

# ***MEMOIRE DE MAGISTER***

*Présenté par : Labadi Khaled*

*Spécialité : Biologie*

*Option : biologie cellulaire « Biologie de la cellule normale et pathologique, cas du cancer »*

*Adresse email : Khaled\_labadi@hotmail.fr*

*Intitulé*

*Peroxydation des lipides, stress azoté et immunité humorale chez les diabétiques de type 1*

Ce présent travail vise à mettre en évidence les variations des concentrations en MDA, Les oligo-éléments, les immunoglobulines IgG, IgA et IgM et la détermination de la concentration du NO chez des sujets diabétiques de type 1, comparés à des témoins, sains.

## **Problématique**

Le diabète de type 1 est une maladie autoimmune qui résulte de la destruction progressive et sélective des cellules- $\beta$  pancréatiques. Les études réalisées par vagues successives ont montré que le processus autodestructif est médié principalement par les cellules T autoréactives ayant échappé à la délétion clonale.

A coté des cellules dendritiques et des macrophages, les cellules B seule source d'immunoglobuline, pourraient jouer un rôle secondaire dans la réponse inflammatoire et la présentation des antigènes d'îlots.

Par ailleurs, le NO pourrait avoir un rôle important à jouer dans le processus inflammatoire de cellules- $\beta$ , puisqu'il représente l'un des principaux médiateur de l'inflammation sécrété par les macrophages.

Dans cette optique, nous essayons de déterminer les niveaux circulants des immunoglobulines et du monoxyde d'azote les taux circulants des lipoprotéines, le niveau de la peroxydation des lipides chez les sujets diabétiques de type 1. Pour cela, une étude rétrospective cas-témoins est réalisée au sein du laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie de l'Université Abou-Bekr Belkaid de Tlemcen sous la direction du Docteur ARIBI Mourad, Maitre de conférences rang-A.

Objectifs : Mesurer les taux des immunoglobulines, du NO et évaluer les niveaux de la peroxydation des lipides chez les diabétiques de type 1 et chez les sujets sains, contrôles.

But : les effets de l'oxydation des lipides, des oxydes d'azotes (NOx) et des lipoprotéines dans la pathogenèse du DT1.

## Résumé

**Background :** Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie auto-immune qui résulte de la destruction des cellules pancréatiques productrices de l'insuline. Par ailleurs, le monoxyde d'azote (NO) est un important médiateur physiologique, notamment pour la vasodilatation des vaisseaux sanguins, mais aussi pour le système immunitaire où il joue un rôle de second messager. Aussi, les effets de l'oxydation des lipides, des oxydes d'azotes (NOx) et des lipoprotéines sur le système immunitaire correspondent notamment à une atteinte de l'intégrité de l'immunité humorale et cellulaire.

**Objectifs :** Évaluer les niveaux de la peroxydation des lipides et les taux circulants du NOx, des lipoprotéines et des immunoglobulines chez des diabétiques de type 1 et chez des sujets sains, contrôles.

**Matériels et méthodes :** La peroxydation des lipides a été évaluée par la mesure des taux du MDA à l'aide de l'acide thiobarbiturique (TBA). NOx sérique (nitrite et nitrate, NOx [NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>]) a été mesuré comme marqueur indirect de la formation *in vivo* du NO par la méthode de Griess. Les lipoprotéines ont été mesurées par électrophorèse sur gel ultrasensible (SEBIA, France). Les immunoglobulines ont été déterminées par la technique d'immunodiffusion radiale. Les fractions protéiques ont été mesurées par électrophorèse de zone sur acétate de cellulose (HELENA, USA). Le Zinc et le Cuivre ont été mesurés par polarimétrie. Dans cette étude, 30 diabétiques de type 1 et 30 contrôles, âgés de moins de 13 ans, ont été recrutés au Service de Pédiatrie de l'EHS Mère-Enfant de Tlemcen.

**Résultats :** Le niveau de la peroxydation des lipides et les concentrations circulantes du NOx ont été significativement élevées chez les diabétiques de type 1 comparés aux contrôles (respectivement,  $p = 0,001$ ,  $p = 0,01$ ). Il en est de même pour les immunoglobulines A, M et G (pour toutes les comparaisons,  $p < 0,01$ ). Les taux circulants des alpha lipoprotéines et de la Lp(a) ont été similaires dans les deux groupes ( $p > 0,05$ ) ; toutefois, ceux de la pré-bêta et des bêta lipoprotéines ont été augmentés significativement chez les patients par rapport aux contrôles (respectivement,  $p = 0,039$ ,  $p = 0,018$ ). Par ailleurs, les niveaux sériques en Zinc et Cuivre ont été nettement élevés chez les diabétiques de type 1 par rapport aux sujets sains (respectivement,  $p = 0,001$ ,  $p = 0,002$ ). Toutefois, les pourcentages des alpha-1, alpha-2, bêta et gamma globulines ont été strictement identiques dans les deux groupes étudiés ( $p > 0,05$ ) ; à l'inverse, le pourcentage de l'albumine a été nettement diminué chez les patients comparés aux contrôles ( $p < 0,01$ ). Aussi, le taux global des globulines sériques a été strictement similaire dans les deux groupes ( $p > 0,05$ ). Cependant, le rapport A:G a été significativement diminué chez les diabétiques de type 1 par rapport aux contrôles ( $p > 0,05$ ).

**Conclusion :** L'excès de la peroxydation des lipides et de la production du NOx pourrait jouer un rôle fort important dans la réaction immuno-inflammatoire au cours du processus auto-immun du DT1. L'altération de l'immunité à médiation humorale et les désordres en lipoprotéines et en oligoéléments pourraient avoir un rôle secondaire à jouer dans la pathogenèse du DT1.

## **Abstract**

**Background:** Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease resulting from the destruction of pancreatic cells producing insulin. In addition, nitric oxide (NO) is an important physiological mediator, including vasodilation of blood vessels, but also for the immune system, where it plays a second messenger. Also, the effects of lipid oxidation, nitrogen oxides (NOx) and lipoproteins on the immune system mainly represent a damage of the integrity of the humoral and cellular immunity.

**Objectives:** To evaluate the levels of lipid peroxidation and circulating levels of NOx, lipoproteins and immunoglobulins in patients with type 1 and in healthy subjects, controls.

**Materials and Methods:** Lipid peroxidation was evaluated by measuring the levels of MDA with thiobarbituric acid (TBA). Serum NOx (nitrite and nitrate, NOx [NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>]) was measured as an indirect marker of NO's formation in vivo by the Griess method. The Lipoproteins were measured by ultrasensitive gel electrophoresis (SEBIA, France). Immunoglobulins were determined by radial immunodiffusion technique. The protein fractions were measured by zone electrophoresis on cellulose acetate (HELENA, USA). Zinc and copper were measured by polarimetry. In this study, 30 type 1 diabetic patients and 30 controls, aged less than 13 years were recruited in the Department of Pediatrics of the EHS Mother-Child of Tlemcen.

**Results:** The level of lipid peroxidation and circulating concentrations of NOx were significantly higher in type 1 diabetic patients compared to controls (respectively,  $p = 0.001$ ,  $p = 0.01$ ). The same results for immunoglobulins A, M and G (for all comparisons,  $p < 0.01$ ). Circulating levels of alpha lipoprotein and Lp (a) were similar in both groups ( $p > 0.05$ ), but those of the pre-beta and beta lipoproteins were significantly increased in patients compared to controls (respectively,  $p = 0.039$ ,  $p = 0.018$ ). In addition, serum levels of zinc and copper were significantly elevated in type 1 diabetic patients compared to healthy subjects (respectively,  $p = 0.001$ ,  $p = 0.002$ ). However, the percentages of alpha-1, alpha-2, beta and gamma globulins were strictly identical in the two study groups ( $p > 0.05$ ), in contrast, the percentage of albumin was significantly decreased in patients compared to controls ( $p < 0.01$ ). Also, the overall rate of serum globulins was strictly similar in both groups ( $p > 0.05$ ). However, the ratio A: G was significantly decreased in type 1 diabetic patients compared to controls ( $p > 0.05$ ).

**Conclusion:** The excess of lipid peroxidation and the production of NOx could play an important role in the immuno-inflammatory response in the autoimmune process of T1D. Alteration of humoral immunity and lipoprotein disorders and trace elements may have a secondary role to play in the pathogenesis of T1D.

**Keywords:** Type 1 diabetes, immunoglobulins, lipoproteins, NOx.

## المخلص

داء السكري النوع 1 هو أحد أمراض المناعة الذاتية الناجمة عن تدمير خلايا البنكرياس المنتجة للأنسولين. إلا أن أكسيد النيتريك (NO) الوسيط الفسيولوجي المهم ، الذي يلعب دورا هاما في توسع الأوعية الدموية، بالإضافة إلى دوره الأساسي في عمل جهاز المناعة، كرسول ثاني. لكن أكسدة الدهون، أكاسيد النيتروجين (NOx) والبروتينات الدهنية على جهاز المناعة تؤثر على سلامة وعمل الحصانة الخلوية والخلوية.

**الهدف:** تقييم وتحديد مستويات بيروكسيد الدهون وكذلك مستويات البروتينات الدهنية، وأكاسيد النيتروجين و الجلوبيولينات المناعية في المرضى الذين يعانون من داء السكري نوع 1 وأشخاص بصحة جيدة.

لـ: تم تقييم مستويات بيروكسيد الدهون من خلال قياس مستويات MDA بواسطة حمض ثيوباريتريك (TBA). أكاسيد النيتروجين المتواجدة في المصل (النيترات والنيتريت، وأكاسيد النيتروجين  $[NO_2^-, NO_3^-]$ ) تمت قياستها كعلامة غير مباشرة في تشكيل منوكسيد الازوت (NO) داخل الجسم من خلال طريقة غريس (Griess). تم قياس البروتينات الدهنية بواسطة تقنية الفصل الكهربائي للهلام فائقة الحساسية (SEBIA، فرنسا). تم تحديد الجلوبيولينات المناعية بواسطة تقنية الانتشار المناعي الشعاعي. تم قياس نسب البروتين بواسطة تقنية الفصل الكهربائي على اسيتات السليلوز (USA، HELENA). تم قياس الزنك والنحاس بواسطة تقنية الاستقطاب. في هذه الدراسة، تم تعيين 30 مريضا بالسكري نوع 1 و30 شاهد الذين تقل أعمارهم عن 13 عاما في قسم طب الأطفال بالمستشفى الجامعي لتلمسان.

**النتائج:** مستويات بيروكسيد الدهون وتركيزات أكاسيد النيتروجين مرتفعة بشكل ملحوظ في المرضى الذين يعانون السكري نوع 1 بالمقارنة مع الشواهد (على التوالي  $P = 0.001$ ،  $P = 0.01$ ) نفس الشئ بالنسبة للجلوبيولينات المناعية A، M و G (في جميع المقارنات،  $P > 0.01$ ). كمية البروتين الدهني ألفا و البروتين الدهني (a) كانت متساوية في المجموعتين ( $P < 0.05$ )، في المقابل هناك ارتفاع نسبة البروتينات الدهنية (pré- $\beta$ ) و ( $\beta$ ) في المرضى مقارنة بالشواهد (على التوالي،  $P = 0.039$ ،  $P = 0.018$ ). بالإضافة إلى ذلك، هناك ارتفاع في مستويات الزنك والنحاس المتواجدة في المصل لدى المرضى الذين يعانون السكري نوع 1 بالمقارنة مع الأشخاص الأصحاء (على التوالي،  $P = 0.001$ ،  $P = 0.002$ ). أما النسب المئوية للألفا-1، ألفا-2 وبيتا و غاما الجلوبيولين كانت متطابقة تماما في مجموعتين اللتين أجريت عليهما الدراسة ( $P < 0.05$ )، في المقابل، انخفضت بشكل ملحوظ نسبة الألبومين في المرضى مقارنة بالمجموعة الشاهدة ( $P > 0.01$ ). أيضا، كان t المعدل العام للجلوبيولين المصلي متساوي في كل من المجموعتين ( $P < 0.05$ ). وبالتالي فإن النسبة الألبومين على الجلوبيولين A:G منخفضة بشكل ملحوظ لدى مرضى السكري 1 بالمقارنة مع الشواهد ( $P < 0.05$ ).

**الخلاصة:** ارتفاع نسبة البيروكسيدات الدهنية و أكاسيد النيتروجين يؤثر بشكل كبير في الاستجابة المناعية للالتهابات لدى الأشخاص المصابين بـ T1D. لها دور ثانوي في التسبب في T1D .

**كلمات مفتاحية:** السكري نوع 1، الجلوبيولينات المناعية ، البروتينات الدهنية، وأكسيد النيتروجين.