Harkonen, T., Lindfors, E., Nikkila, J., Ilonen, J., Simell, O., Saarela, M., Knip, M., Kaski, S., Savontaus, E. and Oresic, M. Metabolic regulation in progression to autoimmune diabetes. *PLoS Comput Biol*. 2011 7(10): e1002257.
- Szaleczky, E., Prechl, J., Feher, J. and Somogyi, A. Alterations in enzymatic antioxidant defence in diabetes mellitus--a rational approach. *Postgrad Med J*. 1999 75(879): 13-7.
- Szkudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001 50(6): 537-46.
- Szkudelski, T., Kandulska, K. and Okulicz, M. Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells. *Physiol Res*. 1998 47(5): 343-6.

Bibliographie

- Taddei, S., Ghiadoni, L., Viridis, A., Versari, D. and Salvetti, A. Mechanisms of endothelial dysfunction: clinical significance and preventive non-pharmacological therapeutic strategies. *Curr Pharm Des.* 2003 9(29): 2385-402.
- Takekawa, S., Matsui, T. and Arakawa, Y. The protective effect of the soybean polyphenol genistein against stress-induced gastric mucosal lesions in rats, and its hormonal mechanisms. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2006 52(4): 274-80.
- Tamura, M., Hirayama, K. and Itoh, K. Effects of soy oligosaccharides on plasma and cecal isoflavones, and cecal enzyme activities in mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2003 49(3): 168-71.
- Tansey, M. J., Tsalikian, E., Beck, R. W., Mauras, N., Buckingham, B. A., Weinzimer, S. A., Janz, K. F., Kollman, C., Xing, D., Ruedy, K. J., Steffes, M. W., Borland, T. M., Singh, R. J. and Tamborlane, W. V. The effects of aerobic exercise on glucose and counterregulatory hormone concentrations in children with type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2006 29(1): 20-5.
- Tanskanen, M., Atalay, M. and Uusitalo, A. Altered oxidative stress in overtrained athletes. *J Sports Sci.* 2010 28(3): 309-17.
- Telci, A., Cakatay, U., Salman, S., Satman, I. and Sivas, A. Oxidative protein damage in early stage Type 1 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2000 50(3): 213-23.
- Thomas, D. E. and Elliott, E. J. The use of low-glycaemic index diets in diabetes control. *Br J Nutr.* 2010 104(6): 797-802.
- Thornalley, P., Wolff, S., Crabbe, J. and Stern, A. The autoxidation of glyceraldehyde and other simple monosaccharides under physiological conditions catalysed by buffer ions. *Biochim Biophys Acta.* 1984 797(2): 276-87.
- Tie, L., An, Y., Han, J., Xiao, Y., Xiaokaiti, Y., Fan, S., Liu, S., Chen, A. F. and Li, X. Genistein accelerates refractory wound healing by suppressing superoxide and FoxO1/iNOS pathway in type 1 diabetes. *J Nutr Biochem.* 2012.
- Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J. and Lenzen, S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes.* 1997 46(11): 1733-42.
- Toeller, M., Buyken, A., Heitkamp, G., Bramswig, S., Mann, J., Milne, R., Gries, F. A. and Keen, H. Protein intake and urinary albumin excretion rates in the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabetologia.* 1997 40(10): 1219-26.
- Tuohy, K. M., Rouzaud, G. C., Bruck, W. M. and Gibson, G. R. Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics--assessment of efficacy. *Curr Pharm Des.* 2005 11(1): 75-90.
- Turner, N. J., Thomson, B. M. and Shaw, I. C. Bioactive isoflavones in functional foods: the importance of gut microflora on bioavailability. *Nutr Rev.* 2003 61(6 Pt 1): 204-13.
- Uhlmann, S., Rezzoug, K., Friedrichs, U., Hoffmann, S. and Wiedemann, P. Advanced glycation end products quench nitric oxide in vitro. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2002 240(10): 860-6.
- Ungvari, Z., Bailey-Downs, L., Gautam, T., Sosnowska, D., Wang, M., Monticone, R. E., Telljohann, R., Pinto, J. T., de Cabo, R., Sonntag, W. E., Lakatta, E. G. and Csiszar, A. Age-associated vascular oxidative stress, Nrf2 dysfunction, and NF- κ B activation in the nonhuman primate *Macaca mulatta*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2011 66(8): 866-75.
- Uusitalo, L., Nevalainen, J., Niinisto, S., Alftan, G., Sundvall, J., Korhonen, T., Kenward, M. G., Oja, H., Veijola, R., Simell, O., Ilonen, J., Knip, M. and Virtanen, S. M. Serum alpha- and gamma-tocopherol concentrations and risk of advanced beta cell autoimmunity in children with HLA-conferred susceptibility to type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2008 51(5): 773-80.
- Vaag, A., Hother-Nielsen, O., Skott, P., Andersen, P., Richter, E. A. and Beck-Nielsen, H. Effect of acute hyperglycemia on glucose metabolism in skeletal muscles in IDDM patients. *Diabetes.* 1992 41(2): 174-82.
- Vaarala, O. Gut and the induction of immune tolerance in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 1999 15(5): 353-61.
- Vaarala, O. The role of the gut in beta-cell autoimmunity and type 1 diabetes: a hypothesis. *Pediatr Diabetes.* 2000 1(4): 217-25.
- Vaarala, O. The gut immune system and type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 958: 39-46.

Bibliographie

- Vaarala, O. Intestinal immunity and type 1 diabetes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004 39 Suppl 3: S732-3.
- Vaarala, O. Is it dietary insulin? *Ann N Y Acad Sci.* 2006 1079: 350-9.
- Vaarala, O. Leaking gut in type 1 diabetes. *Curr Opin Gastroenterol.* 2008 24(6): 701-6.
- Vaarala, O. Is the origin of type 1 diabetes in the gut? *Immunol Cell Biol.* 2012 90(3): 271-6.
- Vahasalo, P., Petays, T., Knip, M., Miettinen, A., Saukkonen, T., Karjalainen, J., Savilahti, E. and Akerblom, H. K. Relation between antibodies to islet cell antigens, other autoantigens and cow's milk proteins in diabetic children and unaffected siblings at the clinical manifestation of IDDM. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Autoimmunity.* 1996 23(3): 165-74.
- Valerio, G., Spagnuolo, M. I., Lombardi, F., Spadaro, R., Siano, M. and Franzese, A. Physical activity and sports participation in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007 17(5): 376-82.
- Valmadrid, C. T., Klein, R., Moss, S. E. and Klein, B. E. The risk of cardiovascular disease mortality associated with microalbuminuria and gross proteinuria in persons with older-onset diabetes mellitus. *Arch Intern Med.* 2000 160(8): 1093-100.
- Valsecchi, A. E., Franchi, S., Panerai, A. E., Rossi, A., Sacerdote, P. and Colleoni, M. The soy isoflavone genistein reverses oxidative and inflammatory state, neuropathic pain, neurotrophic and vasculature deficits in diabetes mouse model. *Eur J Pharmacol.* 2011 650(2-3): 694-702.
- van der Werf, N., Kroese, F. G., Rozing, J. and Hillebrands, J. L. Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2007 23(3): 169-83.
- Varvarovska, J., Racek, J., Stozicky, F., Soucek, J., Trefil, L. and Pomahacova, R. Parameters of oxidative stress in children with Type 1 diabetes mellitus and their relatives. *J Diabetes Complications.* 2003 17(1): 7-10.
- Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B. and Martasek, P. The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. *Free Radic Res.* 2003 37(2): 121-7.
- Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., Martasek, P., Hogg, N., Masters, B. S., Karoui, H., Tordo, P. and Pritchard, K. A., Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 95(16): 9220-5.
- Vega-Lopez, S., Yeum, K. J., Lecker, J. L., Ausman, L. M., Johnson, E. J., Devaraj, S., Jialal, I. and Lichtenstein, A. H. Plasma antioxidant capacity in response to diets high in soy or animal protein with or without isoflavones. *Am J Clin Nutr.* 2005 81(1): 43-9.
- Vergano, S., Bhambri, R. and Schneider, S. H. Exercise in the Therapy of Diabetes Mellitus. *PRINCIPLES OF DIABETES MELLITUS.* 2010. Spinger Sciences. 8: 687-708.
- Verge, C. F., Gianani, R., Kawasaki, E., Yu, L., Pietropaolo, M., Jackson, R. A., Chase, H. P. and Eisenbarth, G. S. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes.* 1996 45(7): 926-33.
- Villa-Caballero, L., Nava-Ocampo, A. A., Frati-Munari, A. and Ponce-Monter, H. Oxidative stress, acute and regular exercise: are they really harmful in the diabetic patient? *Med Hypotheses.* 2000 55(1): 43-6.
- Vlassara, H. and Striker, G. E. AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. *Nat Rev Endocrinol.* 2011 7(9): 526-39.
- von Hertzen, L., Forsblom, C., Stumpf, K., Pettersson-Fernholm, K., Adlercreutz, H. and Groop, P. H. Highly elevated serum phyto-oestrogen concentrations in patients with diabetic nephropathy. *J Intern Med.* 2004 255(5): 602-9.
- Waden, J., Forsblom, C., Thorn, L. M., Saraheimo, M., Rosengard-Barlund, M., Heikkila, O., Lakka, T. A., Tikkanen, H. and Groop, P. H. Physical activity and diabetes complications in patients with type 1 diabetes: the Finnish Diabetic Nephropathy (FinnDiane) Study. *Diabetes Care.* 2008 31(2): 230-2.
- Waldhausl, W. K. The physiological basis of insulin treatment--clinical aspects. *Diabetologia.* 1986 29(12): 837-49.
- Wallace, T. M. and Matthews, D. R. The assessment of insulin resistance in man. *Diabet Med.* 2002 19(7): 527-34.

Bibliographie

- Wallberg-Henriksson, H., Gunnarsson, R., Henriksson, J., DeFronzo, R., Felig, P., Ostman, J. and Wahren, J. Increased peripheral insulin sensitivity and muscle mitochondrial enzymes but unchanged blood glucose control in type I diabetics after physical training. *Diabetes*. 1982 31(12): 1044-50.
- Wallberg-Henriksson, H., Gunnarsson, R., Henriksson, J., Ostman, J. and Wahren, J. Influence of physical training on formation of muscle capillaries in type I diabetes. *Diabetes*. 1984 33(9): 851-7.
- Wallberg-Henriksson, H., Gunnarsson, R., Rossner, S. and Wahren, J. Long-term physical training in female type 1 (insulin-dependent) diabetic patients: absence of significant effect on glycaemic control and lipoprotein levels. *Diabetologia*. 1986 29(1): 53-7.
- Wasserman, D. H. and Zinman, B. Exercise in individuals with IDDM. *Diabetes Care*. 1994 17(8): 924-37.
- Wei, H., Bowen, R., Cai, Q., Barnes, S. and Wang, Y. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1995 208(1): 124-30.
- West, I. C. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med*. 2000 17(3): 171-80.
- Wheatcroft, S. B., Williams, I. L., Shah, A. M. and Kearney, M. T. Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet Med*. 2003 20(4): 255-68.
- Wiernsperger, N. F. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metab*. 2003 29(6): 579-85.
- Wierusz-Wysocka, B., Wysocki, H., Byks, H., Zozulinska, D., Wykretowicz, A. and Kazmierczak, M. Metabolic control quality and free radical activity in diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 1995 27(3): 193-7.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. and King, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004 27(5): 1047-53.
- Will, J. C., Ford, E. S. and Bowman, B. A. Serum vitamin C concentrations and diabetes: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am J Clin Nutr*. 1999 70(1): 49-52.
- Williams, K. V., Erbey, J. R., Becker, D., Arslanian, S. and Orchard, T. J. Can clinical factors estimate insulin resistance in type 1 diabetes? *Diabetes*. 2000 49(4): 626-32.
- Wiseman, H., O'Reilly, J. D., Adlercreutz, H., Mallet, A. I., Bowey, E. A., Rowland, I. R. and Sanders, T. A. Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F(2)-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *Am J Clin Nutr*. 2000 72(2): 395-400.
- Wohaieb, S. A. and Godin, D. V. Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. *Diabetes*. 1987 36(9): 1014-8.
- Wolff, S. P. and Dean, R. T. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J*. 1987 245(1): 243-50.
- Woo, J., Yeo, N. H., Shin, K. O., Lee, H. J., Yoo, J. and Kang, S. Antioxidant enzyme activities and DNA damage in children with type 1 diabetes mellitus after 12 weeks of exercise. *Acta Paediatr*. 2010 99(8): 1263-8.
- Wood, Z. A., Poole, L. B. and Karplus, P. A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science*. 2003 300(5619): 650-3.
- Xia, R., Webb, J. A., Gnall, L. L., Cutler, K. and Abramson, J. J. Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum contains a NADH-dependent oxidase that generates superoxide. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003 285(1): C215-21.
- Xu, S. Z., Zhong, W., Ghavideldarestani, M., Saurabh, R., Lindow, S. W. and Atkin, S. L. Multiple mechanisms of soy isoflavones against oxidative stress-induced endothelium injury. *Free Radic Biol Med*. 2009 47(2): 167-75.
- Xu, X., Harris, K. S., Wang, H. J., Murphy, P. A. and Hendrich, S. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *J Nutr*. 1995 125(9): 2307-15.
- Xu, X., Wang, H. J., Murphy, P. A., Cook, L. and Hendrich, S. Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women. *J Nutr*. 1994 124(6): 825-32.
- Yfanti, C., Nielsen, A. R., Akerstrom, T., Nielsen, S., Rose, A. J., Richter, E. A., Lykkesfeldt, J., Fischer, C. P. and Pedersen, B. K. Effect of antioxidant supplementation on insulin sensitivity in response to endurance exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011 300(5): E761-70.

Bibliographie

- Yi, X. and Maeda, N. alpha-Lipoic acid prevents the increase in atherosclerosis induced by diabetes in apolipoprotein E-deficient mice fed high-fat/low-cholesterol diet. *Diabetes*. 2006 55(8): 2238-44.
- Yki-Jarvinen, H., DeFronzo, R. A. and Koivisto, V. A. Normalization of insulin sensitivity in type I diabetic subjects by physical training during insulin pump therapy. *Diabetes Care*. 1984 7(6): 520-7.
- Youssef, D., El Abbassi, A., Jordan, R. M. and Peiris, A. N. Fructosamine--an underutilized tool in diabetes management: case report and literature review. *Tenn Med*. 2008 101(11): 31-3.
- Youssef, H., Groussard, C., Pincemail, J., Moussa, E., Jacob, C., Lemoine, S., Zind, M., Defraigne, J. O., Cillard, J., Delamarche, P. and Gratas-Delamarche, A. Exercise-induced oxidative stress in overweight adolescent girls: roles of basal insulin resistance and inflammation and oxygen overconsumption. *Int J Obes (Lond)*. 2009 33(4): 447-55.
- Zhang, M., Lv, X. Y., Li, J., Xu, Z. G. and Chen, L. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. *Exp Diabetes Res*. 2008 2008: 704045.
- Zhang, W. J., Bird, K. E., McMillen, T. S., LeBoeuf, R. C., Hagen, T. M. and Frei, B. Dietary alpha-lipoic acid supplementation inhibits atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient and apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*. 2008 117(3): 421-8.
- Zhang, Y., Hendrich, S. and Murphy, P. A. Glucuronides are the main isoflavone metabolites in women. *J Nutr*. 2003 133(2): 399-404.
- Zhang, Z. J., Davidson, L., Eisenbarth, G. and Weiner, H. L. Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 88(22): 10252-6.
- Zhao, J. H., Arao, Y., Sun, S. J., Kikuchi, A. and Kayama, F. Oral administration of soy-derived genistin suppresses lipopolysaccharide-induced acute liver inflammation but does not induce thymic atrophy in the rat. *Life Sci*. 2006 78(8): 812-9.
- Zhao, R., Ma, X., Xie, X. and Shen, G. X. Involvement of NADPH oxidase in oxidized LDL-induced upregulation of heat shock factor-1 and plasminogen activator inhibitor-1 in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 297(1): E104-11.
- Ziegler, D. Thioctic acid for patients with symptomatic diabetic polyneuropathy: a critical review. *Treat Endocrinol*. 2004 3(3): 173-89.
- Ziegler, D., Schatz, H., Conrad, F., Gries, F. A., Ulrich, H. and Reichel, G. Effects of treatment with the antioxidant alpha-lipoic acid on cardiac autonomic neuropathy in NIDDM patients. A 4-month randomized controlled multicenter trial (DEKAN Study). *Deutsche Kardiale Autonome Neuropathie*. *Diabetes Care*. 1997 20(3): 369-73.
- Zinman, B., Ruderman, N., Campaigne, B. N., Devlin, J. T. and Schneider, S. H. Physical activity/exercise and diabetes. *Diabetes Care*. 2004 27 Suppl 1: S58-62.
- Zinman, B., Zuniga-Guajardo, S. and Kelly, D. Comparison of the acute and long-term effects of exercise on glucose control in type I diabetes. *Diabetes Care*. 1984 7(6): 515-9.

ANNEXES

Fiches techniques

FICHE TECHNIQUE N°1.....	III
Identification des populations d'études.....	III
FICHE TECHNIQUE N°2.....	IV
Induction du diabète	IV
FICHE TECHNIQUE N°3.....	V
Vérification du diabète.....	V
FICHE TECHNIQUE N°4.....	VI
Supplémentation en PFS	VI
FICHE TECHNIQUE N°5.....	VII
Traitement à l'insuline.....	VII
FICHE TECHNIQUE N°6.....	VIII
Protocole d'entraînement en endurance.....	VIII
FICHE TECHNIQUE N°7.....	IX
Suivi des animaux au cours des études - Sacrifice	IX
FICHE TECHNIQUE N°8.....	X
Préparation des tissus pour analyses biologiques.....	X
FICHE TECHNIQUE N°9.....	XI
Préparation des sections d'aorte pour étude histochimique.....	XI
FICHE TECHNIQUE N°10.....	XII
Etude de la fonction vasculaire par la technique des vaisseaux isolés	XII
FICHE TECHNIQUE N°11.....	XIII
Dosage des protéines par la méthode de Lowry.....	XIII
FICHE TECHNIQUE N°12.....	XIV
Mesure de l'activité de la citrate synthase	XIV
FICHE TECHNIQUE N°13.....	XV
Mesure de la N-ε-carboxymethyl-lysine (CML)	XV
FICHE TECHNIQUE N°14.....	XV
Mesure du rapport glutathion réduit/glutathion oxydé.....	XV
FICHE TECHNIQUE N°16.....	XVII
Mesure de l'activité de la superoxyde dismutase SOD	XVII
FICHE TECHNIQUE N°17.....	XVII

Mesure de l'activité de la glutathion peroxydase GPx.....	XVII
FICHE TECHNIQUE N°18.....	XVIII
Mesure de la capacité antioxydante total par ORAC	XVIII
FICHE TECHNIQUE N°19.....	XIX
Etude de l'expression des protéines par la technique de Western Blot	XIX
FICHE TECHNIQUE N°20.....	XX
Electrophorèse – Préparation des gels.....	XX
FICHE TECHNIQUE N°21.....	XXI
Electrophorèse – Préparation des échantillons et migration.....	XXI
FICHE TECHNIQUE N°22.....	XXII
Transfert	XXII
FICHE TECHNIQUE N°23.....	XXIII
Blocage de la membrane	XXIII
FICHE TECHNIQUE N°24.....	XXIV
Incubation avec l'anticorps primaire.....	XXIV
FICHE TECHNIQUE N°25.....	XXV
Incubation avec l'anticorps secondaire et révélation avec Odyssey de Li-COR	XXV
FICHE TECHNIQUE N°26.....	XXVI
Mesure du glucose et du glycogène musculaire	XXVI
FICHE TECHNIQUE N°27.....	XXVII
Mesure des interleukines 1 et 6	XXVII

FICHE TECHNIQUE N°1
Identification des populations d'études

Modèle animal : Rat

- Souche : Wistar
- Sexe : Mâle
- Age : 9 semaines au début du protocole
- Provenance : élevage Janvier (Le Genest St Isle, France)



Hébergement

- Animalerie de l'UMR 6061 – Génétique et Développement (CNRS/Université Rennes 1)
- Validée par les services vétérinaires départementaux
- Rythme nuit-jour autoprogrammé de 12h
- Température contrôlée entre 20 et 22°C

Alimentation

- Aliment d'entretien élaboré sans protéines de soja (dans les études concernant le PFS) par HARLAN (2020X Teklad Global Soy Protein-Free Extruded Rodent Diet)
- Aliment d'entretien classique élaboré par HERSTELLER (Special Diet Service)
- Eau du robinet
- Alimentation et hydratation ad libitum

Répartition des animaux dans les différents groupes d'études

- Protocole de supplémentation en PFS
 - Sains placebo
 - Sains supplémentés en PFS
 - Diabétiques placebo
 - Diabétiques supplémentés en PFS
- Protocole de traitement à l'insuline couplé à l'entraînement :
 - Diabétiques contrôles (D)
 - Diabétiques traités à l'insuline (D+Ins)
 - Diabétiques entraînés (D+Tr)
 - Diabétiques traités à l'insuline et entraînés (T)
 - Groupe additionnel sain

FICHE TECHNIQUE N°2
Induction du diabète

Le modèle animal de diabète est induit chimiquement par injection de **streptozotocine (STZ)**.

- **Action de cette substance chimique** : action diabétogène en détruisant de manière sélective les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas.

Induction du diabète par la STZ chez le rat

- modèle élaboré par Portha en 1974
- développement d'un syndrome clinique caractérisé par une hyperglycémie, une diurèse osmotique excessive et une perte de poids, similaire au diabète humain
- développement de complications microvasculaires chroniques (néphropathie, neuropathie périphérique et autonome) comme observées chez les patients diabétiques.
-

L'induction du diabète est réalisée par **injection intrapéritonéale** de STZ diluée avec du tampon citrate.

- Les rats contrôles reçoivent une injection de tampon citrate seul.

Préparation de l'acide citrique :

Poids moléculaire (PM) = 192.12
Pour obtenir 50 mL d'acide citrique à [100 mM] : peser 0,96g et ajouter de l'eau Ultrapure (UpH₂O) jusqu'à 50 mL

Préparation du citrate :

PM = 294.10
Pour obtenir 50 mL de citrate à [100 mM] : peser 1,47g et ajouter de UpH₂O jusqu'à 50 mL

Préparation du tampon citrate :

Pour obtenir 50 mL de tampon citrate à [0,1 M] – pH 4,5 : mélanger volume à volume soit 25 mL d'acide citrique et 25 mL de citrate puis ajuster le pH.

Préparation de la STZ :

Pour injecter 45 mg/kg de STZ par rat de 350g : diluer 15,75 mg de STZ dans 200 μ L de tampon citrate

Références produits

- ✓ Acide citrique 99% : Sigma 240621
- ✓ Sodium Citrate Dihydrate : Sigma W 302600
- ✓ Streptozotocine : Sigma S0130

Références bibliographiques

Pour revue, Szkudelski (2001)

L'action de la STZ sur les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas est accompagnée par des **altérations caractéristiques des concentrations sanguines d'insuline et de glucose.**

L'injection de STZ conduit finalement à une **hyperglycémie chronique** et à une diminution de la concentration sanguine en insuline.

Confirmation du diabète

- 72 heures après l'injection de STZ
- $[\text{glucose}]_{\text{sanguin}}$ mesurée au niveau de la queue à l'aide d'un glucomètre
- $[\text{glucose}]_{\text{sanguin}} > 250 \text{ mg/dL}^{-1}$
- détection de corps cétoniques par le glucomètre ou par des bandelettes urinaires
- perte de poids



Références matériels

- ✓ Glucomètre MediSense Optium
- ✓ Bandelettes urinaires Keto-Diastix® - Bayer Diagnostic

Préparation du PFS

- Solution à 10% préparée quotidiennement (Pesée de 10 gr de PFS pour 100 mL d'eau)
- Dilution dans l'eau du robinet dans l'heure précédant l'administration
- Agitation par vortex jusqu'à dilution complète de la poudre

Administration du PFS

- Ajustement du volume administré selon le poids de chaque animal
- Administration avec une seringue munie d'une canule de gavage. L'embout permet d'introduire le produit en arrière de la langue de l'animal, ce qui déclenche un réflexe de déglutition et assure l'absorption complète de la dose
- Le produit est administré à heure fixe, en début d'après-midi

Les animaux des groupes placebo étaient soumis aux mêmes manipulations, de l'eau pure étant administré à la place du PFS.



Administration du PFS



Canule

Dès la confirmation du diabète, les animaux concernés sont placés sous **insulinothérapie** jusqu'à la fin du protocole.

Les doses d'insuline sont **individuellement ajustées** afin de maintenir un état euglycémique.

Le traitement en pratique

- injection quotidienne à heure fixe (l'après-midi, soit environ 4 heures après la session d'entraînement pour les rats entraînés)
- utilisation d'un stylo d'insuline injectable
- doses comprises entre 8 et 15 U/kg

Suivi de la glycémie et ajustement du traitement

- contrôle fréquent de la glycémie, en fonction de l'état de la queue des animaux, soit au niveau de la veine de la queue grâce au glucomètre, soit au niveau urinaire grâce aux bandelettes urinaires
- adaptation de la dose d'insuline en fonction de la valeur de glycémie obtenue



Stylo d'insuline



Injection sous-cutanée de l'insuline

Références médicaments

- ✓ Insuline Glargine Lantus
Optiset – Sanofi Aventis

FICHE TECHNIQUE N°6
Protocole d'entraînement en endurance

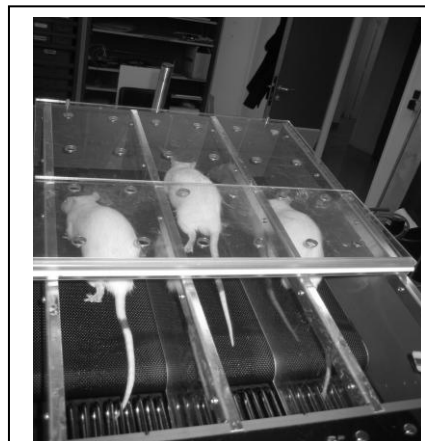
Organisation

- Familiarisation des animaux durant une semaine à l'animalerie
- Entraînement sur tapis roulant
- Réalisation de toutes les sessions d'entraînement au même moment de la journée, le matin
- Début du protocole d'entraînement une semaine jour pour jour après l'injection de streptozotocine

Protocole

En accord avec la littérature, l'entraînement consiste en une **course continue d'intensité et de durée progressives**, divisé en 3 périodes (Broderick et coll. 2005). Son intensité (durée et vitesse) est augmentée progressivement, la pente du tapis restant fixe sur toute la durée du protocole d'entraînement.

- 8 semaines d'entraînement, à raison de 5 jours par semaine
- pente de 10°
- 1^{ère} période : 2 semaines avec pour objectif final 10 min à 20 m/min
- 2^{ème} période : 3 semaines à 40 min à 22 m/min
- 3^{ème} période : 3 semaines à 60 min à 25 m/min



Entraînement des animaux sur
tapis roulant

Compte-rendu de séance pour chaque rat

- ✓ Date
- ✓ Durée de la course
- ✓ Vitesse et pente du tapis
- ✓ Poids
- ✓ Appréciations sur la qualité de la séance

Références matériel

- ✓ Tapis roulant : Exer 3/6
Treadmill, Columbus
Instruments

FICHE TECHNIQUE N°7

Suivi des animaux au cours des études - Sacrifice

Contrôle du poids

- Pésée sur une balance classique de tous les animaux le matin, avant la séance d'entraînement pour les animaux entraînés

But

- Contrôler régulièrement l'état physique des animaux, leur tolérance au diabète (et à l'entraînement)
- Comparer l'évolution des masses corporelles des rats selon leur prise en charge (PFS, insuline, entraînement)

Sacrifice

- Anesthésie réalisée 24h après la dernière session d'entraînement ou la dernière administration de PFS selon le protocole
- Anesthésie par injection intrapéritonéale de pentobarbital de sodium (50 mg/kg)
- Prélèvements pour l'ensemble des expérimentations des muscles soléaire et gastrocnémien. Ces échantillons sont immédiatement congelés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C dans l'attente des analyses
- Dans certaines expérimentations, le sang est prélevé au niveau de la veine cave inférieure puis centrifugé à 1500G pendant 10 min à température ambiante. Le surnageant constituant le plasma est alors prélevé et congelé à -80°C dans l'attente des analyses.



Références produits

- ✓ Pentobarbital de sodium : Ceva Santé Animal

FICHE TECHNIQUE N°8
Préparation des tissus pour analyses biologiques

Les muscles prélevés lors du sacrifice sont immédiatement refroidis dans l'azote liquide puis stockés à -80°C.

Pour réaliser les différentes analyses ultérieures, les tissus doivent être homogénéisés dans un tampon. La technique du cryobroyage consiste à réduire le muscle congelé en poudre. L'avantage de cette technique est l'obtention d'une poudre homogène, qui peut ensuite être dissoute dans différents tampons, selon les besoins particuliers de chaque dosage

Technique du cryobroyage

- Le mortier est placé dans un saladier contenant de l'azote liquide (principalement du bain-marie)
- Les cryotubes contenant les échantillons sont placés dans de l'azote liquide pour être fortement refroidi préalablement au cryobroyage
- L'échantillon est ensuite placé dans le mortier, et réduit rapidement en une fine poudre grâce au pilon. Ce dernier doit être plongé dans l'azote liquide avant d'entrer en contact avec l'échantillon
- La poudre est ensuite répartie à l'aide d'une spatule bien sèche et refroidie dans l'azote liquide, dans des eppendorfs contenant les tampons adéquats (refrigérés depuis 24h minimum), puis stockés à -80°C. Les tissus sont dilués au 1/10^{ème} (poids/volume).
- A aucun moment, l'échantillon ne doit décongeler pendant la manipulation.

Récupération du surnageant

- Décongeler doucement dans la glace l'eppendorf contenant la poudre dans le tampon
- Soniquer 60 secondes sur glace (à 50Hz, Puissance sortie: 2, Cycle actif: 20 %)
- Centrifuger 13 mn à 1500 g à 4°C
- Prélever le surnageant & l'aliqoter selon les besoins

Tampon phosphate (utilisé par défaut)

Solution 1

(Na₂HPO₄ 0,1 M, EDTA 2 mM)

Solution 2

(NaH₂PO₄, H₂O 0,1 M, EDTA 2 mM)

Tampon d'homogénéisation

Ajouter à la solution 1 la solution jusqu'à obtenir un pH de 7,5

Tampon spécifique pour Western Blot

Tris HCl 200 mM, NaCl 20 mM, 0,5% Triton X-100
Ajuster le pH à 7,4
Ajouter un cocktail d'Antiprotéases

Isoprostanes

Ajouter 10µL de BHT dans 1mL de tampon

GSH/GSSG

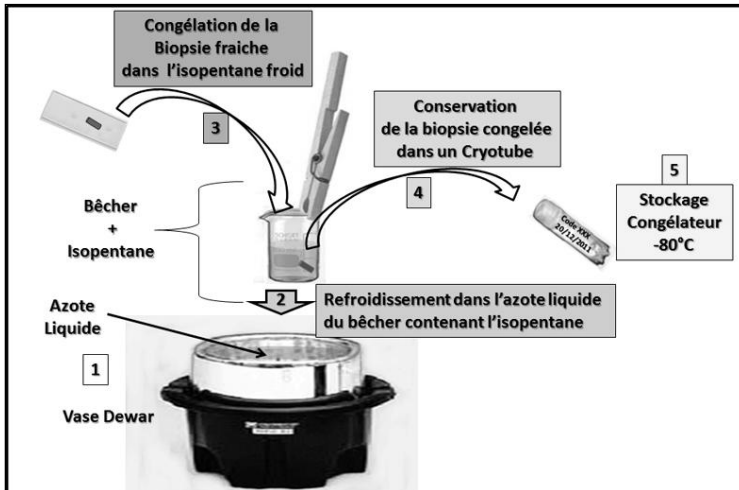
Ajouter 5µL de M2VP (scavenger fourni dans le kit)

Références produits

- ✓ EDTA : VWR 33 600.267
- ✓ Na₂HPO₄ : Sigma S 0876
- ✓ NaH₂PO₄, H₂O: Sigma S 9638
- ✓ Tris base : Sigma T1503
- ✓ Sodium chloride 99,5% : Sigma S7653
- ✓ MgCl₂ : Fluka 63068
- ✓ Cocktail d'antiprotéases : Roche 04693116001
- ✓ Acide citrique 99% : Sigma 240621
- ✓ Sodium Citrate Dihydrate : Sigma W 302600

FICHE TECHNIQUE N°9

Préparation des sections d'aorte pour étude histochimique

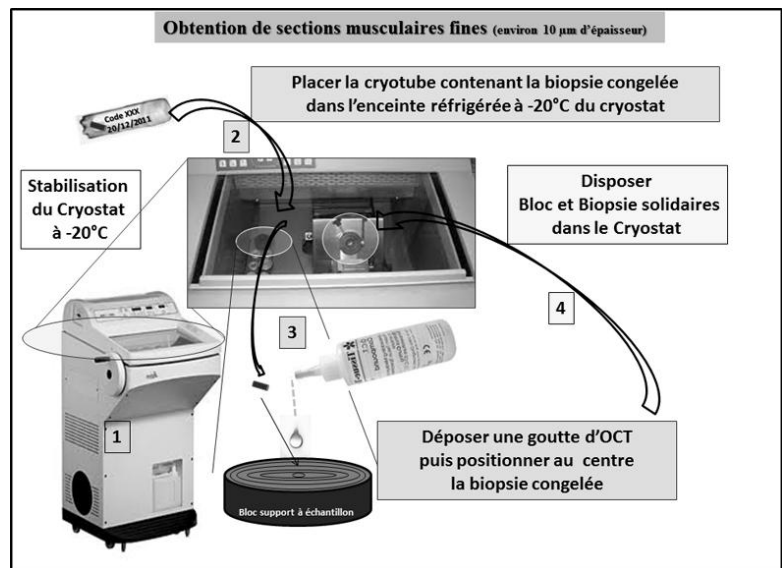


Lors du protocole incluant l'étude histochimique des vaisseaux, l'aorte est prélevée avec le plus grand soin puis découpée en petites sections.

Chaque section est incluse dans une résine d'enrobage (Tissu-Tek, OCT) selon les différentes étapes présentées ci-contre, puis stockés à -80°C jusqu'à la préparation des lames de tissus.

Pour la préparation des lames utilisées pour le marquage, les sections aortiques incluses dans le Tissu-Tek OCT sont placées dans le cryostat pour s'équilibrer en température (-20°C).

Le bloc de résine contenant l'échantillon est ensuite fixé sur le support par du Tissu-Tek OCT, puis finement découpé (10µm). Chaque "tranche" est positionnée sur une lame de verre à température ambiante par électrostatisme. Après 2h de séchage à température ambiante, la lame peut-être utilisée immédiatement pour le marquage ou stockée à -20°C.



Références matériel

- ✓ Cryostat Leica CM 1850

Références produits

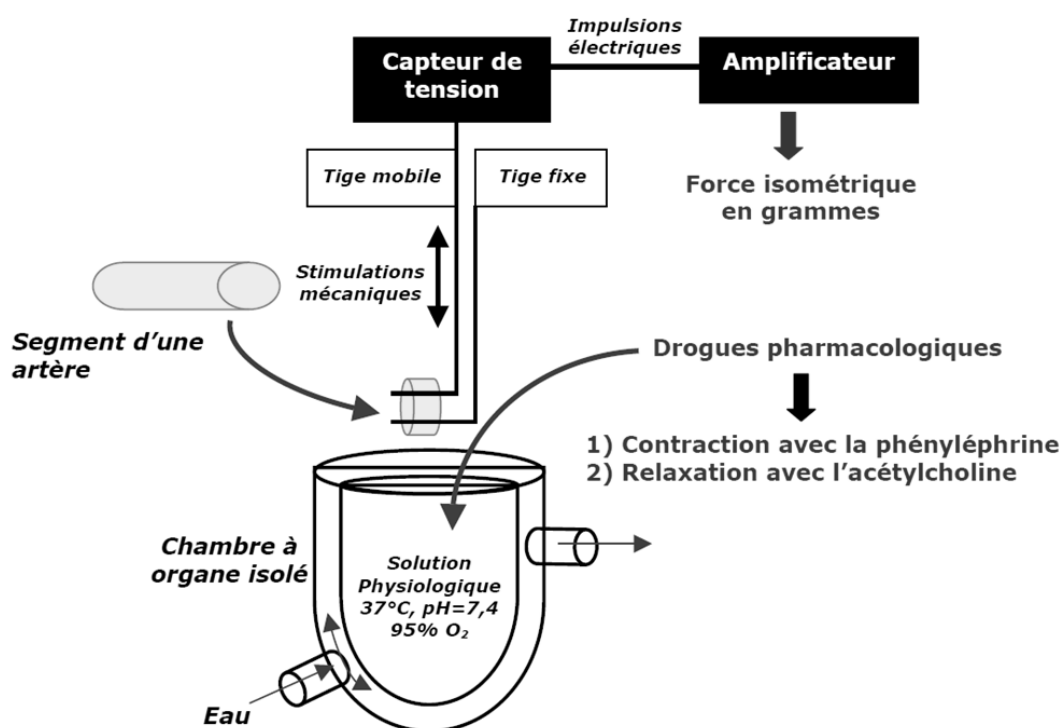
- ✓ 2-methylbutane : Fluka 59060
- ✓ Tissu-Tek OCT : FisherSci 14-373-65

FICHE TECHNIQUE N°10

Etude de la fonction vasculaire par la technique des vaisseaux isolés

Principe général

Chez l'animal, l'exploration de la capacité de relaxation nécessite le plus souvent des techniques *in vitro* d'artères isolées en chambre d'organes. Les capacités de relaxation ou de dilatation sont évaluées en injectant dans le bain d'organe des concentrations croissantes de vasodilatateurs sur des segments artériels pré-contractés par un vasoconstricteur comme la noradrénaline ou la phényléphrine.



Les segments d'aorte prélevés sont placés entre deux tiges métalliques, reliées l'une à l'autre par un capteur de tension. La tension isométrique est mesurée en utilisant la force de déplacement à laquelle est soumis la tige mobile lorsque le segment artériel se contracte ou se relâche. L'anneau aortique baigne dans la cuve à organe isolée, remplie d'une solution physiologique. Différentes drogues pharmacologiques sont ajoutées à ce bain : phényléphrine pour déclencher une contraction, acétylcholine pour apprécier le relâchement, et des inhibiteurs des enzymes productrices d'anion superoxyde dans les cellules endothéliales (L-Name, apocynine, allopurinol pour inhiber respectivement la eNOS, la NADPH-oxydase, et la xanthine oxydase), afin de déterminer l'impact de ces différentes voies dans la fonction vasomotrice

FICHE TECHNIQUE N°11
Dosage des protéines par la méthode de Lowry

Cette méthode a été développée par **Lowry et al. (1951)** afin de déterminer la quantité totale de protéines contenue dans un échantillon.

Protocole :

- Préparer le milieu réactionnel : (pour obtenir 40 mL de ce milieu)
 - Solution B : 400 µL
 - Solution C : 400 µL
 - QSP Solution A 40 mL : 39,2 mL
- Faire en double 1 gamme de 0 à 25 mg/mL de Sérum Albumine Bovine (BSA) à partir d'une solution à 50 mg/mL
- Diluer les échantillons et la gamme au 1/50 : 10 µL d'homogénat/gamme dans 490 µL d'eau bidistillée. Prévoir 3 dosages par échantillons

- Ajouter 500 µL de milieu réactionnel dans chaque tube (gamme et échantillons)
- Incuber 30 min dans l'obscurité à température ambiante

- Ajouter 250 µL de réactif de Folin
- Incuber 20 min dans l'obscurité à température ambiante

- Doser par spectrophotométrie à 660 nm (lecteur microplaque)

Intérêts de la méthode

- Grande sensibilité (de l'ordre de 5-10 µg)

Préparation des solutions stock pour Lowry (conserver à 4°C dans l'obscurité)

Solution A

- NaOH : 0,4 g
- CO₃Na₂ : 2 g
- QSP H₂O : 100 ml

Solution B (Sulfate de cuivre 1%)

- CuSO₄·5H₂O : 0,4 g
- QSP H₂O : 10 ml

Solution C (Tartrate de sodium 1%)

- C₄H₄O₆Na₂ : 0,4 g
- QSP H₂O : 10 ml

Références produits

- ✓ BSA : Sigma A7906
- ✓ Réactif de Folin : Sigma F9252
- ✓ NaOH : Sigma 71694
- ✓ CO₃Na₂ : Sigma S7795
- ✓ CuSO₄·5H₂O : Fluka 61230
- ✓ C₄H₄KNaO₆·4H₂O : Sigma S2377

Référence matériel

- ✓ Spectrophotomètre : Lecteur Microplaque 3 en 1 (Biotek Synergy HT)

FICHE TECHNIQUE N°12
Mesure de l'activité de la citrate synthase

La mesure de l'activité de la **citrate synthase (CS)**, enzyme du cycle de Krebs, permet de vérifier et d'attester de l'efficacité du programme d'entraînement sur le potentiel aérobie.

Principe général

La citrate synthase est une enzyme du cycle de Krebs qui forme du citrate à partir de l'oxaloacétate et de l'acétylCoA. Cette activité est employée pour évaluer la quantité de mitochondries dans les tissus. Le CoA réduit (CoA-SH) formé lors de la réaction réagit avec l'acide 5,5' dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB) pour donner du TNB, qui absorbe spécifiquement à 412 nm. L'activité de la citrate synthase est donc mesurée en suivant l'augmentation de l'absorbance à 412 nm. La ligne de base est mesurée pour pouvoir soustraire une réaction spontanée de transfert d'électrons.

Protocole de mesure

- Dans une cuvette de 1 mL, mettre 930 µL du milieu de réaction et ajouter un volume d'homogénat tissulaire correspondant à 40µg de protéines. Mélanger.
- Incuber les cuves à 37°C, durant 5 min, dans le spectrophotomètre thermostaté
- Lire la ligne de base pendant 4 minutes à 37°C. Déclencher la réaction par 50 µL de 10 mM acide oxaloacétique dans 100 mM Tris HCl pH 8,1.
- Lecture toutes les 20 secondes durant 4 minutes

Composition du milieu de réaction

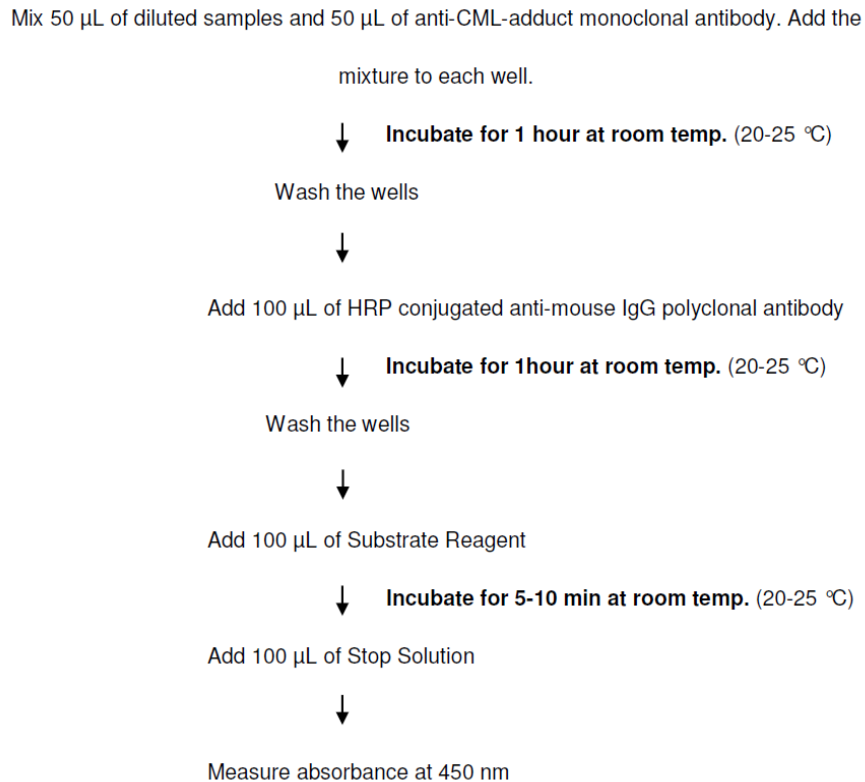
100 µM DTNB
100 mM Tris HCl pH 8,1
300 µM acétyl CoA
500 µM oxaloacétate
0,1 % Triton X100

Références produits

- ✓ DTNB : Sigma D218200
- ✓ Tris : Sigma 857645
- ✓ acétyl CoA: Sigma A2056
- ✓ oxaloacétate : Sigma 04126
- ✓ Triton : Sigma X100

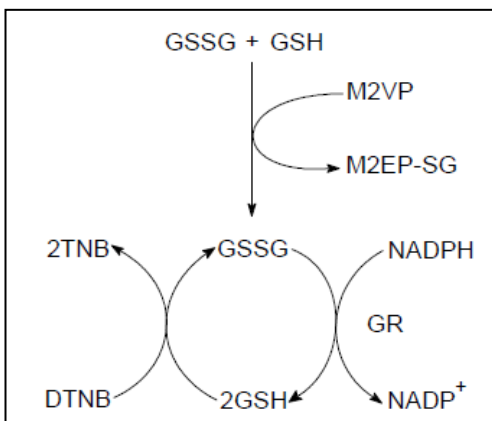
FICHE TECHNIQUE N°13
Mesure de la N-ε-carboxymethyl-lysine (CML)

La mesure de la concentration en CML dans les échantillons a été réalisée avec le kit CML/Ne-(carboxyméthyl) lysine ELISA Kit, de Circulex, selon les instructions du fabricant. Les différentes étapes du protocole sont présentées sur la figure ci-dessous.



FICHE TECHNIQUE N°14
Mesure du rapport glutathion réduit/glutathion oxydé

La mesure du GSH et GSSG est réalisée avec le kit BIOXYTECH® GSH/GSSG-412, d'OxisResearch, basé sur une réaction colorimétrique, selon les instructions du fabricant.



Le réactif d'Ellman, ou DTNB, réagit avec le GSH pour former un produit détectable par spectrophotométrie à 412nm. Le GSSG peut être déterminé après sa réduction en GSH, ce dernier étant dosé par le DTNB. La méthode de Tietze, sur laquelle se base le kit, évalue le changement de couleur pendant la réaction, et la vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration en GSH et GSSG.

FICHE TECHNIQUE N°15 Mesure des isoprostanes

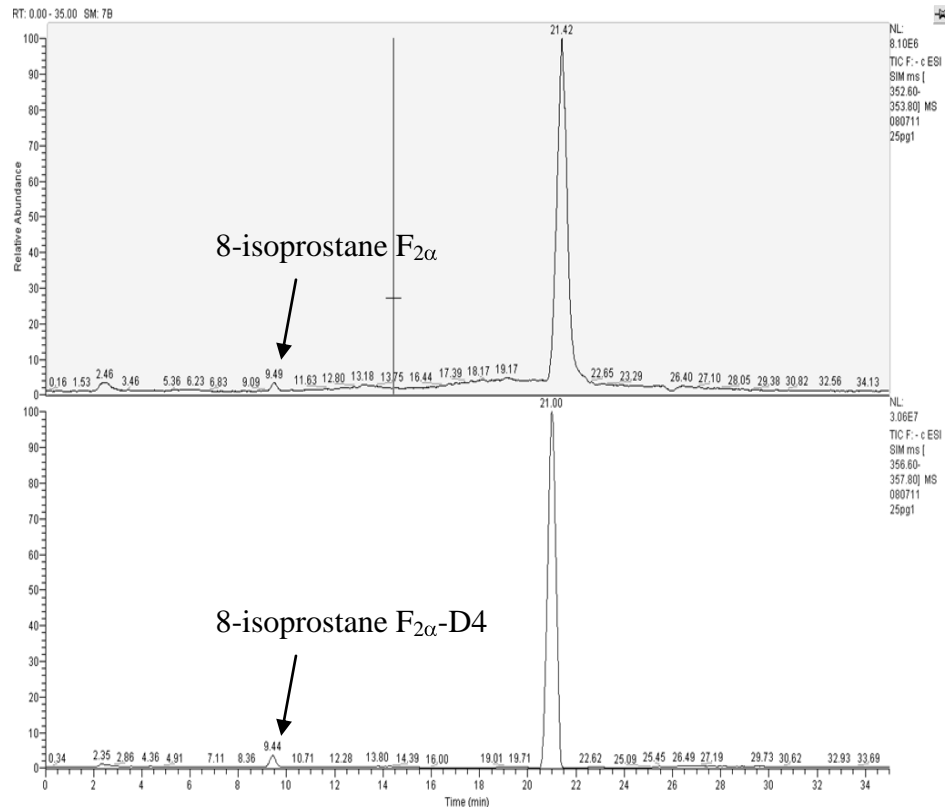
Le dosage des isoprostanes consiste en une 1ère phase d'extraction, puis dans le dosage proprement dit par LC/MS.

Protocole d'extraction tissulaire

- Dans un tube à hémolyse mettre dans l'ordre :
 - 1 ml de plasma après l'avoir centrifugée
 - 10 µl de 8-isoPs F_{2α}-d₄ (80 ng/l) (IS)
 - 10 µl de BHT 100 mM dans l'éthanol
 - 10 µl de déféprone 20 mM
 - 10 µl de desféral 20 mM
 - 1 ml de KOH à 15 % wt/vol (15g/100ml H₂O distillée)
- Entourer le tube de papier d'aluminium
- Chasser l'air à l'intérieur du tube avec de l'argon
- Placer au bain marie à 37°C pendant 1 heure (hydrolyse des protéines)
- Ajouter 3.5 ml de KH₂PO₄ 1M
- Ajouter 2 ml de Column Buffer, pH résultant : 7.2 - 7.4
- Passer le contenu du tube sur une colonne d'immuno-affinité F_{2α}-isoprostanes (Cayman) préalablement préparée. Ne pas la laisser s'assécher.
- Rincer avec 4 ml de Column Buffer.
- Rincer avec 2 × 2ml d'eau distillée.
- Eluer dans un microtube de 2 ml avec 2 ml de mélange 95/5 v/v Ethanol HPLC/H₂O
- Evaporer à sec
- Reprendre avec 100 µl de phase mobile (cf. paramètres de séparation et d'analyse)
- Stocker à -20°C

Dosage par LC/MS

L'échantillon repris dans 20µL de phase mobile est injecté dans le système de chromatographie liquide haute-performance (Surveyor, Thermo Finnigan), reliée au spectromètre de masse LCQ Deca (Thermo Finnigan). Les échantillons sont analysés en mode SOM pour les ions F_{2α}-isoprostane (m/z 353.2) et le standard interne deutérié (m/z 357.2). La concentration en F_{2α}-isoprostane de chaque échantillon est calculée par la ration des pics m/z 353.2 and m/z 357.2

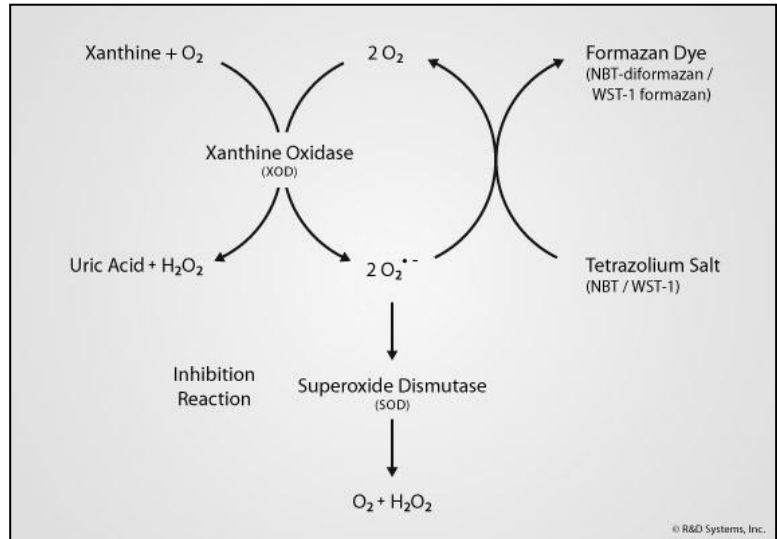


FICHE TECHNIQUE N°16

Mesure de l'activité de la superoxyde dismutase SOD

La mesure de l'activité de la SOD a été effectuée à l'aide du kit Ransod, de Randox (Irlande), selon les instructions du fabricant.

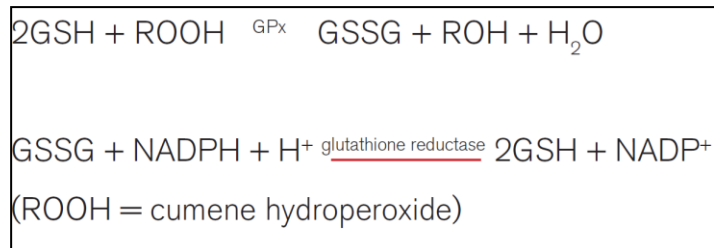
La méthode utilise la xanthine et la xanthine oxydase pour générer l'anion superoxyde, qui réagit avec le triphényl-2,3,5-tétrazolium chlorure, ou I.N.T. /N.B.T, produisant du formazan, un composé rouge. L'activité de la SOD est alors mesurée par le degré d'inhibition de cette réaction. Une unité de SOD est la quantité de SOD nécessaire pour induire une diminution de 50% du taux de formation du rouge formazan dans les conditions du kit.



FICHE TECHNIQUE N°17

Mesure de l'activité de la glutathion peroxydase GPx

La mesure de l'activité de la GPx a été effectuée à l'aide du kit Ransel, de Randox (Irlande), selon les instructions du fabricant.



La méthode est basée sur celle de Paglia et Valentine : la GPx catalyse l'oxydation du GSH par l'hydroperoxyde de cumène. En présence de glutathion réductase et de NADPH, le glutathion oxydé (GSSG) est immédiatement converti en glutathion réduit, avec l'oxydation concomitante du NADPH en NADP⁺. La diminution dans l'absorbance à 340nm est mesurée. Une unité de GPx correspond à 1 µmol de GSSG/NADPH convertie en GSH/NADP⁺ en 1 minute.

FICHE TECHNIQUE N°18
Mesure de la capacité antioxydante total par ORAC

Principe général

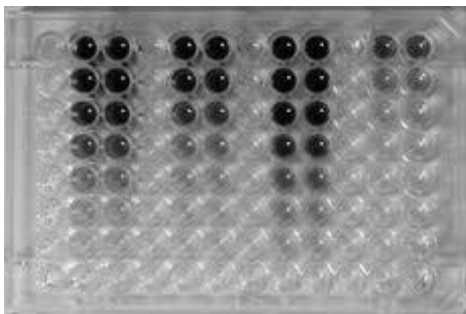
Déterminer le pouvoir antioxydant du plasma ou d'un homogénat tissulaire par une étude de la courbe de décroissance de la fluorescence en présence d'AAPH (initiateur radicalaire).

On mesure la protection contre l'oxydation de la fluorescéine, oxydation induite par l'AAPH

L'antioxydant de référence est le Trolox (un équivalent hydrosoluble de la vitamine E)

Protocole :

- Faire 1 gamme de 6,25 à 50µM de Trolox à partir d'une solution à 50 mg/mL
- Diluer les échantillons dans 500µL de tampon phosphate et 450µL d'acide perchlorique pour précipiter les protéines
- Prélever 50µL de surnageant, rediluer dans 950µL de tampon phosphate, et déposer 20µL dans chaque puit sur une plaque 96 puits.
- Utiliser le dispenser pour déposer dans chaque puit 37,5µL d'AAPH et 200µL de solution 3 de fluorescéine.
- Doser par spectrophotométrie à 520 nm au lecteur microplaque



Préparation des solutions stock

Solution de Trolox :

- Préparer une solution stock à 500µM
- Dissoudre 2mg de Trolox dans du RMCD 7%

Solution de fluorescéine

- Solution 1 : peser 22.5 mg de fluorescéine et ajouter 50 ml de tampon phosphate 75 mM à pH 7. Stocker à 4°C dans le noir.
- Solution 2 : prélever 50 µl de la solution 1 et 10 ml de tampon phosphate 75 mM à pH 7 (à préparer fraîchement tous les jours.)
- Solution 3 (utilisée pour les puits) : 320 µl de solution 2 et 20 ml de tampon phosphate (à préparer fraîchement tous les jours)

Solution d'AAPH :

- Préparer une solution à 10mM, dans du tampon phosphate chauffé à 37°C

Références produits

- ✓ Trolox : Sigma 238813
- ✓ AAPH : Sigma 440914
- ✓ Fluorescéine: Fluka 32615
- ✓ Acide perchlorique : Sigma 244252

Référence matériel

- ✓ Spectrophotomètre : Lecteur Microplaque 3 en 1 (Biotek Synergy HT)

Principe général

Le western blot ou immunoblot est une méthode de protéomique, ayant recours à la biologie moléculaire, la biochimie et l'immunogénétique, pour détecter une protéine spécifique sur un échantillon donné d'extrait ou d'homogénat tissulaire. Brièvement, la technique utilise l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour séparer les protéines selon leur masse. Les protéines sont ensuite transférées depuis le gel sur une membrane (nitrocellulose ou PVDF) puis exposées à un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt. Il est ainsi possible grâce à cette technique de détecter la présence d'une protéine dans un tissu, d'évaluer sa masse et de comparer son expression en fonction de différentes conditions expérimentales.

Intérêts de la technique :

Sensibilité :

- Faible quantité d'antigène détectable
- Faible quantité d'anticorps requise

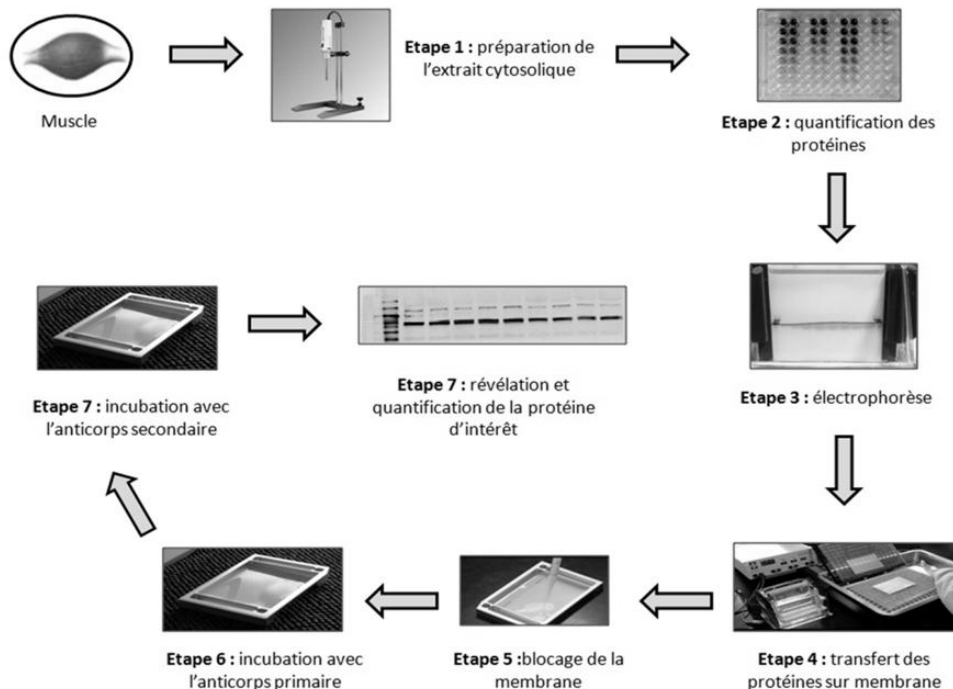
Hautement résolutif :

- Signal facilement quantifiable
- Fort contraste
- Sécurité de la chimioluminescence (non radioactif)

Limites de la technique

- Technique semi-quantitative
- Normalisation des résultats dans l'étude de population importante
- Sensibilité variable (spécificité et qualité de l'anticorps)

Schéma récapitulatif de la technique « Western Blot »



FICHE TECHNIQUE N°20
Electrophorèse – Préparation des gels

Principe de l'électrophorèse : cette opération vise à séparer les protéines d'un échantillon selon leurs poids moléculaire. Ces protéines, chargées négativement sous l'effet du Sodium DocéylSulfate (SDS), sont placées sous l'influence d'un champ électrique dans un gel d'acrylamide, ce qui permet leur séparation selon leur poids moléculaire. On parle de **SDS-PAGE : SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis**.

Préparation du gel de séparation pour 2 gels de 1,5 mm (exemple à 12,5% Acrylamide) :

- Préparer dans un Falcon de 50 mL :
 - 8019 µl d'H₂O bidistillée
 - 4000 µl TRIS 1,5 M pH 8,8
 - 3645 µl d'Acrylamide 40%
 - 160 µl SDS 10 %
 - 160 µl APS 10 %
 - 16 µl TEMED
- Couler le gel entre les plaques de verre en remontant jusqu'à 0,5 cm du peigne
- Ajouter de l'eau bidistillée avec une pipette pasteur pour faire disparaître les bulles et de manière à obtenir une surface plane
- Après polymérisation, enlever l'eau bidistillée

Préparation du gel de concentration pour 2 gels de 1,5 mm (exemple à 4 % Acrylamide) :

- Préparer dans un Falcon de 15 mL :
 - 5000 µl d'H₂O bidistillée
 - 2000 µl TRIS 0,5 M pH 6,6
 - 800 µl d'Acrylamide 40%
 - 80 µl SDS 10 %
 - 80 µl APS 10 %
 - 10 µl TEMED
- Couler le gel entre les plaques de verre en remontant jusqu'à en haut des plaques puis ajouter le peigne
- Après polymérisation, retirer les peignes et rincer les puits avec une picette d'eau bidistillée.
- Monter l'appareil de migration
- Remplir les réservoirs supérieur et inférieur de la cuve avec le tampon de migration 1X

Préparation des solutions stock :

- **Persulfate d'ammonium (APS) 10% :** dissoudre 100 mg d'APS dans 1 ml d'eau bidistillée
- **Tris 1,5 M, pH 8,8 :**
 - Tris Base : 27,23 g
 - H₂O bidistillée : 80 ml
 - Ajuster le pH à 8,8 avec HCl
 - QSP H₂O à 150 ml
- **Tris 0,5 M, pH 6,8 :**
 - Tris Base : 6 g
 - H₂O bidistillée : 60 ml
 - Ajuster le pH à 6,8 avec HCl
 - QSP H₂O à 100 ml
- **SDS 10 % :** dissoudre 10 g de SDS dans 100 ml d'eau bidistillée
- **Tampon de migration 5X :**
 - Tris Base : 15 g
 - Glycine : 72 g
 - SDS : 5 g
 - QSP H₂O à 1 L

Rôle des gels :

- **Le gel de concentration** ("stacking gel") est le gel dans lequel les protéines entrent dans l'acrylamide. Il sert à entasser les diverses espèces protéines en bandes très minces pour augmenter la résolution de la séparation. Dans cette section du gel les protéines ne se séparent pas, elles migrent ensemble en s'entassant dans un volume plus petit que le dépôt. L'acrylamide y est très peu concentré (autour de 4%) de sorte que toutes les protéines migrent ensemble à la même vitesse

- **Le gel de séparation** ("separating gel") est le gel dans lequel les protéines entassées dans le gel de tassement se séparent les unes des autres. L'acrylamide y est plus concentré (de 8 à 20%) de sorte que les protéines se séparent puisqu'elles migrent à des vitesses différentes, étant retardées selon leur poids moléculaire.

Références produits

- ✓ Ammonium Persulfate : Sigma A3678
- ✓ SDS : Sigma L390
- ✓ Temed : Sigma T9281
- ✓ Glycine : Sigma G7126
- ✓ Acrylamide bis 40% : Bio-Rad 161- 0148

FICHE TECHNIQUE N°21

Electrophorèse – Préparation des échantillons et migration



Préparation du tampon de dépôt 3X (50 mL):

- Tris-HCl à 0,5 M, pH 6,8 : 3,15 mL
- Glycerol : 10 mL
- SDS 20% : 5 mL
- β -mercaptoéthanol : 2,4 mL
- H₂O : 29,45 mL
- Bleu de bromophénol à 1% : 50mg

- Aliquoter et stocker à -20°C

Préparation des dépôts :

- Diluer au 1/3 les échantillons avec ce tampon en ajustant les volumes d'échantillons de manière à avoir la même quantité de protéines dans chaque puit
- Chauffez les échantillons à 95°C pendant 5 min
- Centrifuger les échantillons avec une centrifugeuse de paillasse durant 10 s
- Effectuer les dépôts des échantillons dans chaque puit
- Remplir la cuve de tampon de migration

Migration :

1. 60 V le temps que les dépôts sortent des puits et parviennent au gel de séparation
2. 90V pendant environ 2h en fonction des protéines d'intérêt

Utilité du Bleu de bromophénol :

Le tampon de l'échantillon versé dans chaque puit contient un colorant ionisé, généralement le bleu de bromophénol, qui permet de suivre l'électrophorèse. Ce colorant n'est absolument pas retardé durant la migration et indique donc le front de migration électrophorétique. Quant il atteint le bas du gel, l'électrophorèse est arrêtée.

Préparation des solutions stock :

Bleu de bromophénol

- Bleu de bromophénol : 100 mg
- H₂O distillée : 10 mL
- Aliquoter puis conserver à -20°C

Références produits :

- ✓ Bleu de bromophénol : Sigma B8026
- ✓ β -mercaptoéthanol : Sigma M7154
- ✓ Glycérol : Sigma G 5516

Référence matériel :

- ✓ Mini-trans Blot electrophoretic transfer cell: Biorad 170-3930

FICHE TECHNIQUE N°22

Transfert

Principe du transfert : le principe est le même que celui de l'électrophorèse. Après l'électrophorèse, les protéines sont toujours fixées par le SDS et donc chargées négativement. En les plaçant de nouveau sous l'influence d'un champ électrique, les protéines vont pouvoir alors migrer du gel pour se fixer sur une membrane de nitrocellulose (ou PVDF).

Préparation du gel :

- Démouler le gel
- Enlever le gel de concentration
- Couper le côté en haut à gauche, diagonalement opposé au puit n°1 (poids moléculaire)

Préparation du sandwich :

- Mettre la partie grise vers l'opérateur
- Placer une éponge
- Placer un papier filtre
- Placer le gel
- Placer la membrane de nitrocellulose (0,2 µm)
- Enlever les bulles en faisant rouler une pipette sur l'ensemble
- Placer un papier filtre
- Placer une éponge
- Fermer le sandwich après avoir de nouveau enlever les bulles

Mise en place :

- Placer le sandwich dans le support (côté noir vers le noir – cathode)
- Placer le support dans la cuve rempli de tampon de transfert
- Laisser migrer en chambre froide durant 1h30 à 100 V ou toute une nuit à 30V

Préparation du tampon de transfert :

- Tampon de transfert (TT) (5x)
 - Tris base : 12 g
 - Glycine : 57,6 g
 - SDS : 0,4 g
 - QSP H₂O 800 mL

A diluer 5 fois, soit pour 1 L de transfert 1X :

- 200 mL de TT 5x
- 200 mL de méthanol (20%)
- QSP H₂O 1 L

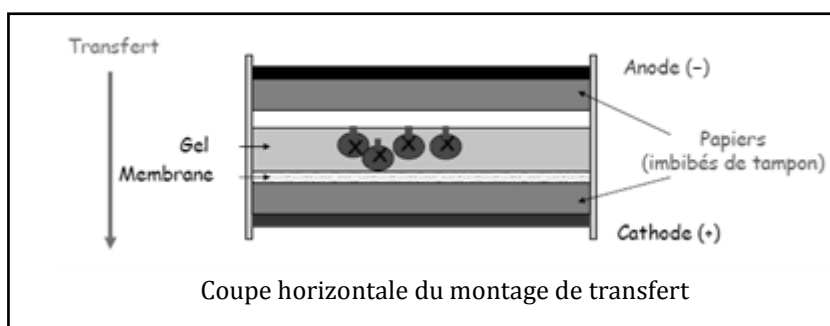
Le tampon de transfert doit être préparé et conservé au minimum 2h à 4°C avant le transfert si celui-ci s'opère à 100V.

Références produits :

- ✓ Membrane nitrocellulose 0,2 µm ou 0,45 µm selon les protéines d'intérêt : Biorad 162-0112 /162-0115

Références matériel:

- ✓ Système transfert : Biorad Mini Trans-Blot cell



FICHE TECHNIQUE N°23
Blocage de la membrane

Principe du blocage : Le blocage de la membrane permet de saturer les sites d'interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps. Il consiste à plonger la membrane dans une solution de BSA ou de lait en poudre sans matières grasses. Sans cette procédure, les anticorps appliqués lors de l'étape suivante se fixeraient partout sur la membrane nitrocellulose.

Coloration au rouge ponceau :

- Colorer la membrane en l'incubant quelques secondes dans le rouge Ponceau
- Visualiser la membrane et vérifier que le transfert s'est bien déroulé

Rinçage de la membrane :

- Pour une membrane de 40 cm², laver 2 à 3 fois pendant 10 minutes dans 10 mL de TBS-T (ou PBS-T) 0,05% en agitation jusqu'à une disparition totale du marquage au rouge Ponceau

Blocage :

- Incuber la membrane 1 heure à température ambiante dans les tampons de blocage suivants (selon la protéine d'intérêt) :
 - TBS-T (PBS-T) 0,05% - Lait (5 à 10% selon les anticorps et protéines)
 - TBS-T (PBS-T) 0,05% - BSA (1 à 5%)

Préparation des tampons de lavage :

- **TBS 10x, pH 7,4**

- Tris base : 30 g
- NaCl : 80 g
- QSP H₂O distillée 1 L
- Ajuster le pH à 7,4 avec HCl

- **PBS 10x, pH 7,5**

- NaCl : 80 g
- Na₂HPO₄ : 11,5 g
- KCl : 2g
- KH₂PO₄ : 2 g
- QSP H₂O distillée 1 L
- Ajuster le pH à 7,5 avec NaOH

- **TBS-T ou PBS-T 1x (0,05%)**

- TBS ou PBS 10 x : 100 ml
- QSP H₂O à 1 L
- Ajouter 500 µl de Tween 20

Intérêts de la coloration au rouge Ponceau : Le rouge Ponceau est un marqueur chargé négativement qui va se fixer sur les acides aminés chargés positivement composant les protéines. L'usage du rouge Ponceau permet de se rendre compte si la migration des protéines dans le gel s'est fait correctement, mais également si le transfert s'est bien effectuée sur la membrane.

Références produits :

- ✓ Rouge ponceau : Sigma Fluka P7170
- ✓ Lait écrémé : Régilait
- ✓ Tween 20 : Sigma P 1379
- ✓ Na₂HPO₄ : Prolabo 28.028.298
- ✓ KCL : Sigma P9333
- ✓ KH₂PO₄ : Sigma P5379

FICHE TECHNIQUE N°24
Incubation avec l'anticorps primaire

Principe de l'incubation avec l'anticorps primaire:

La membrane de nitrocellulose contient l'ensemble des protéines de l'extrait cellulaire, il faut mettre en évidence spécifiquement la protéine recherchée. La meilleure méthode pour caractériser une protéine au milieu d'autres protéines est l'immuno-marquage. La protéine joue le rôle d'un antigène face à des anticorps spécifiques (AC primaires) de cette protéine.

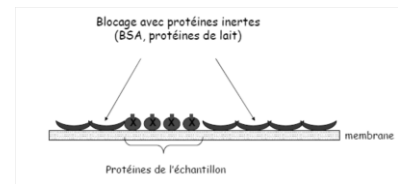
Incubation avec l'anticorps primaire :

- Diluer les AC selon la concentration recommandée pour chacun d'entre eux dans 10 ml de solution de blocage spécifique à chaque AC (BSA ou Lait à différentes concentrations)
- Déposer la solution contenant l'AC sur la membrane
- Laisser incubé toute la nuit à 4°C sous agitation

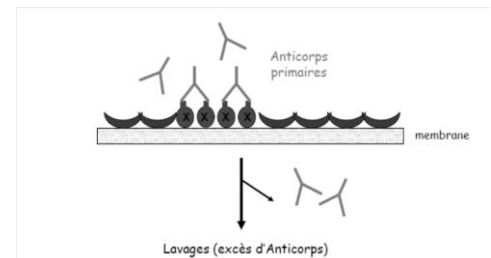
Lavage de la membrane :

- 3 lavages rapides de 5 minutes dans 10 ml dans la solution de lavage spécifique (TBS-T ou PBS-T 0,05%)

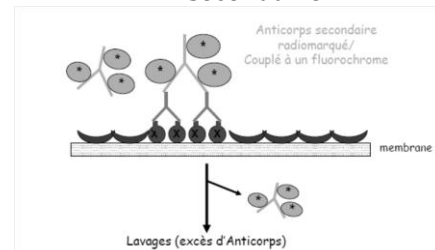
1. Blocage de la membrane



2. Incubation avec l'anticorps primaire



3. Incubation avec l'anticorps secondaire



Références anticorps secondaires

- ✓ Goat anti-mouse IRDye 800 antibodies (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE)
- ✓ Goat anti-rabbit IRDye 680 antibodies (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE)

Caractéristiques des anticorps primaires

Protéine	Poids (kDa)	Dilution	Source	Société	Références
CuZn-SOD	25	1 :5000	Rabbit	NovusBio	19301
Mn-SOD	25	1 :5000	Rabbit	Assay Design	SOD-110

Principe de l'incubation avec l'anticorps secondaire: Une fois le complexe antigène-anticorps formé, il faut le détecter. Cette étape se fait grâce à un deuxième anticorps (anticorps secondaire) qui détecte les emplacements où des anticorps primaires se sont fixés sur des antigènes ancrés à la membrane. L'anticorps secondaire est choisit en fonction de sa capacité à reconnaître une classe spécifique d'immunoglobulines (IgG) de l'espace animal d'où provient l'anticorps primaire.

Incubation avec l'anticorps secondaire :

- Diluer les AC selon la concentration recommandée pour chacun d'entre eux dans 10 ml de solution de blocage spécifique à chaque AC (BSA ou Lait à différentes concentrations)
- Déposer la solution contenant l'AC secondaire sur la membrane
- Laisser incuber 1h à température ambiante sous agitation

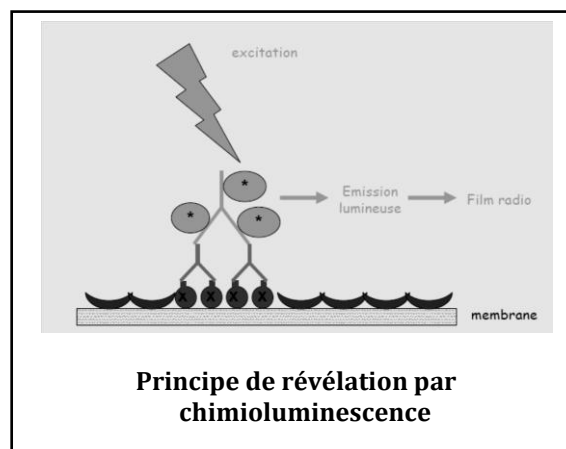
Lavage de la membrane :

- 3 lavages rapides de 5 minutes dans 10 ml dans la solution de lavage spécifique (TBS-T ou PBS-T 0,05%)

Principe de la révélation

Les anticorps secondaires, spécifiquement adaptés à l'appareil, sont liés à une sonde fluorescente dans l'infra-rouge.

La luminescence est l'émission de lumière résultant de l'énergie émise par une substance qui passe de l'état excité à un état fondamental. En chimioluminescence, cette excitation est provoquée par une réaction chimique.



Références produits

- ✓ Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit : RPN1235

FICHE TECHNIQUE N°26
Mesure du glucose et du glycogène musculaire

La mesure de la concentration du glucose a été réalisée par le kit Glucose GOD-PAP (Biolabo, France), selon les instructions du fabricant.

La méthode repose sur le principe de Trinder : le glucose est oxydé par le GOD en acide gluconique et H_2O_2 , qui réagit en présence de POD avec le chloro-4-phénol et le PAP pour former une quinonéimine rouge. L'absorbance du complexe coloré, proportionnelle à la concentration en glucose dans l'échantillon, est mesurée à 500 nm.

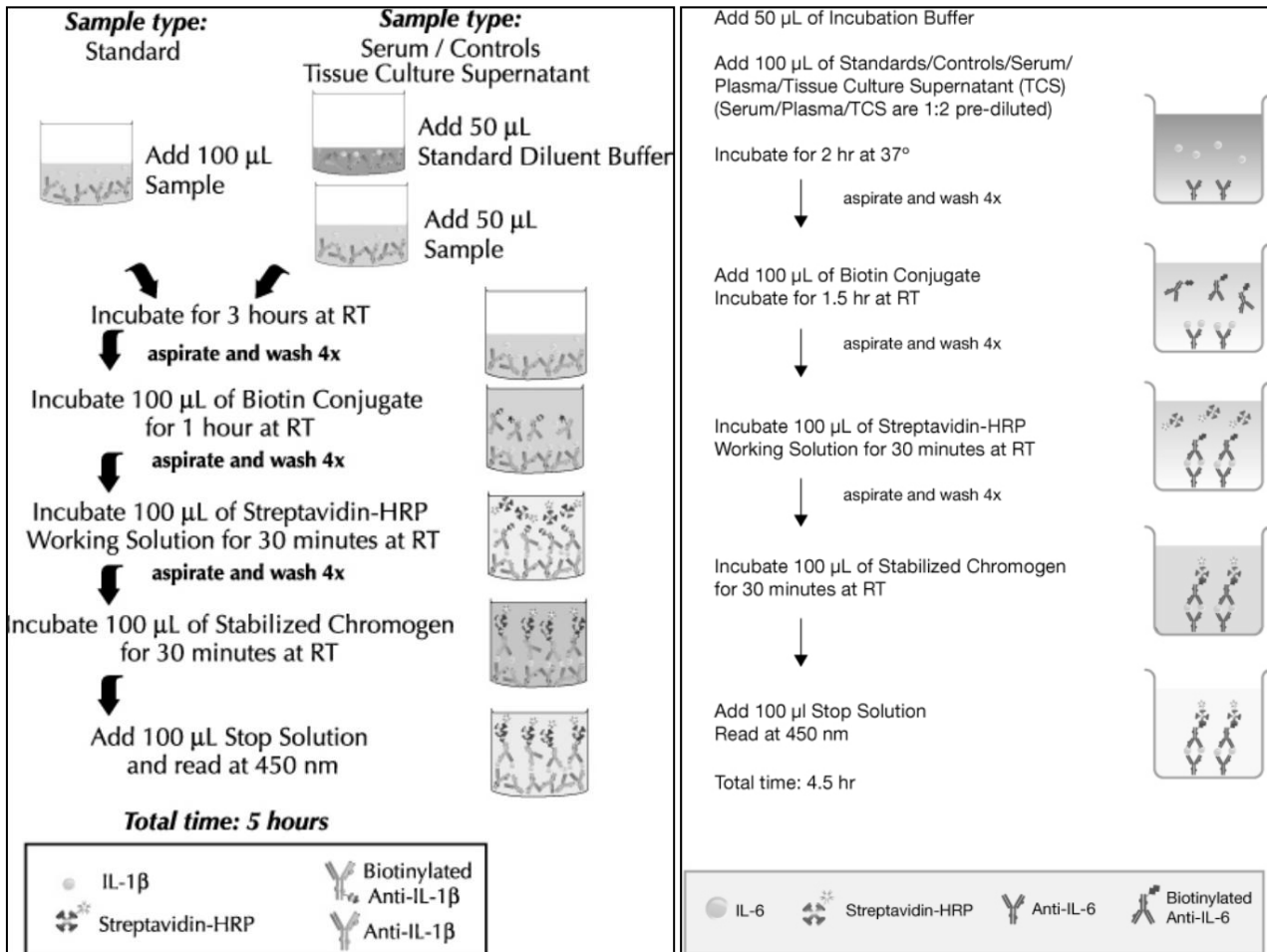


La mesure du glycogène musculaire repose sur son hydrolyse préalable par l'alpha-amyloglucosidase, puis la détermination du glucose dans l'échantillon selon la méthode ci-dessus. Une seconde détermination de la concentration en glucose de l'échantillon, sans hydrolyse préalable du glycogène par l'alpha-amyloglucosidase, permet de déterminer la concentration initiale en glucose. La différence entre les points mesurés représente la quantité de glucose résultant de l'hydrolyse du glycogène.

FICHE TECHNIQUE N°27
Mesure des interleukines 1 et 6

La mesure de la concentration des interleukines 1 et 6 a été réalisée par les kits IL-1 β et IL-6 Rats de Invitrogen (EU), selon les instructions du fabricant.

Ces deux kits utilisent le principe du dosage ELISA, les différentes étapes du protocole sont présentées sur les figures ci-dessous.



Procédure de dosage de l'IL-1 β

Procédure de dosage de l'IL-6

Résumé

Le Stress Oxydant (SO) est bien connu pour être impliqué dans la survenue et le développement des complications du diabète. Il est causé, au moins en partie, par une élévation importante de la glycémie. Chez les sujets diabétiques, la thérapie par l'insuline est vitale et constitue la pierre angulaire de la thérapie. Mais elle ne permet pas d'éviter à long terme l'apparition de complications, résultant du SO induit par les épisodes hyperglycémiques persistants.

Chez le sujet sain, des prises en charge nutritionnelles et/ou par l'activité physique ont démontré avec succès leur capacité à diminuer le SO. L'activité physique bien conduite présente de plus l'avantage d'exercer un effet glucorégulateur.

L'objectif de ces travaux de thèse était donc de déterminer si l'association de différentes prises en charge pouvait permettre de mieux lutter contre le SO, en agissant par des mécanismes complémentaires, démontrant alors des effets additifs. En s'appuyant sur différents protocoles de supplémentation, de traitement à l'insuline et/ou d'entraînement en endurance, nos travaux ont mis en évidence démontré l'intérêt d'un composé alimentaire dérivé du soja, le PFS, dans la prise en charge du SO associé au diabète. Nos travaux ont également mis en évidence que l'insuline et l'entraînement en endurance améliorait le SO induit par l'hyperglycémie, via des mécanismes partiellement différents. Leur association dans la prise en charge du diabète leur permet de potentialiser mutuellement leurs effets respectifs.

Mots-clés : stress oxydant, diabète de type 1, entraînement, insuline, complément alimentaire, soja, muscle, aorte.

Abstract

Physical activity and soybean products: interests in management of oxidant stress associated to type 1 diabetes.

Oxidant stress (OS) is well known to contribute to the onset and the development of diabetic complications. OS mainly result from marked rises in blood glucose level. Insulin treatment is required to keep patients alive, but fails to prevent long term complications progression, which result from hyperglycemic induced OS.

In healthy people, diet and/or physical activity succeed to significantly reduce OS. Physical activity exhibit moreover glucoregulatory properties.

Consequently, the aim of this thesis was to determine if combination of some therapeutic managements could better counteract OS, acting by complementary mechanisms, and so demonstrating additional effects. We used different protocols of supplementation, insulin therapy and endurance training to achieve these objectives. Our research demonstrated the value of soy derived compound, FSP, in management of diabetes-induced OS. We highlighted the ability of insulin therapy and endurance training to improve hyperglycemic-induced OS, by different mechanisms. Combination of both in therapeutic management of diabetes allow then to improve each other.

Key Words : oxidant stress, type 1 diabetes, training, insulin, dietary supplement, soy, muscle, aorta

