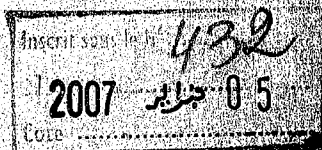


Republique Algerienne Democratique et Populaire

Ministere de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

49/4  
Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen  
Faculté des Sciences  
Département de Biologie

THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT  
EN  
BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE



Présentée par

Mme SOULIMANE-MOKHTARI NASSIMA AMEL

RÔLE DES ACIDES GRAS POLYINSATURES ALIMENTAIRES DANS LE  
METABOLISME DES LIPOPROTEINES CHEZ LA RATE GESTANTE  
DIABETIQUE ET SA PROGENITURE

Soutenu le . devant la commission d'examen

Pr. KHELIL M. A.	Professeur	Président	Université de Tlemcen
Pr. MERZOUK H.	Professeur	Directeur de thèse	Université de Tlemcen
Pr. CHABANE SARID.	Professeur	Examineur	Université de Tlemcen
Pr. KEBIR F. Z.	Professeur	Examineur	Université d'Oran
Pr. NARCE M.	Professeur	Examineur	Université de Bourgogne (Dijon)
Dr. BABA HAMED B.	Maitre de conférence	Examineur	Université d'Oran

## REMERCIEMENTS

Mes vifs remerciements s'adressent à Mme MERZOUK H., professeur à l'université de Tlemcen, qui m'a permis de réaliser cette étude. Je lui témoigne ma profonde reconnaissance, pour ses précieux conseils, ses orientations bienveillantes, son infatigable dévouement, ses encouragements et son soutien moral.

Je remercie Mr. KHELLIL M. A., professeur à l'Université de Tlemcen, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Je le remercie également pour son aide et sa compréhension. Qu'il soit assuré de ma sincère reconnaissance.

Je remercie Mr. CHABANE SARI D., professeur à l'université de Tlemcen, de l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail en acceptant de l'examiner. Je tiens à le remercier également pour ses précieux conseils, et son aide pour la partie *in vivo*.

J'exprime ma reconnaissance à M<sup>me</sup> EL KEBIR F. Z., professeur à l'université Es-sénia d'Oran, d'avoir accepté de juger ce travail. Qu'elle soit assurée de mon profond respect et de mes sincères remerciements.

Je remercie Mr. NARCE M., professeur à l'Université de Bourgogne, Dijon, pour l'attention qu'il a bien voulu porter à ce travail en acceptant de le juger, et de faire partie du jury. Je lui exprime ma reconnaissance pour ses précieux conseils et orientations bienveillantes.

Je remercie Mr. BABAHAMED B., Maître de conférence à l'Université d'Oran, pour l'attention qu'il a bien voulu porter à ce travail en acceptant de le juger et de faire partie du jury. Qu'il soit assuré de ma sincère reconnaissance.

Je remercie Mr. KHAN N. A., professeur à l' Université de Bourgogne, pour avoir mis à ma disposition les moyens matériels et scientifiques, indispensables à la réalisation de ce travail. Je lui exprime ma profonde reconnaissance pour son importante aide.

Je remercie Mr HICHAMI A., Maître de conférence à l'Université de Bourgogne, pour avoir également mis à ma disposition les moyens matériels et scientifiques. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour m' avoir appris les techniques essentielles à la réalisation de ce travail, sa disponibilité, son aide et sa patience.

Je tiens à remercier tout particulièrement Mme MADANI S., Docteur en biologie à l'Université de Bourgogne, pour l'aide qu'elle m'a apporté au niveau de la partie expérimentale, sa disponibilité, sa patience et ses encouragements moraux. Qu'elle trouve ici, ma profonde reconnaissance et toute ma gratitude.

Je remercie tout le personnel de l'unité de recherche de nutrition cellulaire et métabolique à l'université de Bourgogne, et particulièrement Pr. Josiane PROST, Mr. Joseph GRETI, pour leur disponibilité et aide technique.

Je remercie également Mlle Virginie AIRES, Mlle Aurélie GIRARD, Mlle Anne DENYS, Doctorantes à l'Université de Bourgogne, pour leur précieuse aide et leur soutien moral.

Je remercie également toute l'équipe du laboratoire de nutrition, de biochimie et de physiologie, de l'Université de Tlemcen, pour leur aide et leur disponibilité.

Enfin, je remercie tout ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## PUBLICATIONS

Ce travail a fait l'objet de 3 publications internationales :

**Publication internationale dans obesity research (Novembre 2004) :** N-3 fatty acids modulate T-cell calcium signaling in obese macrosomic rats.

B. GUERMOUCHE, A. YESSOUFOU, N. A. SOULIMANE, K. MONTAIROU, A. HICHAMI, H. MERZOUK AND N. A. KHAN.

**Publication internationale dans clinical science (Mai 2005) :** Modulation of lipid metabolism by n-3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetic rats and their macrosomic offspring

N. A. SOULIMANE, B. GUERMOUCHE, A. YESSOUFOU, M. SAKER, K. MONTAIROU, A. HICHAMI, H. MERZOUK AND N. A. KHAN.

**Publication internationale dans International journal of obesity (Janvier 2006) :** N-3 fatty acids modulate antioxidant status in diabetic rats and their macrosomic offspring.

A. YESSOUFOU, N. SOULIMANE, S. A. MERZOUK, K. MONTAIROU, H. AHISSOU, J. PROST, A. M. SIMONIN, H. MERZOUK, A. HICHAMI AND N. A. KHAN.

et 1 autre est en cours:

**Article soumis à « Journal of lipid research »**

N-3 polyunsaturated fatty acids improved antioxidant status but not LDL susceptibility to oxidation in macrosomic offspring of diabetic rats

N. A. SOULIMANE, S. A. MERZOUK, M. SAKER, A. HICHAMI, H. MERZOUK, N. A. KHAN AND M. NARCE

## COMMUNICATIONS

Il a également fait l'objet de communications :

**Premières Journées d'étude sur les lipides et lipoprotéines, le 12/06/2002, Faculté de Médecine, Constantine, Algérie.**

Importance des AGPI alimentaire au cours des perturbations du métabolisme des lipides et lipoprotéines chez la rate gestante diabétique et ses nouveau-nés.

SOULIMANE N., GUERMOUCHE BC., MERZOUK H., KHAN N

Rôle des acides gras polyinsaturés alimentaire dans le métabolisme des lipides et dans la modulation du système immunitaire chez la rate gestante diabétique et ses nouveau-nés.

GUERMOUCHE BC., SOULIMANE N., MERZOUK H., KHAN N

**Deuxième Forum sur la recherche en santé, le 18/06/2002, Faculté de Médecine, Tlemcen, Algérie.**

Rôle des acides gras polyinsaturés alimentaires dans le métabolisme des lipoprotéines chez la rate gestante diabétique et ses nouveau-nés.

SOULIMANE N., GUERMOUCHE BC., MERZOUK H., KHAN N

Importance des acides gras polyinsaturés dans la modulation du système immunitaire au cours du diabète : Implication de la signalisation lymphocytaire.

GUERMOUCHE BC., SOULIMANE N., MERZOUK H., KHAN N.

**Premières journées sur la protection de l'environnement, le 28 et 29 /05/2003. Faculté des Sciences, Département de Biologie, Tlemcen, Algérie.**

Effet d'un régime enrichi en acides gras poly insaturés sur les perturbations du métabolisme des lipoprotéines chez les rats macrosomiques.

SOULIMANE N., GUERMOUCHE BC., SAKER M., MERZOUK H., HICHAMI A., KHAN N.

Effet d'un régime enrichi en acides gras poly insaturés sur la signalisation du calcium intracellulaire lymphocytaire au cours du diabète gestationnel.

GUERMOUCHE BC., SOULIMANE N., SAKER M., MERZOUK H., HICHAMI A., KHAN N.

**Colloque ADELFI-EPIDIO « Epidémiologie et prise de décision en santé publique », le 29 et 30/05/2004. Université d'Oran.**

Rôle des acides gras polyinsaturés alimentaires (n-3) dans le métabolisme des lipoprotéines chez la rate gestante diabétique.

MOKHTARI- SOULIMANE N., GUERMOUCHE B., SAKER M., MADANI S., HICHAMI A., MERZOUK H., KHAN N.

**Journée médicale pluridisciplinaire de l'Association de formation médicale continue de la wilaya de Tlemcen « al Razi », le 10/06/2004.**

Réévaluation des facteurs de risque des dyslipidémies et de l'athérosclérose.

MOKHTARI- SOULIMANE N., GUERMOUCHE B., MERZOUK H.

**Troisième Forum sur la recherche en santé, le 20/06/2004, Faculté de médecine, Université de Tlemcen.**

Rôle des acides gras polyinsaturés (AGPI) alimentaires dans le métabolisme des Lipoprotéines chez la rate gestante diabétique et chez ses nouveau-nés. Essai de diminution du risque d'athérosclérose.

MOKHTARI- SOULIMANE N., GUERMOUCHE B., SAKER M., MADANI S., HICHAMI A., MERZOUK H., KHAN N.

**71ème Congrès de la Société de Physiologie. 15-17 septembre 2004, Paris. France.**

N-3 fatty acids modulate T-cell calcium signalling in obese macrosomic rats.

HICHAMI A., GUERMOUCHE B., SOULIMANE N., YESSOUFOU A., MERZOUK H., MOUTAIROU K., KHAN NA. (2004).

**Forum des jeunes chercheurs, 10/2004, université de Bourgogne, Dijon. France.**

n-3 fatty acids modulate antioxidant status in diabetic rats and their macrosomic offspring

YESSOUFOU A., SOULIMANE N., MERZOUK S. A., MOUTAIROU K., AHISSOU H.,

PROST J., SIMONIN A. M., HICHAMI A. ET KHAN N. A.

**1<sup>ère</sup> Journées scientifiques de l'UGEL, le 17 et 18/05/2005, département de Biologie,  
université de Tlemcen.**

Détermination des activités enzymatiques intervenant dans le métabolisme des lipides chez  
des rates diabétiques

MOKHTARI- SOULIMANE N., GUERMOUCHE B., SAKER M., MADANI S.,  
HICHAMI A., MERZOUK H., KHAN N.

**IV<sup>èmes</sup> journées scientifiques de l'ANDRS, le 06, 07 et 08/ 09/2005, université de  
Tlemcen.**

Diabète, dyslipidémie et acides gras polyinsaturés.

MOKHTARI- SOULIMANE N., GUERMOUCHE B., SAKER M., LOUKIDI B.,  
MADANI S., HICHAMI A., MERZOUK H., KHAN N. A.

**2<sup>ème</sup> Journées scientifiques de l'UGEL, le 18 et 19/04/2006, département de Biologie,  
université de Tlemcen.**

Détermination du statut antioxydant chez les rats macrosomiques recevant un régime enrichi  
en AGPI n-3.

MOKHTARI- SOULIMANE N., GUERMOUCHE B., SAKER M., MADANI S.,  
HICHAMI A., MERZOUK H., KHAN N.

**Premières Rencontres Pédiatriques de Tlemcen, le 25/05/2006.**

Statut antioxydant chez le nouveau-né et chez sa mère

SOULIMANE N., SAKER M., MERZOUK H.,

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
Diabète, obésité et dyslipidémies.....	8
Diabète, obésité et statut oxydant/antioxydant.....	13
Diabète, Obésité et acides gras polyinsaturés n-3.....	23
But du travail.....	28
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>29</b>
I. Protocole expérimental.....	29
II. Bilan nutritionnel.....	32
II.1. Détermination du contenu en azote.....	32
II.2. Détermination des teneurs en urée.....	32
II.3. Détermination des teneurs en créatinine.....	32
II.4. Détermination des teneurs en lipides.....	33
III. Prélèvements sanguins.....	33
IV. Prélèvements d'organes.....	34
V. Analyses biochimiques.....	34
V.1. Dosage de l'insuline.....	34
V.2. Détermination des paramètres lipidiques et protéiques au niveau du sérum, des lipoprotéines et des organes.....	35
V.2.1. Séparation des lipoprotéines.....	35
V.2.2. Détermination des teneurs en cholestérol, triglycérides et phospholipides.....	35
V.2.3. Détermination des teneurs en protéines totales et en apoprotéines.....	36
V.2.4. Extraction des lipides du sérum et du foie.....	36
V.3. Analyse de la composition en acides gras du sérum et du foie.....	36
VI. Dosage des activités enzymatiques.....	37
VI.1. Détermination de l'activité de la lécithine cholestérol acyltransférase.....	37
VI.2. Détermination de l'activité des lipoprotéines lipases tissulaires.....	38
VI.3. Détermination de l'activité de l'hydroxy méthyl glutaryl- coenzyme A (HMG-CoA) réductase.....	39
VI.4. Détermination de l'activité de la 7 $\alpha$ hydroxylase.....	40
VI.5. Détermination de l'activité de l'Acyl-Coenzyme A : Cholestérol Acyltransférase (ACAT).....	41
VII. Détermination du statut oxydant/antioxydant.....	42
VII.1. Dosage des vitamines.....	42
VII.1.1. Dosage des vitamines A et E.....	42
VII.1.2. Dosage de la vitamine C.....	43
VII.2. Détermination du pouvoir antioxydant total du plasma (ORAC).....	43
VII.3. Détermination du taux d'hydroperoxydes.....	44
VII.4. Détermination des protéines carbonylées.....	45
VII.5. Détermination de l'activité des enzymes antioxydantes des érythrocytes.....	46
VII.5.1. Dosage de l'activité de la catalase.....	46
VII.5.2. Dosage de l'activité de la Glutathion peroxydase.....	46
VII.5.3. Dosage de l'activité de la Glutathion réductase.....	47
VII.5.4. Dosage de l'activité de la Superoxyde dismutase.....	48
VIII. Analyse statistique.....	49



## RESULTATS ET INTERPRETATIONS.....50

### Bilans nutritionnels

I. Poids corporel et bilans nutritionnels.....	50
I. 1. Evolution du Poids corporel.....	50
I. 2. Bilans nutritionnels .....	50
I. 2. 1. Consommation alimentaire, apport énergétique et rapport d'efficacité nutritionnelle.....	50
I. 2. 2. Azote ingéré et excrété.....	53
I.2.3 Coefficient d'utilisation digestive apparente de l'azote (CUD) <sub>N</sub> , bilan azoté (BA).....	53
I.2.4 Lipides ingérés et excrétés et coefficient d'utilisation digestive apparente de lipides.....	56
I.2.5 teneurs en urée et en créatinine.....	56
II Evolution de la glycémie et de l'insulinémie .....	56

### Métabolisme des lipides et lipoprotéines

I. Poids relatif des organes.....	61
I.1. Chez les rates (mères).....	61
I.2. Chez la progéniture.....	61
II. Teneurs en lipides totaux des organes .....	63
II.1. Chez les rates (mères).....	63
II.2. Chez la progéniture.....	63
III. Teneurs en protéines des organes.....	65
III.1. Chez les rates (mères).....	65
III.2. Chez la progéniture.....	65
IV. Evolution des activités des lipoprotéines lipases (LPL) tissulaires .....	65
IV.1. Chez les mères .....	65
IV.1.1. Activité de la lipase hépatique (HTGL) .....	65
IV.1.2. Activité de la lipoprotéine lipase (LPL) adipocytaire .....	65
IV.1. 3. Activité de la lipoprotéine lipase (LPL) musculaire .....	68
IV.2. Chez la progéniture .....	68
IV.2.1. Activité de la lipase hépatique (HTGL) .....	68
IV.2.2. Activité de la LPL adipocytaire .....	68
IV.2. 3. Activité de la LPL musculaire .....	68
V. Teneurs en lipides des organes, du sérum et des lipoprotéines.....	70
V.1. Chez les mères .....	70
V.1.1 Lipides des organes .....	70
V.1.2 Lipides du sérum et des lipoprotéines.....	70
V.2. Chez la progéniture .....	76
V.2.1 Lipides des organes .....	76
V.2.2 Lipides du sérum et des lipoprotéines.....	76
VI. Teneurs en apoprotéines des différentes lipoprotéines.....	78
VI.1. Chez les mères .....	78
VI.2. Chez la progéniture.....	83
VII. Activités enzymatiques intervenant dans le métabolisme des lipides et lipoprotéines.....	83
VII.1. Activité de la LCAT .....	83
VII.1.1 Chez les mères.....	83
VII.1.2 Chez la progéniture.....	83

VII.2. Activité des enzymes hépatiques.....	86
VII.2.1 Chez les mères .....	86
VII.2.2 Chez la progéniture.....	86
VIII. Evolution de la composition en acides gras des lipides sériques et hépatiques .....	86
VIII.1. Chez les mères.....	86
VIII.2. Chez la progéniture.....	91
<b>Statut antioxydant</b>	
I. Teneurs en vitamines A, C et E.....	95
II. pouvoir antioxydant total (ORAC), teneurs plasmatiques en hydroperoxydes et en protéines carbonylées.....	95
III. Activités des enzymes érythrocytaires antioxydantes.....	100
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>103</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>133</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>137</b>

## ABREVIATIONS

AA : acide arachidonique

ACAT : Acyl-Coenzyme A : Cholestérol Acyltransférase

AGE : acides gras essentiels

AGPI : acides gras polyinsaturés

AGS : acides gras saturés

ALA : acide  $\alpha$ -linoléique

B: bilan

BA : bilan azoté

BSA: bovine serum albumin

CCM: chromatographie sur couche mince

CL : Cholestérol libre

CPG: chromatographie en phase gazeuse

CT : Cholestérol total

CUD<sub>L</sub> : Coefficient d'utilisation apparente des lipides

CUD<sub>N</sub> : Coefficient d'utilisation digestive apparente de l'azote

DAG : diacylglycérol

DHA : acide docosahexaénoïque

DID : diabète insulino dépendant

DNID : diabète non insulino dépendant

EDTA : acide éthylènediamine-tétraacétique

EPA : acide eicosapentaénoïque

HDL : High density lipoprotein

HMGCOA : Hydroxy méthyl glutaryl-coenzyme A réductase

HTGL : triglycéride lipase hépatique

LCAT : lécithine cholesterol acyl transférase

LDL : Low density lipoprotein

LPL : Lipoproteine lipase

OPD: orthophénylène-diamine

PBS: Physiological buffer serum

PL : phospholipides

REN : Rapport d'efficacité nutritionnelle

STZ: streptozotocine

TG : Triglycérides

VLDL : lipoprotéine de très petite densité

## NOMENCLATURE DES ACIDES GRAS

NOM USUEL	NOM SYSTEMATIQUE	ABREVIATION
Laurique	Dodécanoïque	C12 :0
Myristique	Tétradécanoïque	C14 :0
Palmitique	Hexadécanoïque	C16 :0
Stéarique	Octadécanoïque	C18 :0
Palmitoléique	Hexadéca-7-énoïque	C16 :1n-7
Oléique	Octadéca-9- énoïque	C18 :1n-9
Linoléique	Octadéca-9, 12-diénoïque	C18 :2n-6
$\alpha$ - Linoléique	Octadéca-9, 12,15-triénoïque	C18 :3n-3
$\gamma$ -Linoléinique	Octadéca-9, 12,15-triénoïque	C18 :3n-6
Dihomo- $\gamma$ - Linoléinique	Eicosa-8, 11,14- triénoïque	C20 :3n-6
Arachidonique	Eicosa-8, 11,14,17- tetraénoïque	C20 :4n-6
Timnodonique	Eicosa-5,8,11,14,17-pentaénoïque	C20 :5n-3
Docosapentaénoïque	Docosa-4,7,10,13,16-pentaénoïque	C22 :5n-6
Culpanodonique	Docosa-7,10,13,16,19-pentaénoïque	C22 :5n-3
Cervonique	Docosa-4,7,10,13,16,19-hexaénoïque	C22 :6n-3

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau I :** Composition des régimes Isio et Epax en pourcentages pondéraux et énergétiques.....p29

**Tableau II :** Composition en acides gras des lipides sériques des rates diabétiques recevant le régime Isio ou Epax comparées à leurs témoins, à j12 et j21 de la gestation.....p89

**Tableau III :** Composition en acides gras des lipides hépatiques des rates diabétiques recevant le régime Isio ou Epax comparées à leurs témoins, à j12 et j21 de la gestation.....p90

**Tableau IV :** Composition en acides gras des lipides sériques des ratons macrosomiques recevant le régime Isio ou Epax comparées à leurs témoins, à la naissance (j0), à j60 et à l'âge adulte ( j90). .....p93

**Tableau V :** Composition en acides gras des lipides hépatiques des ratons macrosomiques recevant le régime Isio ou Epax comparées à leurs témoins, à la naissance (j0), à j60 et à l'âge adulte ( j90). .....p94

## LISTE DES FIGURES

<b>FIG 1</b> : Contribution des LDL oxydées à l'athérogenèse.....	P12
<b>FIG 2</b> : Antioxydants intracellulaires.....	P16
<b>FIG 3</b> : Sources cellulaires de radicaux libres.....	P18
<b>FIG 4</b> : Biosynthèse des acides gras polyinsaturés.....	P24
<b>FIG 5</b> : Evolution du poids corporel (g) chez les rats témoins et macrosomiques de la naissance à l'âge adulte (3 mois) .....	P51
<b>FIG 6</b> : Effet du régime EPAX sur l'apport énergétique, la nourriture ingérée et le rapport d'efficacité nutritionnelle (REN) au cours des bilans nutritionnels .....	P52
<b>FIG 7</b> : Effet du régime EPAX sur l'azote ingéré, urinaire, fécal, et excrété .....	P54
<b>FIG 8</b> : Effet du régime EPAX sur le coefficient d'utilisation digestive apparente .....	P55
<b>FIG 9</b> : Effet du régime EPAX sur les lipides ingérés, lipides fécaux et le coefficient d'utilisation digestive apparente des lipides (CUDL).....	P58
<b>FIG 10</b> : teneurs urinaires en urée et créatinine chez les rats obèses ou non recevant le régime Isio ou Epax .....	P59
<b>FIG 11</b> : Evolution de la glycémie et de l'insulinémie au cours du temps chez les rats obèses ou non recevant le régime Isio ou Epax .....	P60
<b>FIG 12</b> : Poids relatif du foie et du tissu adipeux chez les mères diabétiques ou non et chez les rats macrosomiques ou non recevant le régime Isio ou Epax.....	P62
<b>FIG 13</b> : Teneurs en lipides totaux (LT) du foie et du tissu adipeux chez les mères diabétiques ou non et chez les rats macrosomiques ou non recevant le régime Isio ou Epax.....	P64
<b>FIG 14</b> : Teneurs en protéines du foie et du muscle chez les mères diabétiques ou non et chez les rats macrosomiques ou non recevant le régime Isio ou Epax.....	P66
<b>FIG 15</b> : Activité de la triglycéride lipase hépatique (HTGL) et des lipoprotéines lipases (LPL) du muscle et du tissu adipeux chez les mères diabétiques recevant le régime Isio ou Epax .....	P67
<b>FIG 16</b> : Activité de la triglycéride lipase hépatique (HTGL) et des lipoprotéines lipases (LPL) du muscle et du tissu adipeux chez les rats macrosomiques recevant le régime Isio ou Epax.....	P69
<b>FIG 17</b> : Teneurs en lipides du foie chez les mères diabétiques ou non recevant le régime Isio ou Epax.....	P71

<b>FIG 18</b> : Teneurs en cholestérol du sérum et des lipoprotéines chez les rates diabétiques ou non recevant le régime Isio ou Epax.....	P73
<b>FIG 19</b> : Teneurs en triglycérides du sérum et des lipoprotéines chez les rates diabétiques ou non recevant le régime Isio ou Epax.....	P74
<b>FIG 20</b> : Teneurs en phospholipides du sérum et des lipoprotéines chez les rates diabétiques ou non recevant le régime Isio ou Epax .....	P75
<b>FIG 21</b> : Teneurs en lipides du foie chez les rats macrosomiques ou non recevant le régime Isio ou Epax.....	P77
<b>FIG 22</b> : Teneurs en cholestérol du sérum et des lipoprotéines chez les rats macrosomiques ou non recevant le régime Isio ou Epax.....	P79
<b>FIG 23</b> : Teneurs en triglycérides du sérum et des lipoprotéines chez les rats macrosomiques ou non recevant le régime Isio ou Epax.....	P80
<b>FIG 24</b> : Teneurs en phospholipides du sérum et des lipoprotéines chez les rats macrosomiques ou non recevant le régime Isio ou Epax.....	P81
<b>FIG 25</b> : Teneurs en apoprotéines (apo) des lipoprotéines sériques chez les rates diabétiques ou non recevant le régime Isio ou Epax.....	P82
<b>FIG 26</b> : Teneurs en apoprotéines (apo) des lipoprotéines sériques chez les rats macrosomiques ou non recevant le régime Isio ou Epax.....	P84
<b>FIG 27</b> : Activité de la Lécithine Cholestérol Acyl Transférase (LCAT) chez les mères diabétiques et chez les rats macrosomiques recevant le régime Isio ou Epax.....	P85
<b>FIG 28</b> : Activités des enzymes hépatiques chez les mères diabétiques ou témoins recevant le régime Isio ou Epax.....	P87
<b>FIG 29</b> : Activités des enzymes hépatiques chez les rats macrosomiques ou témoins recevant le régime Isio ou Epax.....	P88
<b>FIG 30</b> : Teneurs sériques en vitamines A, C et E chez les mères diabétiques et témoins recevant le régime Isio ou Epax.....	P96
<b>FIG 31</b> : Teneurs sériques en vitamines A, C et E chez les rats macrosomiques et témoins recevant le régime Isio ou Epax.....	P97
<b>FIG 32</b> : Pouvoir antioxydant total (ORAC), teneurs plasmatiques en hydroperoxydes et en protéines carbonylées, chez les mères diabétiques et témoins recevant le régime Isio ou Epax .....	P98
<b>FIG 33</b> : Pouvoir antioxydant total (ORAC), teneurs plasmatiques en hydroperoxydes et en protéines carbonylées, chez les rats macrosomiques et témoins recevant le régime Isio ou Epax .....	P99



**FIG 34:** Activités des enzymes érythrocytaires antioxydantes chez les mères  
diabétiques et témoins recevant le régime Isio ou Epax.....P101

**FIG 35:** Activités des enzymes érythrocytaires antioxydantes chez les rats  
macrosomiques et témoins recevant le régime Isio ou Epax.....P102

# AVANT PROPOS

Notre travail s'inscrit d'une part dans le cadre d'un accord programme Franco-Algérien (projet CMEP code 01 MDU 531) intitulé «Rôle des AGPI alimentaire dans le métabolisme des lipoprotéines et la modulation de la fonction immunitaire : Etude du modèle clinique et expérimental du diabète sucré» et d'autre part dans un projet ANDRS Code : 02/15/02/00 001 intitulé «Influence de l'apport alimentaire en acides gras poly insaturés sur le métabolisme des lipoprotéines et sur la fonction immunitaire. Etude du modèle clinique et expérimental du diabète sucré»

Une partie de l'expérimentation s'est déroulée au laboratoire d'UPRES lipides et nutrition de l'université de Bourgogne (Dijon) qui s'intéresse depuis quelques années à la macrosomie fœtale, le métabolisme des lipides, la signalisation cellulaire, la biosynthèse et les bienfaits des acides gras polyinsaturés de la famille n-3.

Et l'autre partie du travail s'est déroulée au laboratoire de physiologie et biochimie de l'université de Tlemcen.

# INTRODUCTION

Au cours de ces dernières décennies, parallèlement à de profondes modifications de notre environnement et de notre mode de vie, on a assisté à des changements notables de l'état nutritionnel des populations, avec une proportion croissante de femmes débutant leur grossesse en état de surcharge pondérale. De plus, l'âge moyen des femmes lors de leur première grossesse tend à augmenter et avec lui la probabilité de présenter surpoids et troubles métaboliques (DAMM et al., 1991 ; LONG et al., 1995)

Les facteurs nutritionnels et métaboliques maternels qui affectent la croissance foetale et le poids de naissance présentent un intérêt particulier non seulement pour la prévention du risque obstétrical mais également pour leurs effets à long terme notamment leur implication potentielle dans l'état de santé durant l'enfance, l'adolescence et même durant l'âge adulte. En effet, bien que permettant la naissance d'un enfant viable et en bonne santé apparente, certains de ces facteurs pourraient affecter le développement de certains organes ou orienter le métabolisme de façon à entraîner une plus grande susceptibilité au développement de l'obésité et de certaines maladies chroniques plus tard au cours de la vie, et tout particulièrement du diabète de type 2 (LITHELL et al., 1996; CURHAN et al., 1996 ; BARKER, 1998).

Le diabète sucré est défini comme une maladie caractérisée par une hyperglycémie pathologique. A long terme, ce sont les complications qui font la gravité de la maladie. En pratique, on distingue le diabète insulino-dépendant (de type 1) marqué par une carence absolue en insuline, et le diabète non insulino-dépendant (de type 2) où la pathogénie est plus complexe. Le diabète de type 2 est un syndrome bipolaire associant une résistance à l'insuline, liée en particulier à l'obésité, et une incapacité du pancréas à y faire face (VAAG, 1999 ; DE FRONZO, 1999). Son apparition est déterminée par des facteurs génétiques, et des facteurs environnementaux surtout nutritionnels. Ce qui pourrait signifier qu'on pourrait

éviter, dans certains cas, l'apparition du diabète en empêchant l'apparition de l'obésité (HU et al., 1999).

Le défaut de l'insulinosécrétion, c'est-à-dire le caractère limité de son potentiel à répondre à une augmentation des besoins en insuline causée par l'insulinorésistance, pourrait être génétiquement déterminé ou être secondaire à une malnutrition pendant la période fœtale (CHUKWUMA et TUOMILEHTO, 1998). Ce défaut s'aggrave avec le temps. Cette aggravation peut soit être programmée dans le cadre d'un phénomène d'apoptose des cellules bêta des îlots de Langerhans expliquant la réduction de la masse des cellules bêta dans le diabète de type 2 (DE FRONZO, 1999), soit être la conséquence de l'effet toxique de l'hyperglycémie (concept de glucotoxicité) (ROBERTSON et al., 2000) ou des acides gras libres circulants qui sont élevés dans l'obésité (concept de lipotoxicité) (MCGARRY et DOBBINS, 1999).

Les complications du diabète sont étroitement reliées à l'hyperglycémie et sont fonction surtout de la durée du diabète. Le diabète de type 1 et de type 2 peuvent tous deux provoquer des complications à long terme impliquant des changements microvasculaires (rétinopathie, néphropathie et neuropathie) et des troubles du métabolisme glucidique et lipidique menant à des complications graves comme l'athérosclérose.

L'association diabète et grossesse peut entraîner une exagération de ces troubles, autant chez la mère que chez la progéniture. Des conséquences à long terme sont déjà bien connues pour les enfants nés de mères diabétiques. En effet, les conséquences du diabète maternel ne se limitent pas au risque de malformations congénitales et de macrosomie fœtale. Il a été également démontré qu'indépendamment de leur poids de naissance, les enfants ou jeunes adultes nés de mères diabétiques présentent, quelque soit le type de diabète maternel, une plus grande fréquence de surpoids, d'insulinorésistance (PETTITT et KNOWLER, 1998 ; SILVERMAN et al., 1998) et d'intolérance au glucose (SOBNGWI et al., 2003) que les

enfants nés de mères non diabétiques. Il a été également observé que ces conséquences sur la santé sont particulièrement nettes chez les individus qui ont présenté une croissance post natale rapide (ERIKSSON et al., 1999).

Cet effet ne peut s'expliquer entièrement par la transmission de gènes prédisposant au diabète mais traduit un effet persistant de modification de la croissance et des métabolismes fœtaux induites par l'environnement intra-utérin diabétique (SILVERMAN et al., 1998).

Lors de la grossesse normale, on observe des modifications métaboliques physiologiques qui privilégient l'alimentation fœtale. Il s'agit essentiellement d'une insulino-résistance qui devient très importante au troisième trimestre. L'insulino-résistance résulte de l'action des hormones placentaires. Elle est majorée par une obésité, ou une inactivité maternelle. Elle entraîne une augmentation progressive des besoins en insuline. Le pancréas augmente donc sa production d'insuline pour maintenir une glycémie normale. Cet hyperinsulinisme est en fait initié très tôt durant la grossesse, sous l'effet de l'augmentation brutale des oestrogènes maternels dont l'effet stimulant de l'insulinosécrétion est bien connu (FOURNIE, 1997).

Dans la gestation associée au diabète, l'importante insulino-résistance périphérique n'est plus compensée par l'augmentation de l'insuline en réponse à l'hyperglycémie maternelle, d'où l'apparition de périodes, essentiellement post-prandiales, d'hyperglycémies. Or le glucose traverse le placenta par un mécanisme de diffusion facilitée et stimule la sécrétion insulinaire pancréatique fœtale. Il existe alors chez le fœtus, en cas d'hyperglycémie maternelle, un hyperinsulinisme responsable de la macrosomie et des complications néonatales (FOURNIE, 1997).

*A court terme :*

- ✓ La mortalité périnatale reste une des conséquences majeures du diabète pendant la gestation. Les principales causes évoquées sont les malformations, la détresse respiratoire ou la mort inexpliquée.

- ✓ La macrosomie est la complication la plus fréquente (BAKER et al., 1993). Elle est définie par un poids de naissance supérieur au 90ème percentile pour l'âge gestationnel, ou supérieur à 4 kg à terme. Elle est définie par une augmentation de l'adiposité, dont la répartition est préférentiellement thoracique et abdominale, et aussi des masses musculaires et d'une organomégalie. Son risque est multiplié par deux en cas de diabète gestationnel comparé à une grossesse normale. Bien que différents facteurs maternels soient associés à la macrosomie (âge et poids maternel, prise de poids, multiparité), l'hyperglycémie maternelle et l'hyperinsulinisme fœtal qui en résulte, constituent une cause de macrosomie largement documentée (MEHTA et al., 1991). D'autres substrats comme les acides aminés et les somatomédines (IGFs) jouent probablement un rôle dans le développement de la macrosomie (SCHWARTZ, 1991).

*A long terme :*

- ✓ Le développement d'une obésité est un risque pour la progéniture des mères diabétiques. Elle est liée au mauvais contrôle du diabète maternel et à l'insulinosécrétion fœtale qui en découle. Des études chez les Indiens Pima ont confirmé le rôle de la glycorégulation maternelle anténatale sur le développement fœtal.  
Chez les enfants Pima, le risque d'obésité est plus grand pour ceux nés de mères diabétiques (58%) que pour ceux nés de mères normales (17%) ou diabétiques après leur grossesse (25%) (COMBS et al., 1992). L'éducation nutritionnelle de la mère puis des enfants prévient cette évolution.
- ✓ Les perturbations du métabolisme glucidique : Les expériences animales ont mis en évidence l'effet délétère à long terme de l'hyperglycémie chronique pendant la gestation sur la descendance.



Le développement et le métabolisme fœtal du rat sont perturbés lorsqu'il existe une hyperglycémie chronique chimiquement induite. Ces anomalies perdurent à la deuxième et troisième génération (LANGER et al., 1991). Chez l'homme, le statut glycémique maternel anormal semble avoir des conséquences similaires.

Chez les Indiens Pima, pour qui l'incidence du diabète de type 2 est élevée, le diabète au cours de la gestation est associé à la survenue plus fréquente et plus précoce d'un diabète chez l'enfant. En cas de diabète maternel, 45.5% des enfants seront diabétiques à 20 ans, contre 8.6 % en cas d'intolérance au glucose et 1.5 % en l'absence de toute anomalie (MC MANUS et RYAN, 1992). La prédisposition à l'intolérance au glucose et au diabète est donc bien liée à l'influence du milieu intra utérin.

Chez l'animal, des manipulations expérimentales des conditions de gestation ont apporté de solides arguments en faveur du rôle causal des conditions nutritionnelles intra-utérines sur la santé ultérieure (SIMMONS et al., 2001 ; ARMITAGE et al., 2005). Les mécanismes précis de ces relations ne sont pas connus, mais certaines hypothèses ont été avancées : des conditions de grossesse particulières représenteraient une entrave au développement de certaines lignées cellulaires ou, au contraire, favoriseraient le développement préférentiel d'autres lignées. Il est possible également que des altérations fonctionnelles soient en cause telles que, par exemple, des modifications durables de l'expression de certains gènes (TYCKO et MORISON, 2002).

Par ailleurs, il a été établi que le diabète maternel entraîne chez les mères et leur progéniture macrosomique, des troubles du métabolisme lipidique (OH et al., 1988 ; DORNER et PLAGEMANN, 1994 ; AERTS et al., 1995 ; SCHWARTZ et TERAMO, 2000 ; JONES, 2001 ; MERZOUK H. et al., 2002 a ; 2002 b), et des troubles du statut oxydant/antioxydant (KOLB et KOLB-BACHOFEN, 1992 ; CHIRICO et al., 1993 ; BONNEFONT-ROUSSELOT

HARRIS, 1989; NASSAR et al., 1986; SANDERS et al., 1985; WONG et al., 1985), ainsi que le taux du cholestérol en augmentant son excrétion biliaire (SMIT et al., 1991).

Par ailleurs, KESAVULU et al. (2002) ont reporté que le traitement des diabétiques par les AGPI n-3 améliore leur statut antioxydant. DEMOZ et al. (1992) et VENKATRAMAN et al. (1994) ont trouvé chez les souris que les AGPI n-3 stimulent l'activité des enzymes antioxydantes (catalase, glutathion peroxydase, superoxyde dismutase et glutathion réductase).

C'est dans le contexte de préoccupations sur le lien entre expositions précoces dès la période prénatale, développement et santé ultérieure des individus, que nous nous sommes intéressé.

Les bienfaits des AGPI n-3 alimentaires sur les maladies métaboliques (diabète, hypertension, obésité, maladies cardiovasculaires...) ont été démontrés par de nombreuses études, mais aucune n'a testé ces effets bénéfiques au cours de la macrosomie fœtale associée au diabète maternel. De ce fait, notre intérêt a porté sur les bienfaits des AGPI n-3 alimentaires au cours du diabète maternel et la macrosomie fœtale. Pour cela, nous avons choisi un modèle animal (le rat wistar). Ainsi, notre travail a abordé trois volets. Nous avons étudié chez les rates diabétiques et leur progéniture macrosomique :

- Les troubles du métabolisme des lipides
- Le statut oxydant/antioxydant
- Les effet des acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI n-3) alimentaires sur les dyslipidémies et le stress oxydatif.

## *Diabète, obésité et dyslipidémies*

Le diabète tout comme l'obésité, entraîne des altérations du métabolisme des glucides et des lipides amenant à des complications chroniques dont les dyslipidémies qui constituent la cause majeure de l'athérosclérose et donc des maladies cardiovasculaires, première cause de mortalité chez les diabétiques (VERGES, 1999).

Les dyslipidémies ou les hyperlipoprotéïnémies sont des affections fréquentes comportant l'augmentation permanente de la concentration plasmatique d'une ou plusieurs classes de lipoprotéines. L'athérosclérose, conséquence des dyslipidémies, est attribuable à des anomalies dans le métabolisme des lipides et des lipoprotéines plasmatiques (GINSBERG et GOLDBERG, 1998).

Les lipoprotéines sont des macromolécules complexes qui transportent des lipides plasmatiques hydrophobes, plus particulièrement du cholestérol et des triglycérides dans le plasma. Elles sont constituées de cholestérol, de triglycérides et de phospholipides (principalement la phosphatidylcholine et la sphingomyéline) (ESTERBAUER, 1995). Les apoprotéines leur procurent une stabilité structurale et déterminent le métabolisme des particules sur lesquelles elles résident. Les principales sont : Apo A1 (composante structurale des HDL); Apo B (composante structurale des chylomicrons, VLDL et LDL); Apo C (peut inhiber le captage hépatique des chylomicrons et des résidus VLDL et activer la lipoprotéine lipase) et Apo E (ligand pour lier quelques lipoprotéines aux récepteurs des LDL et composante structurale des VLDL).

La déficience en insuline au cours du diabète de type 1, a pour effet de faciliter la lipolyse, dont l'une des conséquences est la formation accrue de corps cétoniques. De plus, le DID s'accompagne de taux plasmatiques élevés en triglycérides, en acides gras libres et en cholestérol (TASKINEN, 1990). Une élévation des VLDL et des LDL et une réduction des

HDL sériques, associées à des modifications de la composition de ces lipoprotéines est présente. Ces modifications sont d'autant plus nettes que le diabète est mal contrôlé (GINSBERG, 1991 ; TOMKIN et OWENS, 1994).

L'hyperinsulinisme, observé au cours du diabète type 2 et au cours de l'obésité est caractérisé par une lipogenèse accrue et /ou une diminution de la lipolyse (KATHER, 1981 ; BJOMTORP, 1991). Les teneurs sériques en glucose sont normales ou élevées chez les obèses (WINOCOUR et al., 1992). Les principales modifications lipidiques observées lors de l'obésité sont une augmentation des teneurs sériques en triglycérides, apo B100, VLDL et LDL, et diminution de celles en HDL et apo A1 (BJOMTORP, 1991 ; WINOCOUR et al., 1992). Au cours de la grossesse diabétique, les mêmes anomalies sont observées et sont même accentuées. Etant donné que le glucose constitue le substrat énergétique essentiel du fœtus, et qu'il est transporté dans le placenta par un mécanisme de diffusion facilitée, l'hyperglycémie maternelle conduit à l'hyperglycémie fœtale. Cette dernière stimule le pancréas fœtal, ce qui entraîne une hyperplasie des cellules  $\beta$  et un hyperinsulinisme fœtal. En effet, une hypertrophie et une hyperplasie des cellules  $\beta$  pancréatiques sont présentes chez les macrosomiques (PEDERSEN et OSLER, 1961 ; COWETT et SCHWARTZ, 1982 ; DE VILLIERS et al., 1984). Ces changements morphologiques sont associés à une élévation du contenu pancréatique en insuline, à une maturation précoce des mécanismes de sécrétion de l'insuline (DE VILLIERS et al., 1984), et à un accroissement du nombre et de l'affinité des récepteurs cette hormone (PEDERSEN et al., 1981 ; KAPLAN, 1984), ce qui accentue encore les effets de l'hyperinsulinisme fœtal. Ce dernier entraîne une élévation de la synthèse du glycogène, un accroissement de l'anabolisme protéique et du stockage lipidique, d'où un développement excessif de l'adiposité (HILL, 1978). Cependant, l'hyperinsulinisme fœtal n'est pas le seul facteur responsable de la macrosomie. KNOPP et al. (1986) et BONET et al. (1992) ont établi que l'augmentation du transfert des acides gras de la mère au fœtus, après

hydrolyse des triglycérides par la lipoprotéine lipase placentaire, peut contribuer à l'élévation de la lipogenèse du fœtus. KALKHOFF et al. (1988) suggèrent qu'un transfert excessif d'acides aminés, dont le taux est élevé chez les femmes gestantes diabétiques et/ou obèses, à travers le placenta peut contribuer au développement de la macrosomie fœtale.

L'utilisation d'un modèle animal (le rat wistar) permet une meilleure compréhension, non seulement des conséquences pour le fœtus des grossesses diabétiques, mais aussi des effets à long terme de la macrosomie. Une prédisposition au diabète est transmise aux fœtus, par la rate gestante rendue diabétique par la streptozotocine, avec des effets qui persistent à l'âge adulte et même à la génération suivante (GAUGUIER et al., 1990 ; DORNER et PLAGEMANN, 1994). En effet, plusieurs auteurs se sont intéressés aux troubles du métabolisme lipidique chez le rat macrosomique. VILEISIS et OH (1983) ont montré que la lipogenèse est augmentée dans le foie et le tissu adipeux des rats nouveau-nés macrosomiques hyperinsuliniques. CATLIN et al. (1985) ont trouvé que les teneurs en lipides hépatiques et musculaires, sont plus élevées chez les macrosomiques âgés de 15 jours comparés aux témoins. GELARDI et al. (1990) ont noté un excès de masse grasse chez les macrosomiques âgés de 10 semaines. Les adipocytes, dont le nombre reste inchangé, sont riches en lipides et sont de plus grande taille que les adipocytes des rats témoins. Ceux-ci deviennent à l'âge adulte moins sensibles à l'action de l'insuline, ce qui diminue leur capacité de convertir le glucose en acides gras libres et en triglycérides. Cette diminution est considérée comme un mécanisme de rétrocontrôle de la lipogenèse dans ces cellules adipeuses déjà très riches en lipides (CHA et al., 1987 ; GELARDI et al., 1990).

A côté de cela, des changements qualitatifs et quantitatifs des lipides et lipoprotéines impliquant des changements d'activités enzymatiques spécifiques (LCAT, LPL, HMGCoA, 7 $\alpha$  hydroxylase...) ont été notés chez les macrosomiques et les diabétiques (BJORKHEM, 1985 ;

STAHLBERG et al., 1991 ; MAECHLER et al., 1992 ; TOMKIN et OWENS, 1994 ; TASKINEN, 1997 ; MERZOUK H. et al., 2000 ; VERGES et al., 2000).

ESTERBAUER et al. (1992) ont rapporté que les niveaux élevés de LDL contribuent à la pathogenèse de l'athérosclérose, plus particulièrement, il semble que l'oxydation des LDL soit le facteur déterminant de son athérogénicité pour les raisons qui suivent. Les LDL oxydées, plutôt que les LDL intactes, sont reconnues par les récepteurs piègeurs des macrophages et ainsi elles peuvent promouvoir la formation de cellules spumeuses. Les LDL oxydées, par leur action chimiotactique pour les monocytes, contribuent à la migration de ceux-ci dans l'espace endothélial. De plus, les LDL oxydées sont cytotoxiques et procurent un mécanisme potentiel pour l'atteinte endothéliale et la nécrose cellulaire (NIKI et NOGUCHI, 1997). Il est maintenant bien établi que l'oxydation des LDL est un des facteurs les plus importants dans la progression de l'athérosclérose (STEINBERG, 1991 ; ROSS, 1993 ; ESTERBAUER, 1995 ; NAPOLI, 1997).

L'oxydation des LDL et sa contribution à l'athérogenèse sont illustrées dans la figure 1.

Les LDL oxydées inhibent la motilité des monocytes/macrophages et ainsi préviennent leur retour à la circulation. Les récepteurs piègeurs de macrophages reconnaissent les LDL oxydées et les convertissent en cellules spumeuses. Les produits de peroxydation tels la lysophosphatidyl choline peuvent agir en tant que facteurs chimiotactiques pour les monocytes sanguins. La sécrétion de radicaux superoxydes, de peroxyde d'hydrogène et d'enzymes hydrolytiques endommage les cellules endothéliales avoisinantes (LYONS, 1993 ; RICE-EVANS et BURDON, 1993).

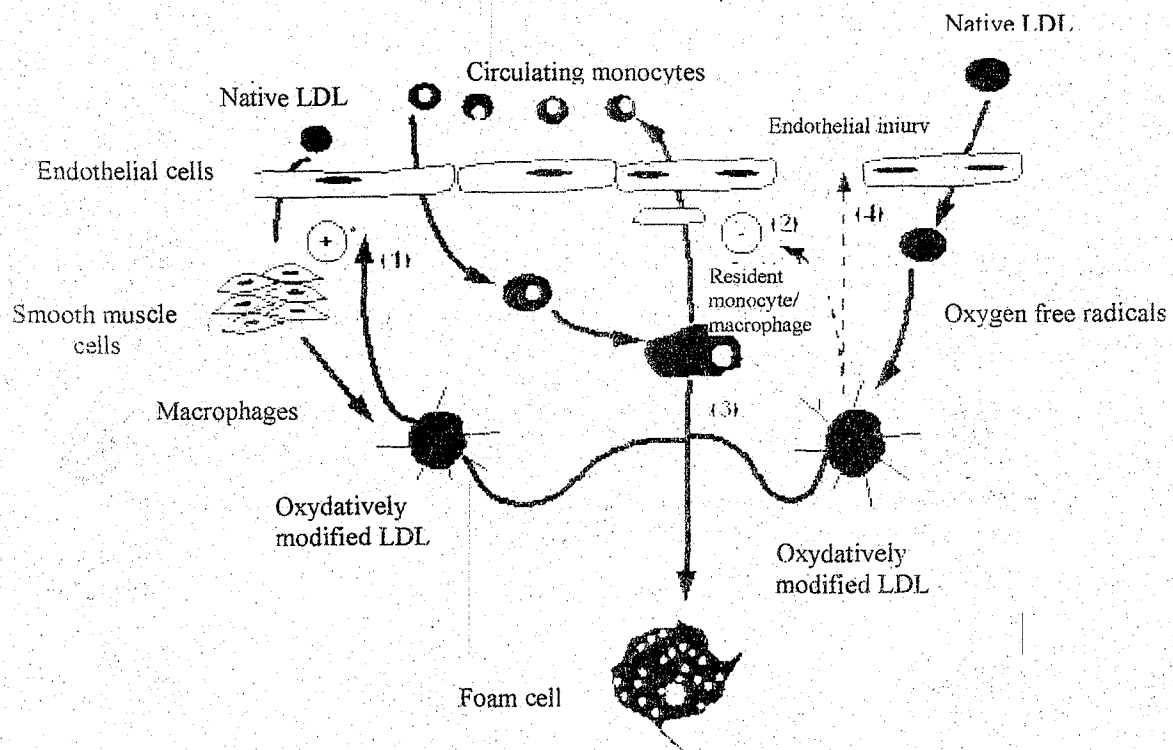


Figure 1 : Contribution des LDL oxydées à l'athérogenèse (BANKSON et al., 1993)

## *Diabète, obésité et statut oxydant/antioxydant*

La chaîne respiratoire mitochondriale joue un rôle capital dans la cellule en étant responsable de la transformation de l'oxygène en deux molécules d'eau. Cette réaction de réduction directe impliquant la présence de quatre électrons est rendue possible grâce à un système complexe de protéines et d'enzymes (cytochromes) localisés dans la membrane interne de la mitochondrie. Les conséquences de cette activité mitochondriale seront doubles et paradoxales. D'une part, la mitochondrie fournira à la cellule une source d'énergie importante puisque 36 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) à haut potentiel énergétique seront générées lors de la réduction de l'oxygène. Par contre, environ 0,4 à 4% de l'oxygène ne seront pas correctement convertis en eau suite à des fuites électroniques résultant d'imperfections de la chaîne respiratoire mitochondriale. Par réduction monoélectronique, l'oxygène donnera naissance à des espèces oxygénées activées (EOA) parmi lesquelles figurent des radicaux libres comme l'anion superoxyde ou le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ). En chimie, un radical libre est un atome ou une molécule dont la structure chimique est caractérisée par la présence d'un électron libre rendant cette espèce chimique beaucoup plus réactive que l'atome ou la molécule dont il (elle) est issu(e). D'autres entités non radicalaires de l'oxygène peuvent être produites comme le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ou l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ). La formation des EOA requiert la présence de métaux de transition comme le fer ou le cuivre qui agissent comme des catalyseurs incontournables dans toute la chimie des radicaux libres. (SIES, 1991 ; GUTTERIDGE, 1992; HALLIWELL, 1994).

L'avènement de la biologie moléculaire a permis de montrer que les EOA ont un rôle physiologique important en agissant à faible concentration comme des messagers secondaires capables :



- de réguler le phénomène d'apoptose qui est un suicide programmé des cellules évoluant vers un état cancéreux (CURTIN et al., 2002)
- d'activer des facteurs de transcription (NFkB, p38-MAP kinase, ...) eux – mêmes responsables de l'activation de gènes impliqués dans la réponse immunitaire (OWUOR et KONG, 2002),
- de moduler l'expression de gènes de structure codant pour les enzymes antioxydantes (HOLGREM, 2003).

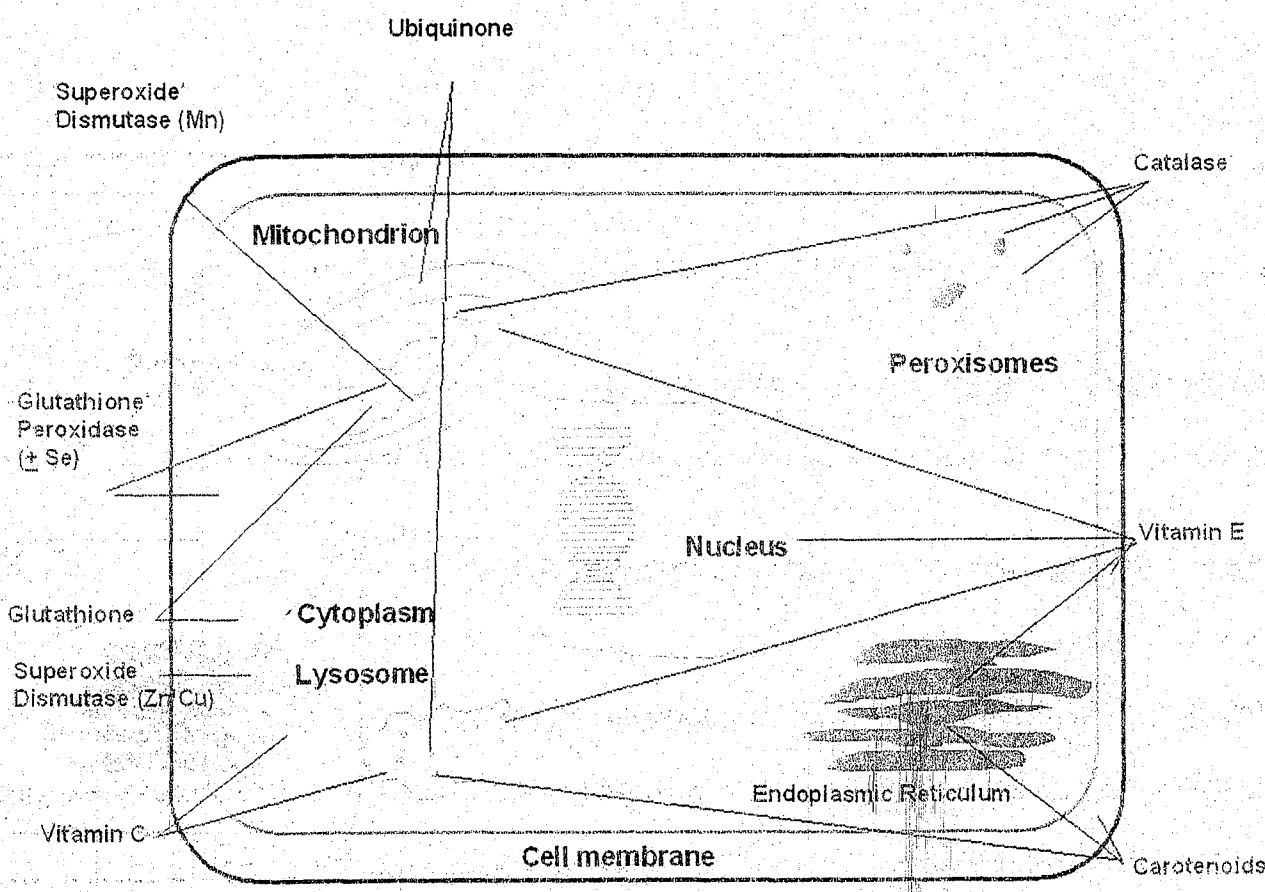
Le revers de la médaille est que, si les EOA sont produites en quantité trop importante, elles auront des effets néfastes en induisant un phénomène d'apoptose dans des cellules saines ou en activant divers gènes codant pour l'expression de cytokines pro-inflammatoires ou de protéines d'adhésion. Par ailleurs, les EOA, de par leur nature instable, sont particulièrement réactionnelles et seront capables de provoquer des dégâts cellulaires importants (CURTIN et al., 2002):

- en provoquant des cassures et des mutations au sein de l'acide désoxyribonucléique (ADN),
- en inactivant des protéines et des enzymes, car leur oxydation favorise leur fragmentation et leur dégradation,
- en oxydant les sucres (glucose),
- en induisant des processus de peroxydation lipidique au sein des lipoprotéines et des acides gras polyinsaturés de la membrane cellulaire, ce qui aboutit à une altération de la fluidité et de la perméabilité membranaire.

L'équilibre entre les effets positifs et négatifs des EOA est donc particulièrement fragile. La production des EOA sera strictement régulée par notre organisme qui a développé des défenses antioxydantes pouvant nous protéger contre les effets potentiellement destructeurs des EOA. Ces systèmes se composent (LEVINE et KIDD, 1996 ; GHISELLI et al., 2000) :

- d'enzymes (superoxydes dismutases, catalase, glutathion peroxydases, couple thioredoxine - thioredoxine réductase, hème oxygénase, ...),
- de protéines transporteuses du fer et du cuivre (transferrine, ferritine, céruléoplasmine),
- de molécules antioxydantes de petite taille (glutathion, acide urique, bilirubine, glucose, vitamines A, C, E, ubiquinone, caroténoïdes, flavonoïdes),
- d'oligo-éléments (cuivre, zinc, sélénium) indispensables pour l'activité des enzymes antioxydantes.

Un système de défense secondaire composé d'enzymes dont le rôle consiste à empêcher l'accumulation dans la cellule de protéines ou d'ADN oxydés et à dégrader leurs fragments toxiques, complète la panoplie des moyens de protection contre les EOA. Ces enzymes antioxydantes, telles la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion (GSH) peroxydase, sont préventives parce qu'elles agissent sur les espèces impliquées dans l'initiation de la chaîne de réactions des radicaux libres; tandis que les molécules antioxydantes plus petites, telles l'ascorbate, le tocophérol, l'ubiquinone, l'urée et le GSH, sont capables de piéger directement les radicaux oxydants et sont ainsi des antioxydants «briseurs» de la chaîne radicalaire (BUETTNER, 1993). De façon générale, les actions respectives des diverses enzymes antioxydantes ne sont pas du même ordre d'importance (HARRIS, 1992). La figure 2 illustre les principaux sites d'actions des antioxydants intracellulaires.



**Figure 2: Antioxydants intracellulaires (BANKSON et al, 1993)**  
 \* = systèmes enzymatiques

Un stress oxydant se définira comme étant un déséquilibre de la balance entre les antioxydants et les pro-oxydants en faveur de ces derniers. In vivo, plusieurs systèmes biochimiques peuvent être à l'origine d'une production accrue d'EOA (fig 3). L'altération de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie est une première cause de l'augmentation du stress oxydant (SIES, 1991) Ce stress oxydant est une complication majeure dans de nombreuses pathologies, tels le cancer l'athérosclérose, le diabète ...

L'hyperglycémie entraîne un stress oxydant qui est sans doute responsable des principales complications délétères. Le métabolisme des hydrates de carbone joue un rôle particulier à travers le shunt des pentoses via la production de NADPH qui peut stimuler les défenses cytoplasmiques par la glutathion réductase ou au contraire activer la production physiologique des EOA par la NADPH oxydase. Au niveau cellulaire, en particulier au niveau de l'endothélium des vaisseaux, le stress oxydant peut être responsable d'une augmentation de la probabilité d'engagement dans la voie de l'apoptose conduisant à la mort cellulaire. Ainsi l'hyperglycémie est responsable d'une accélération des phénomènes d'apoptose qui est prévenue par les antioxydants (KALOUSOVA et al., 2002).

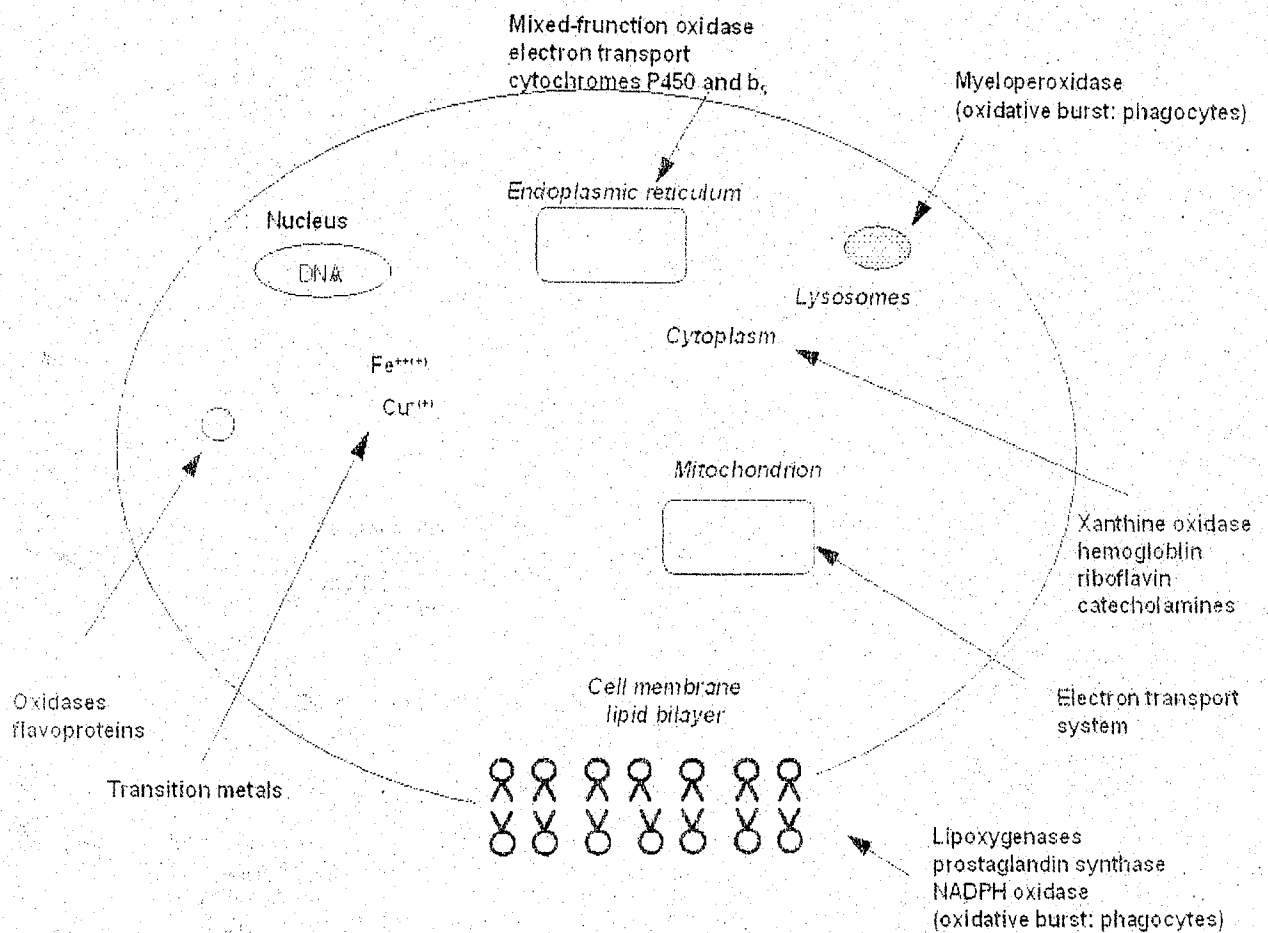


Figure 3 : Sources cellulaires de radicaux libres (KEHRER, 1993)

Par ailleurs, les cellules bêta sont particulièrement vulnérables au stress oxydatif en raison d'une part de leur pauvreté en Cu/Zn superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase (GRANKVIST et al., 1981 ; LENZEN et al., 1996), d'autre part de leur faible contenu en glutathion réduit (AMMON et al., 1983). Cette fragilité intervient dans les mécanismes qui conduisent à la destruction des cellules bêta sous l'effet d'agents diabétogènes comme l'alloxane et la streptozotocine (MALAISSE et al., 1982 ; OBERLEY, 1988). Des cellules insulinosécrétrices surexprimant la glutathion peroxydase, la catalase ou la Cu/Zn superoxyde dismutase, sont protégées contre l'effet délétère d'agents oxydants (KRALIK et al., 1998 ; TIEDGE et al., 1999). In vivo, la surexpression de la Cu/Zn superoxyde dismutase chez les souris transgéniques augmente la tolérance des cellules bêta au stress oxydatif induit par l'alloxane (KUBISCH et al., 1994 ; 1997). La surexpression dans les cellules bêta, chez des souris transgéniques, de la thiorédoxine, une enzyme ayant des propriétés de défense vis-à-vis des radicaux libres et antiapoptotiques, diminue l'effet diabétogène de la streptozotocine (HOTTA et al., 1998). Enfin, la surexpression de la catalase dans les îlots de souris protège contre les effets de l'alloxane sur la sécrétion d'insuline et diminue les effets diabétogènes de la streptozotocine in vivo (XU et al., 1999).

Plusieurs auteurs ont également souligné l'intervention des radicaux libres dans la destruction auto-immune des cellules bêta dans le diabète de type 1 (ARGILES et al., 1992 ; CUNNINGHAM et GREEN, 1994 ; RAES et al., 1995 ; RABINOVITCH, 1998).

- A côté de cela, les radicaux libres inhibent la sécrétion d'insuline (KRIPPEIT-DREWS et al., 1994). Ils interfèrent avec différentes étapes du couplage stimulus- sécrétion. Dans l'îlot de souris, ils provoquent une hyperpolarisation membranaire par activation des canaux potassiques dépendants de l'ATP (NAKAZAKI et al., 1995), par un mécanisme qui semble impliquer une diminution de la concentration en ATP sans modification des taux de calcium

intracellulaires (KRIPPEIT-DREWS et al., 1999). Ils inhibent l'activation du métabolisme mitochondrial par le glucose (MAECHLER et al., 1999).

La corrélation entre stress oxydatif et hyperglycémie est bien connue dans le domaine des complications secondaires du diabète (BAYNES, 1991). Plus récemment, il a été proposé que le stress oxydatif puisse représenter un mécanisme par lequel l'hyperglycémie chronique aggrave le dysfonctionnement de la cellule bêta dans le diabète de type 2 (hypothèse de glucotoxicité) (ROBERTSON et al., 2000). Chez le rat obèse et diabétique OLETF, la troglitazone prévient l'augmentation des produits de peroxydation des lipides et de l'activité de la superoxyde dismutase (FUKUI et al., 2000). SREENAN et al. (1996) ont initialement montré que le traitement de rats diabétiques ZDF par la metformine et la troglitazone, deux molécules ayant des propriétés antioxydantes, prévient l'apparition de l'hyperglycémie. Les acides gras *in vitro* entraînent sur des îlots isolés de rats ZDF la formation de NO, la formation d'ARN messager de la synthase inductible de l'oxyde nitrique (iNOS) et diminuent la sécrétion d'insuline, ces effets étant atténués en présence d'aminoguanidine, qui diminue la production de NO ; *in vivo*, le traitement par l'aminoguanidine de rats prédiabétiques ZDF diminue l'expression de iNOS dans l'îlot et supprime la destruction des îlots, prévenant l'apparition du diabète (SHIMABUKURO et al., 1997). L'administration d'aminoguanidine chez le rat ZDF supprime l'augmentation des marqueurs du stress oxydatif et améliore l'hyperglycémie, l'intolérance au glucose, la réponse insulinosécrétoire au glucose, la diminution du contenu des îlots en insuline, l'expression du gène de l'insuline, et la liaison du facteur de transcription PDX-1 au promoteur du gène de l'insuline (TANAKA et al., 1999). Il est intéressant de remarquer que le traitement des rats ZDF par un inhibiteur de iNOS ne prévient pas les effets délétères de l'hyperglycémie, ce qui suggère que la glucotoxicité dans ce modèle met en jeu la génération de radicaux libres mais pas la synthèse de NO (TANAKA et al., 1999).

La génération de radicaux libres est probablement un médiateur des effets du TNFalpha sur la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline, et pourrait être impliquée dans l'insulinorésistance (PAOLISSO et al., 1999).

- Plusieurs études sur des lignées cellulaires in vitro démontrent que le stress oxydatif inhibe la transduction du signal de l'insuline (HANSEN et al., 1999), la translocation du transporteur de glucose GLUT4 (RUDICH et al., 1997) et l'activation de la protéine kinase B (RUDICH et al., 1999 ; TIROSH et al., 1999) stimulées par l'insuline dans les cellules adipeuses. Ces effets sont bloqués en présence d'un antioxydant (RUDICH et al., 1999).
- Chez le rat Zucker obèse et résistant à l'insuline, les marqueurs de stress oxydatif sont élevés et sont diminués par l'administration de vitamine E, qui corrige en partie l'hyperinsulinémie (LAIGHT et al., 1999a). À l'inverse, des rats Zucker traités par des pro- oxydants deviennent diabétiques, alors que le traitement n'a pas d'effet chez des rats témoins du même âge non insulinorésistants (LAIGHT et al., 1999b).

De nombreuses études montrent une augmentation des marqueurs de stress oxydatif dans le diabète de type 2 (NOUROOZ-ZADEH et al., 1995 ; DANDONA et al., 1996 ; CERIELLO et al., 1996 ; THORNALLEY et al., 1996 ; LEINONEN et al., 1997), ainsi qu'une diminution des mécanismes de défense vis-à-vis des radicaux libres (OPARA et al., 1999 ; YOSHIDA et al., 1995 ; SANTINI et al., 1997 ; REHMAN et al., 1999), associée à une diminution du taux d'acide urique et d'acide ascorbique circulant (SUNDARAM et al., 1996 ; WILL et BYERS, 1996 ; MAXWELL et al., 1997). On observe également une diminution de la superoxyde dismutase et de la catalase chez des patients ne présentant qu'une intolérance au glucose, chez qui une diminution de l'acide ascorbique et du glutathion réduit est également déjà présente (VIJAYALINGAM et al., 1996). PAOLISSO et al. (1994a) ont observé qu'il existait une corrélation positive entre les radicaux libres plasmatiques et l'insulinémie à jeun, et une corrélation négative avec l'utilisation du glucose, en particulier son utilisation non oxydative,



dont la diminution est un élément essentiel de la physiopathologie du diabète de type 2. Il est possible que cette anomalie du statut oxydatif dans le diabète de type 2 soit secondaire à l'hyperglycémie.

Par ailleurs, plusieurs études démontrent qu'un traitement anti-oxydant améliore la sensibilité des tissus à l'insuline dans le diabète de type 2. PAOLISSO et al. (1993), ont observé qu'un traitement par la vitamine E augmente l'utilisation globale du glucose, et en particulier son utilisation non oxydative. Le même groupe a montré les mêmes effets avec la vitamine C sur la sensibilité à l'insuline, observant de plus une amélioration des lipides circulants (PAOLISSO et al. 1994b). Sous l'effet du traitement, les radicaux libres circulants étaient diminués (PAOLISSO et al. 1995). Un traitement par la silymarine, un agent antioxydant, chez des patients diabétiques cirrhotiques traités par l'insuline, entraîne une diminution des besoins en insuline exogène (VELUSSI et al., 1997). Les patients diabétiques de type 2 ont un taux de glutathion réduit dans les érythrocytes diminué, et la perfusion de glutathion réduit augmente l'utilisation du glucose au cours d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique (DE MATTIA et al., 1998).

## *Diabète, Obésité et acides gras polyinsaturés n-3*

Traditionnellement, le rôle de l'alimentation a été de fournir l'énergie et les éléments nutritifs essentiels pour soutenir la vie et la croissance. Toutefois, au cours des années, le rôle de l'alimentation a évolué, les aliments étant de plus en plus appelés à fournir des avantages physiologiques en matière de gestion et de prévention des maladies. Les aliments qui ont ces qualités sont appelés aliments fonctionnels (MAZZA et OOMAH, 2000).

Notre alimentation contient de grandes quantités d'acides gras polyinsaturés de type n-6 (acides linoléique et arachidonique). Par contre, elle est plus pauvre en poisson, qui contient, à l'inverse de la viande, beaucoup d'acides gras polyinsaturés de type n-3 (acides alphalinoléique et docosahéxaénoïque). Les AGPI sont classés en 4 grandes familles (BLOND, 1992):

- ❖ Les n-7 et les n-9, dits non essentiels car leurs précurseurs respectifs (acide palmitoléique et acide oléique) peuvent être bio synthétisés par l'organisme animal ou aussi être apportés par l'alimentation.
- ❖ Les n-6 et les n-3, dits essentiels (AGE) et dont les précurseurs métaboliques respectifs sont l'acide linoléique ( $18:2n-6$ ) et l'acide  $\alpha$  linoléique ( $18:3n-3$ ). Après leur absorption, ces deux acides gras conduisent à la synthèse spécifique de dérivés actifs à plus longue chaîne par un processus de désaturations et élongations successives. Les principaux AGPI dérivés de longue chaîne ainsi formés sont l'acide arachidonique ( $20:4n-6$ ) pour la famille n-6, et les acides eicosapentaénoïque ( $20:5n-3$  ou EPA) et docosahéxaénoïque ( $22:n-6$  ou DHA) pour la famille n-3.

La régulation de la biosynthèse des acides gras se fait par un double système enzymatique qui fabrique continuellement les AGPI n-3, n-6, n-7 et n-9 (figure 4). Les deux enzymes impliquées sont les élongases qui augmentent la longueur de la chaîne, et les désaturases qui augmentent le nombre d'insaturation, en agissant sur des régions spécifiques des acides gras.

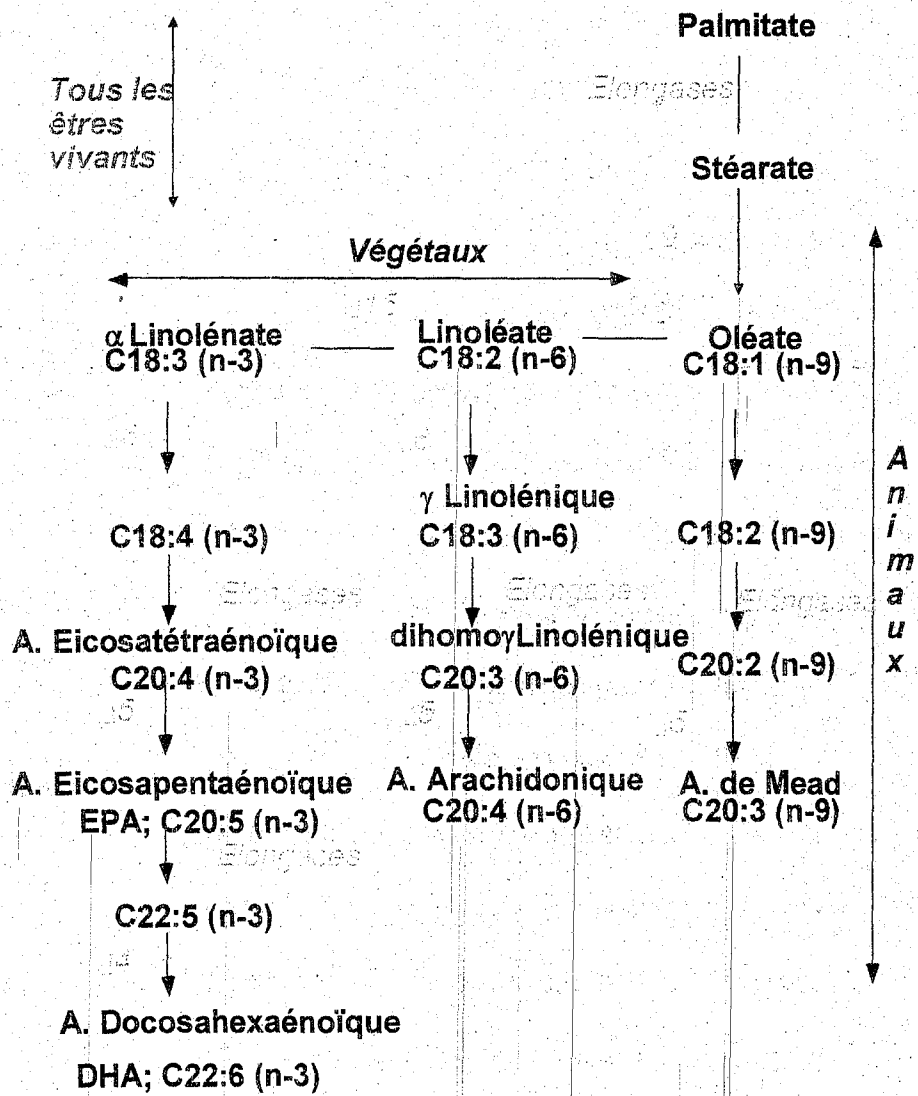


Figure 4 : Biosynthèse des acides gras polyinsaturés (VOSS et al., 1991)

Les désaturases ne sont pas spécifiques d'un acide gras, ce qui entraîne une compétition de substrat. Les désaturases communes aux animaux et végétaux sont les  $\Delta 9$ ,  $\Delta 6$  et  $\Delta 5$ , alors que les  $\Delta 12$  et  $\Delta 15$  sont spécifiques aux végétaux, et permettent la synthèse de l'acide linoléique et linoléique (POISSON, 1991).

Cependant, dans certaines conditions physiologiques (âge, jeûne) ou pathologiques (diabète, obésité,...), un déficit en  $\Delta 6$  désaturases conduit à un déficit de synthèse des dérivés supérieurs (acide gamma linoléique, C18 : 3n-6, acide arachidonique, C20 : 4 n-6 ; et EPA, C 20: 5n-3 ou DHA, C 22 : 6n-3) (LECERF, 2000).

Plusieurs auteurs ont démontré les bienfaits des AGPI n-3 sur les dyslipidémies et le stress oxydatif (HARRIS, 1989 ; BERRY, 1997 ; HUNKAR et al., 2002 ; YILMAZ et al., 2002 ; AILHAUD et GUESNET, 2003 ; MERZOUK H. et KHAN, 2003). DE LORGERIL et al. (1994) ont montré qu'une alimentation crétoise riche en acide alpha - linoléique permettait de réduire de plus de 70% le taux de récurrences cardiovasculaires chez des patients ayant subi un infarctus du myocarde.

Les effets physiologiques des AGPI n-3 s'exercent à plusieurs niveaux. Tout d'abord au niveau des membranes des cellules où ils y jouent un rôle structural car ce sont les constituants naturels des phospholipides membranaires. Ils régulent ainsi l'activité des enzymes, transporteurs et récepteurs des membranes biologiques directement ou indirectement en modifiant leurs propriétés physico-chimiques. Le second niveau implique le processus de communication entre les cellules car ces AGPI sont les précurseurs incontournables de la voie de synthèse des eicosanoïdes. Ces eicosanoïdes régulent des fonctions aussi diverses que la reproduction, la physiologie cardiaque, la coagulation sanguine, l'inflammation, le fonctionnement des glandes endocrines et exocrines, et regroupent divers types de molécules comme les prostaglandines. Enfin les AGPI interagissent au niveau du noyau des cellules adipeuses et hépatiques car ils régulent

l'expression des gènes impliqués dans leur transport sanguin sous forme de lipoprotéines, et leur métabolisme par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires spécifiques (POUMES – BALLIHAUD et al., 2001 ; DURAND et al., 2002).

Des études ont montré que les acides gras de la famille n-3 contenus dans l'huile de poisson, et favorables à la prévention et au traitement des patients atteints de maladies cardiovasculaires (KROMHOUT, 1989; PRICHARD et al., 1995), ont plusieurs sites d'actions comme la prévention des arythmies, action anti-coagulante et anti-plaquettaire, modulation de la croissance cellulaire dans la paroi artérielle, amélioration de l'hémodynamique vasculaire, régulation de la pression artérielle et action hypolipémiante. En effet, concernant cette dernière propriété, il a été observé que ces acides gras diminuent les teneurs plasmatiques en triglycérides. Il se produit une baisse de synthèse du LDL cholestérol concomitante à l'augmentation du HDL cholestérol, ceci est dû d'une part, à une augmentation de production des HDL, et d'autre part une augmentation de l'activité de l'enzyme lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT) ainsi qu'à la diminution du catabolisme des HDL (FUMERON et al., 1991; SANCHEZ-MUNIZ et al., 1999). LOVEJOY (1999) a montré les bienfaits des AGPI n-3 sur l'obésité par la diminution de la lipogenèse adipocytaire (en augmentant la sensibilité du tissu musculaire à l'insuline) et donc diminution du transport de glucose, et par la diminution du stockage des lipides dans le tissu adipeux.

Par ailleurs, en présence d'EOA, les AGPI n-6 s'oxydent facilement pour former des peroxydes lipidiques. De plus, la biosynthèse de ces acides gras conduit à la formation de prostaglandines pro-inflammatoires, par contre les AGPI de type n-3 (acides alphalinoléique et docosahexaénoïque) sont moins facilement peroxydables et leur biosynthèse donne naissance à des prostaglandines de type anti-inflammatoires. Les AGPI n-3 stimulent également l'activité des enzymes antioxydantes, ce qui contribue largement à l'amélioration

du statut antioxydant altéré chez les diabétiques et les obèses (YILMAZ et al., 2002 ; KESAVULU et al., 2002 ; SARSILMAZ et al., 2003).

## BUT DU TRAVAIL

Face d'une part, aux études montrant les complications du diabète durant la gestation sur les mères et leur progéniture (dyslipidémies, obésité, insulino-résistance, stress oxydatif) et d'autre part aux nombreuses évidences, impliquant les bienfaits des AGPI n-3 sur ces complications, notre travail a porté sur :

- un suivi chronologique du métabolisme des lipides et lipoprotéines et du stress oxydatif, chez les rats macrosomiques, puisque les altérations dues au diabète peuvent être initiés in utero et s'amplifient avec l'âge des rats.
- L'étude du métabolisme des lipides et lipoprotéines et du stress oxydatif chez les mères diabétiques et leur progéniture macrosomique après l'administration d'un régime enrichi en AGPI n-3 (EPA et DHA).

Ceci est dans le but de voir si la macrosomie fœtale est associée à un profil lipoprotéique favorisant le développement de certaines maladies à l'âge adulte et plus particulièrement le diabète et l'obésité, et si les AGPI n-3 préviennent ces maladies et améliorent les troubles du métabolisme lipidique et du statut oxydant/antioxydant.

## **MATERIEL ET METHODES**



## I. Protocole expérimental

L'étude est réalisée sur des rates de type wistar provenant de L'IFFA CREDO (Lyon, France). Ces rates sont séparées en deux groupes et sont nourries de deux régimes différents :

- Le régime témoin (Isio), dont la composition est donnée au tableau I. L'huile végétale Isio-4 contient en (mg/g): 18:2n-6, 47,2; (n-3) totaux 1,7; et les acides gras mono insaturés 40,2 (en grande partie les 18:1)
- Le régime test (Epax) (tableau I), enrichi en acides gras polyinsaturés n-3 (Epax) : Ce régime a la même composition que le régime Isio sauf que 2,5% d'huile végétale Isio-4 sont remplacés par l'Epax-7010 (Pronova laboratory, Norvège) qui contient 85% (n-3) AGPI, i.e. EPA, 70%; DHA, 12% et  $\alpha$ -tocophérol, 2,1-3,2%. L'Epax-7010 est fermé sous azote afin d'éviter toute oxydation et est conservé à 4°C.

Tableau I : Composition des régimes Isio et Epax en pourcentages pondéraux et énergétiques

Constituants	Régime Isio (% pondéral)	Régime Epax (% pondéral)	% énergétique (Kcal)
amidon	58,7	58,7	234,8
caséine	20	20	80
saccharose	5	5	20
cellulose	5	5	-
Sels minéraux	4	4	-
vitamines	2	2	-
méthionine	0,3	0,3	1,2
huile	5 % huile végétale Isio	2,5% huile végétale Isio et 2,5% huile Epax	45
Total	100	100	381

Il est à signaler que les deux régimes sont isocaloriques.

Après adaptation des rates aux régimes (période de 15 jours), celles-ci sont accouplées et la présence de spermatozoïdes sur le frottis vaginal détermine le premier jour de la gestation durant lequel les rates sont mises dans des cages individuelles. Elles ont accès à de l'eau de robinet et au régime.

Ensuite pour chaque régime les rates gestantes sont divisées en 2 lots :

- Un lot témoin recevant au 5<sup>ème</sup> jour de la gestation une injection intra péritonéale de 2ml de tampon citrate (0,1 mole/l, pH 4,2).
- Un lot expérimental recevant au 5<sup>ème</sup> jour de la gestation une injection intra péritonéale de streptozotocine (N-[Méthylnitrosocabamoyl]D-glucosamine, C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>, PM=265,2, Sigma, L'Isle d'Abeau Chesnes, France) diluée dans du tampon citrate (0,1 mole/l, pH 4,2) à une dose finale de 40 mg/kg de poids corporel. Cette dose provoque une hyperglycémie (comprise entre 1,5 et 3 g/l) chez 60% des rates, et permet d'avoir un nombre suffisant de nouveau-nés macrosomiques (obèses).

Ainsi on obtient 4 lots différents :

- Un lot de rates témoins (non diabétiques) recevant le régime témoin (Isio)
- Un lot de rates témoins (non diabétiques) recevant le régime test (Epax)
- Un lot de rates diabétiques recevant le régime témoin (Isio)
- Un lot de rates diabétiques recevant le régime test (Epax)

A j12, j16, j18 et j20 de la gestation, l'induction du diabète par la streptozotocine est vérifiée. Le sang est récupéré au niveau de la veine caudale et déposé sur une bandelette réactive BM-TEST GLYCEMIE 20-800 (méthode à la glucose oxydase, Boehringer Mannheim, Meylan, France). La lecture se fait à l'aide d'un glucomètre (Beckman Instruments, Fullerton, Calif., USA). Seules les rates diabétiques présentant une

hyperglycémie comprise entre 5,55 et 16,65 mM sont sélectionnées (GELARDI et al., 1990 ; MERZOUK et al., 2001).

A la mise bas, les nouveau-nés des rates diabétiques sont considérés macrosomiques lorsque leur poids est supérieur à 1,7 SD (écart type) de la moyenne des poids de naissance des nouveau-nés témoins (de rates non diabétiques) (MERZOUK et al., 2001 ; 2002). Le 1,7 SD correspond au 90<sup>ème</sup> percentile des courbes humaines, ce qui correspond à 4Kg à terme (OH et al., 1988).

Le poids moyen des nouveau-nés témoins est de  $5,25 \pm 0,50$  g. Les nouveau-nés issus de mères diabétiques ayant un poids supérieur à 6,1g sont considérés comme macrosomiques et sont inclus dans l'étude. Pour le régime Isio, le taux de rats macrosomiques est de 62% contre 55% pour le régime Epax.

Le poids moyen des rats macrosomiques à la naissance dans cette étude est de  $7,8 \pm 0,41$ g.

Ces nouveau-nés sont hyperglycémiques et hyperinsulinémiques.

Comme le nombre de petits par portée influence la croissance postnatale (CHA et al., 1987), la sélection des portées est importante pour tous les lots étudiés. Seules les portées entre six et huit naissances sont incluses dans ce travail. Ceci permet aux mères d'allaiter leurs nouveau-nés de façon identique pour les différents lots étudiés.

Chaque semaine et jusqu'à l'âge adulte (12 semaines), le poids des rats est noté, la glycémie est déterminée. A 4 semaines, les petits sont sevrés et les mâles sont mis dans des cages individuelles à métabolisme, afin d'étudier l'utilisation métabolique des deux régimes par les rats témoins et macrosomiques. Ils boivent et mangent à volonté le même régime que celui de leurs mères.

## **II. Bilan nutritionnel**

Ce bilan est réalisé sur une période allant de 4 semaines à 12 semaines (3 mois) de l'âge des rats, afin d'étudier l'utilisation métabolique des deux régimes par les rats, et l'effet des AGPI n-3 sur la progéniture macrosomique des rates diabétiques. La nourriture ingérée est pesée tous les jours. Les urines et les fèces sont collectés durant des périodes de 7 jours, du 30<sup>ème</sup> au 37<sup>ème</sup> jour (BI), du 53<sup>ème</sup> au 60<sup>ème</sup> jour (BII), du 60<sup>ème</sup> au 67<sup>ème</sup> jour (BIII), et du 83<sup>ème</sup> au 90<sup>ème</sup> jour (BIV). Les urines sont centrifugées puis conservées à 4°C après l'ajout du thymol/isopropanol à 10%. Les fèces sont séchés à l'étuve à 60°C pendant 24h puis pesés, finement broyés et conservés à -20°C.

### **II.1. Détermination du contenu en azote**

le contenu en azote des régimes, des urines et des fèces est déterminé par la méthode de KJELDHAL (1883) qui comporte une minéralisation, une distillation et une titration.

Les bilans azotés (BA), les coefficients d'utilisation digestive de l'azote (CUD<sub>N</sub>) et le rapport d'efficacité nutritionnelle (REN), sont calculés selon les formules suivantes :

$$\text{CUD}_N (\%) = [(\text{N ingéré} - \text{N fèces}) / \text{N ingéré}] \times 100$$

$$\text{BA} (\%) = [(\text{N ingéré} - (\text{N urines} + \text{N fèces})) / \text{N ingéré}] \times 100$$

$$\text{REN} = \text{Gain de poids (g)} / \text{Nourriture consommée pour obtenir ce gain de poids (g)}$$

### **II.2. Détermination des teneurs en urée**

L'urée est dosée sur les urines par une méthode enzymatique utilisant une uréase qui transforme l'urée en carbonate d'ammonium (Kit Sera Pak, Miles, Milan, Italie).

### **II.3. Détermination des teneurs en créatinine**

La créatinine est dosée sur les urines par la méthode de Jaffé basée sur la réaction de l'acide picrique avec la créatinine en milieu basique (HUDSEN et RAPOPORT, 1968) (Kit Boehringer, Mannheim, Allemagne).

#### **II.4. Détermination des teneurs en lipides**

Les lipides des régimes et des fèces sont extraits par un mélange chloroforme : méthanol (2 :1/ v : v) selon la méthode de FOLCH et al. (1957). Après évaporation totale du chloroforme, l'extrait lipidique (lipides totaux) est pesé plusieurs fois, jusqu'à poids constant. Entre chaque pesée, l'extrait lipidique est maintenu sous vide au dessiccateur.

Les coefficients d'utilisation digestive apparente des lipides (CUD<sub>L</sub>) sont déterminés.

$$\text{CUD}_L (\%) = [(\text{Lipides ingérés} - \text{Lipides fécaux}) / \text{lipides ingérés}] \times 100.$$

#### **III. Prélèvements sanguins**

A la naissance (j0), 20 nouveau-nés de chaque lot (témoins et macrosomiques, Isio et Epax) sont décapités et le sang est recueilli par pool de 4 rats du même lot (GARCIA-MOLINA et al., 1996).

A j12, j21 et j51 de la gestation pour les mères et à j30, j60 et j90 de la naissance pour les ratons mâles, 6 rats de chaque lot sont anesthésiés au pentobarbital sodique à 6,5% (0,1 ml par 100g de poids corporel), après 12h de jeûne, et le sang est prélevé par ponction dans l'aorte abdominale. Une quantité de sang prélevé est récupérée dans des tubes à EDTA et l'autre partie est recueillie dans des tubes secs.

Les échantillons prélevés sur tubes EDTA sont centrifugés à 3000 tr/min pendant 15 min. Le plasma est prélevé pour le dosage des vitamines, des taux d'hydroperoxydes et de protéines carbonyles, et la détermination de l'ORAC. Les érythrocytes restants sont lavés avec de l'eau physiologique trois fois de suite, puis sont lysés par addition de l'eau distillée glacée et incubation pendant 15 min dans la glace. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 4000 t/min pendant 15 min. Le lysat est ensuite récupéré afin de doser les enzymes antioxydantes érythrocytaires

Après coagulation du sang prélevé sur tubes secs, et centrifugation 3000 tr/min pendant 15 min, le sérum est récupéré et est conservé avec une solution NaN<sub>3</sub> à 0,2% et de Na<sub>2</sub> EDTA

à 10%, à raison de 10  $\mu\text{l/ml}$ , à  $-20^{\circ}\text{C}$  en vue du dosage des différents paramètres du métabolisme des lipoprotéines et la détermination de la composition en acides gras.

#### **IV. Prélèvements d'organes**

Après le prélèvement sanguin, le foie, le muscle gastrocnémien et le tissu adipeux sont soigneusement prélevés, rincés avec du NaCl à 9%, ensuite pesés. Une partie aliquote des différents organes est immédiatement utilisée pour la détermination des différentes activités enzymatiques. Les restes sont conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ , en vue des dosages lipidiques, protéiques et la détermination de leur composition en acides gras.

#### **V. Analyses biochimiques**

##### **V.1. Dosage de l'insuline (Annexes)**

Le taux d'insuline est déterminé par la méthode de dosage immunoenzymatique en phase solide, ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) kit (Serono Diagnostic, Braintree, MA) utilisant l'insuline de rat comme standard (SIGMA). Le principe de la méthode est basé sur la fixation de l'anticorps anti-insuline non lié à l'insuline de l'échantillon sur le support (mélange antigène-anticorps préalablement déposé dans les puits). Après incubation à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 1 h et lavage, un second anticorps spécifique marqué (anti IgG marqué à la peroxydase) se fixe à son tour sur l'anticorps anti-insuline. Après une deuxième incubation à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 1 h et lavage, seul le marqueur fixé au complexe persiste dans le milieu réactionnel. La coloration du milieu est obtenue par addition d'un colorant orthophénylène-diamine (OPD). La coloration est inversement proportionnelle à la concentration d'insuline de l'échantillon. Cette concentration est déterminée à l'aide d'une gamme étalon d'insuline (préparée à partir d'une solution mère de 1500 ng/ml).

## **V.2. Détermination des paramètres lipidiques et protéiques au niveau du sérum, des lipoprotéines et des organes**

### **V.2.1. Séparation des lipoprotéines**

Les lipoprotéines totales sont isolées à partir du sérum. La densité de ce dernier est ajustée préalablement à 1,21 g/ml par addition de KBr sec, selon la méthode de HAVEL et al. (1955), par ultracentrifugation de flotation à 122,000 x g pendant 48h (ultracentrifugeuse Beckman de type L8-55, rotor 50 Ti, Beckman instruments, Palo Alto, CA, USA). Chaque fraction de lipoprotéines est séparée à partir des lipoprotéines totales (VLDL :  $d < 1,006$  g/ml ; LDL-HDL<sub>1</sub> :  $1,019 < d < 1,06$  g/ml ; HDL<sub>2</sub>-HDL<sub>3</sub> :  $1,063 < d < 1,2$  g/ml) par ultracentrifugation en gradient de densité à 172,000 x g pendant 24h (rotor SW41 Ti), selon la méthode de REDGRAVE et al. (1975) modifiée par MEGHELLI-BOUCHENAK et al. (1989). Ces fractions sont ensuite dessalées par passage sur colonne PD 10, remplie de Sephadex G25M (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden), équilibrée avec un tampon NaCl 150 mmoles/l, 0,04% Na<sub>2</sub> EDTA, pH 7.4.

### **V.2.2. Détermination des teneurs en cholestérol, triglycérides et phospholipides**

Le cholestérol total et les triglycérides sont dosés par des méthodes enzymatiques (Kits Boehringer, Mannheim, Allemagne), sur le sérum total, les différentes fractions lipoprotéiques, et les organes (après broyage d'une partie aliquote dans du tampon phosphate/ EDTA, pH 7,2, ajout de lauryl sulfate de sodium (SDS 1%) (1/1, v/v), et centrifugation à 3000 t/min pendant 10 min).

Les phospholipides sont déterminés à partir du dosage de leur contenu en phosphore par le Kit bioMérieux (sa, Lyon, France) dont le principe est basé sur la mesure de l'absorbance du complexe phosphomolybdique (formé à partir des ions phosphates et du molybdate d'ammonium en milieu acide).

Les lipides totaux des organes sont déterminés par la méthode de FOLCH et al. (1957).

### **V.2.3. Détermination des teneurs en protéines totales et en apoprotéines**

Les protéines totales sont dosées sur les organes (après leur broyage, comme précédemment décrit), par la méthode de LOWRY et al. (1951) utilisant l'albumine sérique bovine comme standard (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA).

Les apoprotéines A1 et B100 sont dosées sur les différentes fractions lipoprotéiques par une méthode turbidimétrique (Kits Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA), dont le principe est basé sur la combinaison des apoprotéines à des anticorps spécifiques présents dans le réactif et qui forment un complexe insoluble induisant une turbidité dans le milieu réactionnel. L'importance de la turbidité ainsi formée est proportionnelle à la concentration des apoprotéines dans l'échantillon.

### **V.2.4. Extraction des lipides du sérum et du foie**

L'extraction lipidique se fait à partir :

- Du sérum par un mélange méthanol/chloroforme/NaCl (2M) (1 /1/0,9 ; v /v/v) pour 0,5 ml d'échantillon, selon la méthode de BLIGH et DYER (1959).
- Du foie par la méthode de FOLCH et al. (1957) après le broyage d'une partie aliquote de l'organe (300 mg) dans 1 ml de NaCl (2M) par l'ultraturax (Bioblock scientific, III Kirch, France).

Une quantité déterminée (30  $\mu$ l) d'étalon interne (acide heptadécanoïque 17 :0, C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>) dilué dans du benzène à 2mg/ml est ajoutée. Après mélange au vortex, deux phases se forment, la phase inférieure est récupérée et séchée sous azote.

### **V.3. Analyse de la composition en acides gras du sérum et du foie**

Après extraction, les acides gras sont :

- Saponifiés avec 1ml de NaOH méthalonique 0.5N, mélangés au vortex et chauffés à 80°C pendant 15 min. La réaction est arrêtée par un choc thermique en mettant les tubes dans de la glace.



- Méthylés en ajoutant 2 ml de BF<sub>3</sub> méthanol (Bromotrifluorométhanol à 14%) (SLOVER et LANZA, 1979). Après mélange au vortex, les tubes sont fermés sous azote, étuvés à 80°C pendant 20 min. La réaction est par la suite arrêtée par un choc thermique. 2 ml de NaCl saturé (35%) et 2 ml d'hexane sont ensuite ajoutés aux tubes. Après passage au vortex, deux phases se forment. La phase supérieure est prélevée pour l'injection dans le chromatographe.
- Analysés par la CPG (chromatographie en phase gazeuse ; Becker instruments, downers grove, IL) ; la colonne capillaire (Applied Sciences Labs, State college, PA) est en pyrex de 50 m de longueur et 0,3 mm de diamètre interne, remplie avec du carbowax 20m (Spiral-RD, Couternon, France). Le chromatographe est équipé d'un injecteur de type ROS et d'un détecteur à ionisation de flamme relié à un intégrateur- calculateur Enica 21 (DELSI instruments, Suresnes, France). L'identification des acides gras est réalisée par comparaison de leur temps de rétention avec ceux des standards d'acides gras (Nucheck-prep, Elysiam, MN, USA). La surface des pics d'acides gras est proportionnelle à leur quantité ; elle est calculée à l'aide d'un intégrateur.

## **VI. Dosage des activités enzymatiques**

### **VI.1. Détermination de l'activité de la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT, EC 2.3.1.43)**

L'activité de la LCAT est déterminée sur du sérum frais, par conversion du <sup>3</sup>H cholestérol en <sup>3</sup>H cholestérol estérifié, selon la méthode de GLOMSET et WRIGHT (1964), modifiée par KNIPPING (1986). Les liposomes, substrats exogènes pour la LCAT, sont une émulsion de cholestérol et de lécithines. La LCAT sérique permet le transfert d'un acide gras de la position 2 de la lécithine sur le 3-β-OH du cholestérol, formant le cholestérol estérifié et la lysolécithine. 2mg de cholestérol et 16 mg de lécithines d'œuf (Merck) sont

solubilisés dans un mélange chloroforme/méthanol (Prolabo) (2 :1, v : v). Le mélange est séché sous azote. Après addition de 1ml de solution tampon 10mM tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4 (tampon d'incubation), la solution subit une sonication pendant 30 minutes à 25°C. Pour chaque détermination, 88 nM de liposomes-cholestérol, 7,4 KBq <sup>3</sup>H cholestérol (Amersham, Les Ulis, France) et 0,6 nM d'albumine fraction V (Merck, Darmstadt, Germany) sont mixés et pré incubés avec le tampon à un volume final de 1 ml pendant 1 heure à 37°C. La réaction d'estérification débute par addition de 100µl de sérum (source enzymatique) et 10µl de mercaptoéthanol 1M (Merck). Après 1 heure d'incubation à 37 °C, la réaction est stoppée avec 2 ml de chloroforme/méthanol (2 :1, v : v). Après extraction et séparation des lipides par chromatographie sur couche mince en utilisant le mélange hexane/ éther éthylique/ acide acétique (90/30/1) ml (v/v/v) comme éluant, le comptage de la radioactivité du cholestérol libre et du cholestérol estérifié se fait grâce à un compteur à scintillation (Beckman LS 7500). L'activité de la LCAT est exprimée en nmoles de cholestérol estérifié/h/ml de sérum.

#### **VI.2. Détermination de l'activité des lipoprotéines lipases tissulaires (LPL, EC 3.1.1.34 ; HTGL, EC 3.1.1.3)**

La LPL (enzyme fixée sur la membrane des cellules vasculaires endothéliales) hydrolyse les TG des chylomicrons et des VLDL. La HTGL (liée à l'endothélium vasculaire hépatique) hydrolyse les TG des remnants de chylomicrons, des IDL, des LDL et des HDL. L'activité lipase est déterminée à partir du niveau d'hydrolyse des TG marqués d'un substrat synthétique et par la mesure de la quantité d'AGL marqués libérés, selon la méthode de NILSSON-EHLE et EKMAN (1977). Les homogénats (source lipolytique) sont préparés à partir de 100 mg de tissu (foie, muscle, tissu adipeux) selon la technique de TAVANGAR et al. (1992). L'incubation de ces homogénats avec le substrat se fait en présence d'activateur (apo C-II); seulement pour la LPL des tissus extra-hépatiques (tissu

adipeux, muscle). En effet, la lipase hépatique (HTGL) ne requiert pas la présence d'apo C-II comme activateur. Le substrat synthétique est une émulsion de trioléine froide (7 mg), de trioléine marquée ( $9, 10^{-3}\text{H}$ ; 5,4  $\mu\text{Ci}$  ou 199 KBq) et de lysophosphatidylcholine (0,3 mg) solubilisées dans 2,4 ml de tampon tris HCl 0,2 M pH 8. Après sonication (3 fois 45 minutes), 300 $\mu\text{l}$  d'une solution de sérum albumine bovine (à 4% dans du tampon tris/HCl) et 300  $\mu\text{l}$  de sérum humain chauffé à 56°C (source d'apo C-II seulement pour la LPL) sont ajoutés. 100 $\mu\text{l}$  d'homogénats tissulaires sont incubés avec 100 $\mu\text{l}$  de substrat synthétique, pendant 1h, à 30°C sous agitation permanente. La réaction est stoppée par addition de 3,25 ml de tampon d'extraction (chloroforme : heptane : méthanol, 1,25 : 1 : 1,41, v : v : v) et 1 ml de tampon tétraborate (30,55 de tétraborate K et 13,82g de carbonate K/L H<sub>2</sub>O, pH 10,5). L'extraction des AGL se fait à la suite d'une forte agitation suivie d'une centrifugation pendant 20 minutes à 600 x g. Après addition du scintillant, la mesure de la radioactivité portée par les AGL permet de déterminer l'activité lipolytique, exprimée en nmoles AG libérés/min/g de tissu.

### **VI.3. Détermination de l'activité de l'hydroxy méthyl glutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase (EC 1.1.1.34)**

La HMG-CoA réductase permet la synthèse de l'acide mévalonique par réduction du HMG-CoA, première étape dans la synthèse du cholestérol. L'activité de la HMG-CoA réductase est déterminée à partir de microsomes hépatiques, selon la méthode de PHILLIP et SHAPIRO (1979), basée sur la transformation du HMG-CoA (substrat de la HMG-CoA réductase) en mévalonate (produit de la réaction enzymatique). L'activité totale de l'enzyme est mesurée sur des suspensions microsomaux d'un homogénat de foie, préparées selon la technique de AL-SHURBAJI et al. (1991). La forme active étant la forme déphosphorylée, l'activité est donc mesurée après un traitement préliminaire des microsomes avec une phosphatase. Le milieu réactionnel contient 200 $\mu\text{l}$  de suspensions

microsomales (0,5 à 1 mg de protéines microsomales), 55 µl de tampon tris/HCl pH 7,4, 15 µl de la HMG-CoA froid (1,6 µmoles/ml), 20 µl de <sup>14</sup>C-HMG-CoA (2 µCi/ml ou 74 KBq) et 30 µl de NADPH (23,3 mg/ml). L'incubation dure 20 minutes à 37°C sous agitation. Après réaction, l'acide mévalonique est transformé en mévalonolactone en milieu acide (addition de 50 µl de HCl 5N). La séparation du <sup>14</sup>C HMG-CoA non transformé et du <sup>14</sup>C mévalonolactone produit par la réaction enzymatique est réalisée par chromatographie sur couches minces (gel de silice, Kieselgel G60, Merck). Afin d'évaluer les pertes possibles lors de la migration, un marqueur interne, marqué au tritium, le <sup>3</sup>H mévalonolactone, est utilisé. Le comptage de la radioactivité à la fin de la manipulation est double <sup>14</sup>C et <sup>3</sup>H. L'activité HMG-CoA réductase est exprimée en pmoles de <sup>14</sup>C mévalonolactone formé /min/mg de protéines microsomales. Le dosage des protéines au niveau des microsomes se fait par la méthode de LOWRY et al. (1951).

#### **VI.4. Détermination de l'activité de la 7α hydroxylase (EC 1.14.13.17)**

La 7α hydroxylase permet la formation du 7α hydroxycholestérol à partir du cholestérol, étape initiale dans la transformation du cholestérol en acides biliaires. Le dosage de l'activité de la 7α hydroxylase est réalisé sur des microsomes hépatiques, selon une méthode radioisotopique en utilisant du cholestérol <sup>14</sup>C, méthode décrite par JELINEK et al. (1990). 100 µl de solution microsomale (préparée selon AL-SHUBAJI et al., 1991) sont mises à incuber avec 5 à 10 µg de <sup>14</sup>C cholestérol (6 µCi/ml ou 231 KBq), 50 mM tris acétate, pH 7,5, 20% glycérol, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,06% triton X-100, 2 mM NADPH et 1000 U de NADPH réductase, dans un volume de 0,5 ml. L'incubation dure 20 minutes à 37°C sous agitation à l'abri de la lumière. La réaction est arrêtée en ajoutant 7,5 ml du mélange dichlorométhane : éthanol (5 : 1, v : v). La phase organique (inférieure) est recueillie, évaporée sous vide et séchée à 40°C, puis reprise dans 300 µl de dichlorométhane. La séparation du 7α hydroxycholestérol et du cholestérol restant non

mesurée sur les esters de cholestérol permet de déterminer l'activité ACAT. L'activité ACAT est exprimée en pmoles de cholestérol estérifié/min/mg de protéines microsomales.

## **VII. Détermination du statut oxydant/antioxydant**

### **VII.1. Dosage des vitamines**

#### **VII.1. 1. Dosage des vitamines A et E**

Les vitamines A (rétinol) et E ( $\alpha$  tocophérol) sériques, sont analysées sur le plasma des différents groupes de rats par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse selon la méthode de ZAMAN et al. (1993). Cette méthode permet une analyse quantitative basée sur le fait que l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration des vitamines A ou E présente dans le sérum, par comparaison au pic de l'étalon interne, Tocol (Lara Spiral, Couternon, France), introduit dans l'échantillon avant l'injection dans le chromatographe.

La phase stationnaire inverse est composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 18 atomes de carbones (colonne C18; HP ODS Hypersil C18 ; 200 mm x 4,6 mm; Lara Spiral, maintenance temperature of analytical column, 35°C). La phase mobile est constituée par le mélange méthanol/eau (98/2, V/V), délivrée à un débit constant, 1ml/min grâce à une pompe (Waters 501 HPLC Pomp).

Après précipitation des protéines par l'éthanol et addition de l'étalon interne (5 $\mu$ g de tocol pour 200 $\mu$ l de plasma), les vitamines A et E, sont extraites du plasma par 2ml d'hexane. La phase supérieure est reprise soigneusement et est évaporée sous vide. Le résidu est repris dans 50  $\mu$ l de diethyl éther, et complété avec 150  $\mu$ l de la phase mobile méthanol/eau (95/5 ; v/v). Les dosages des vitamines A et E sont réalisés par HPLC équipé d'un détecteur à absorption UV qui permet de détecter le pic correspondant à la vitamine E à 292nm et celui de la vitamine A à 325nm.

## VII.1. 2. Dosage de la vitamine C

La vitamine C plasmatique est dosée selon la méthode de ROE et KUETHER (1943) utilisant le réactif de coloration, le Dinitrophenylhydrazine- Thiourée- Cuivre (DTC) et une gamme étalon d'acide ascorbique.

Après précipitation des protéines plasmatiques par l'acide trichloroacétique (10%) et centrifugation ; 500 µl de surnageant sont mélangés à 100µl de réactif de DTC (acide sulfurique 9 N, contenant 2,4-dinitrophenylhydrazine à 3%, le thiourée à 0,4% et du sulfate de cuivre à 0,05%) et incubés pendant 3 heures à 37°C. La réaction est stoppée par addition de 750µl d'acide sulfurique à 65% (v/v), et la lecture de l'absorbance se fait à 520 nm. L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la concentration en vitamine C présente dans l'échantillon. La concentration est déterminée à partir de la courbe étalon obtenue grâce à une solution d'acide ascorbique.

## VII.2. Détermination du pouvoir antioxydant total du plasma (ORAC)

Le pouvoir antioxydant total du plasma, c'est à dire sa capacité à absorber les radicaux oxygènes libres (ORAC) est déterminé par spectrofluorométrie selon la méthode de CAO et al. (1993). L'allophycocyanine (APC) une protéine fluorescente présente dans les cyanobactéries (bactéries photosynthétiques contenant, outre de la chlorophylle, différents pigments) et les algues rouges, est utilisée (COURDEROT-MASUYER et al., 2000). Cette protéine perd sa fluorescence lorsqu'elle est agressée par des radicaux libres. Cette sonde est très sensible aux radicaux hydroxyles qui sont générés par  $H_2O_2$  et  $Cu^{2+}$  dans le milieu d'incubation. L'ORAC est alors la capacité du plasma à neutraliser les radicaux libres, donc à freiner la perte de fluorescence de l'APC.

Le milieu réactionnel (2 ml) contient 37.5 nmol/l d'APC, 9 µmol/l de  $CuSO_4$  et 0,3% d' $H_2O_2$ , dans du tampon phosphate 75 mmol/l, pH = 7. Ce milieu correspond au blanc de la réaction.

20µl de plasma ou de Trolox à 1 µmol/l ( $C_{14}H_{18}O_4$  : analogue de la vitamine E, 1 µM) sont ajoutés au milieu réactionnel qui correspond dans ce cas à l'essai ou au standard, respectivement.

La fluorescence de l'APC à l'émission 651 nm et à l'excitation 598 nm, est mesurée toutes les 5 minutes à 37°C jusqu'à disparition totale de la fluorescence (pratiquement 1 heure après) par un spectrofluorimètre (SFM25 Kontran Instrument). On obtient des courbes cinétiques de la perte de fluorescence de chaque échantillon par rapport aux courbes blanc du milieu réactionnel et Trolox du milieu de référence.

L'utilisation du Trolox sert à protéger cette sonde. Ainsi la courbe de dégradation de la sonde (émission de fluorescence) en fonction du temps sera moins rapide donc décalée par rapport à celle du blanc. Ainsi une unité ORAC correspond à ce décalage, soit donc à la surface de l'aire sous la courbe de la perte de fluorescence en présence du Trolox moins celle du blanc.

La courbe de décroissance en présence du plasma permet de déterminer le pouvoir antioxydant (donc protecteur) total du plasma, et sera mentionné en unité ORAC.

L'ORAC de chaque échantillon de plasma est calculé en mesurant la surface S de protection nette sous les courbes cinétiques de la perte de fluorescence de l'APC.

Ainsi :  $ORAC \text{ échantillon} = (S \text{ échantillon} - S \text{ blanc}) / (S \text{ trolox} - S \text{ blanc})$

Où S = Aire calculé entre la courbe de perte de fluorescence et l'axe des temps.

L'ORAC de chaque échantillon est ainsi calculé par rapport à l'ORAC du Trolox de référence. (ORAC trolox = 1).

### **VII.3. Détermination du taux d'hydroperoxydes**

Les hydroperoxydes plasmatiques sont mesurés par l'oxydation d'ions ferriques utilisant le xylénol orange (Fox2 ; kit Peroxoquant méthanol- compatible formulation, Rockford, IL, USA) en conjugaison avec le ROOH réducteur spécifique de la triphenylphosphine (TPP),

selon la méthode de NOUROOZ-ZADEH et al. (1996). Cette méthode est basée sur une peroxydation rapide transformant le  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$  en milieu acide. Les ions  $\text{Fe}^{3+}$  en présence du xylénol orange [(O-cresolsulfonphtalein-3',3''-bis (methyliminodiacetic acid sodium))], forment un complexe  $\text{Fe}^{3+}$ -xylénol orange.

90  $\mu\text{l}$  de plasma sont incubés à température ambiante pendant 30 min avec 10  $\mu\text{l}$  de méthanol (pour l'essai), ou 10  $\mu\text{l}$  de triphenylphosphine (TPP) (pour le blanc). A ce mélange sont ajoutés 900  $\mu\text{l}$  de réactif Fox (contenant 250 mmol/l de sulfate d'ammonium ferrique, 25 mmol/l de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 4 mmol/l de BHT et 100  $\mu\text{mol}$  de xylénol orange). Après incubation pendant 30 min et centrifugation à 6000 t/min pendant 10 min, la lecture se fait à 560 nm.

Le taux d'hydroperoxydes plasmatique correspond à la différence entre l'absorbance du plasma et l'absorbance du blanc.

#### **VII.4. Détermination des protéines carbonylées**

Les protéines carbonylées du plasma (marqueurs de l'oxydation protéique) sont mesurées par la réaction au 2,4- dinitrophénylhydrazine selon la méthode de LEVINE et al. (1990).

50  $\mu\text{l}$  de plasma sont incubés 1h à température ambiante avec 1 ml de dinitrophénylhydrazine (DNPH) à 2 g/l dans 2 mol/l de HCl ou avec seulement 1 ml de HCl à 2 mol/l pour le blanc. Ensuite, les protéines sont précipitées avec 200  $\mu\text{l}$  d'acide trichloroacétique à 500 g/l (TCA) et lavées 3 fois par l'éthanol: éthylacétate 1:1 (v/v) et 3 fois par le TCA à 100g/l.

Le culot est solubilisé dans 6 mol/l de guanidine.

Les lectures se font à 350, 360 et 375nm. La concentration des groupements carbonylés est calculée selon un coefficient d'extinction de 21,5 (mmol/l).  $\text{cm}^{-1}$ .



## **VII.5. Détermination de l'activité des enzymes antioxydantes des érythrocytes**

Afin de doser ces enzymes le lysat érythrocytaire est préparé à partir du culot des globules rouges comme précédemment décrit (p 33).

### **VII.5.1. Dosage de l'activité de la catalase (CAT ; EC 1.11.1.6)**

Cette activité enzymatique est mesurée par analyse spectrophotométrique du taux de la décomposition du peroxyde d'hydrogène (AEBI, 1974). En présence de la catalase, la décomposition du peroxyde d'hydrogène conduit à une diminution de l'absorption de la solution de  $H_2O_2$  en fonction du temps. Le milieu réactionnel contient 1ml de surnageant (lysate dilué au 1/500), 1 ml d' $H_2O_2$ , et 1ml de tampon phosphate (50mmol/l, pH 7,0). Après incubation de 5 min, 1 ml de réactif  $TiOSO_4$  (1,7 g dans 500 ml d' $H_2SO_4$  2N) est ajouté. La lecture se fait à 420 nm. Les concentrations du  $H_2O_2$  restant sont déterminées à partir d'une gamme étalon de  $H_2O_2$  avec le tampon phosphate et le réactif  $TiOSO_4$  de façon à obtenir dans le milieu réactionnel des concentrations de 0,5 à 2 mmol/l.

Le calcul d'une unité d'activité enzymatique est :

$$A = \log A_1 - \log A_2.$$

$A_1$  est la concentration de  $H_2O_2$  de départ

$A_2$  est la concentration de  $H_2O_2$  après incubation (au bout de 5 min)

L'activité spécifique est exprimée en U/g Hb.

### **VII.5.2. Dosage de l'activité de la Glutathion peroxydase (GSH-Px ; EC 1.11.1.9)**

L'activité enzymatique est estimée par la méthode de PAGLIA et VALENTINE (1967) modifiée par LAWRENCE et BURK (1976). Le principe de cette méthode est de mesurer la capacité d'une solution à catalyser l'oxydation du glutathion réduit par l' $H_2O_2$ . Pour cela, on utilise le recyclage du glutathion par la glutathion réductase. L'oxydation du NADPH qui lui est couplé, est utilisée pour suivre la réaction. La vitesse de formation du

GSH est donc mesurée en suivant la diminution de l'absorbance à 340 nm liée à la conversion du NADPH en NADP<sup>+</sup>.

Le milieu réactionnel contient 10µl de lysat, 150µl de réactif contenant dans 1 ml de tampon phosphate à 50 mM, pH 7,0 (0,3 mg de glutathion réduit, 1µl de glutathion réductase à 1 U/l et 0,26 mg de NADPH) et 10 µl de cumène à 1,5 mM. La lecture se fait à 340 nm toutes les 30 sec pendant 10 min.

Une gamme d'activité est nécessaire avec une enzyme d'activité connue. Pour la Glutathion réductase (100U/ 0,22 ml), 6,6 µl de la solution mère sont prélevés et mis dans 3 ml d'eau distillée, soit une solution de 1U/ml. Des dilutions de 1/2 = 500 U/l à 1/64= 15,63 U/l sont effectuées.

Une unité de glutathion peroxydase est égale à 1µM de NADPH oxydé par min et par mg de protéine.

#### **VII.5.3. Dosage de l'activité de la Glutathion réductase (GSSG-Red ; EC 1.6.4.2)**

Cette activité enzymatique est déterminée par la mesure du taux de l'oxydation du NADPH en présence du glutathion oxydé (GOLDBERG et SPOONER, 1992).

Le milieu réactionnel contient 13,5 ml de tampon phosphate (0,12 mol/l, pH 7,2 + EDTA 1 mol/l), 0,5 ml de FAD (155µmol/l), 0,5 ml de glutathion oxydé (40 mg/ml), 0,5 ml de DTNB (colorant), 10µl d'échantillon (lysat), et au bout de 5 min d'incubation, 10 µl de NADPH (9,6 mmol/l de Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> à 1%) sont ajoutés au mélange.

L'activité de la glutathion réductase est déterminée en suivant l'oxydation du NADPH et donc par conséquent la disparition du NADPH du milieu réactionnel. Par action de la glutathion réductase et en présence du NADPH, le glutathion oxydé GSSG est réduit en GSH.

La gamme d'activité est celle de la Glut réductase (100U/ 0,22 ml), à partir des dilutions de 1/2 = 500 U/l à 1/64= 15,63 U/l.

La lecture de la densité optique (qui régresse) se fait à 340 nm toutes les 30 sec. L'activité enzymatique est exprimée en unité. Une unité de l'activité de la glutathion réductase est définie comme le taux d'enzyme capable d'oxyder 1mM de NADPH oxydé par min.

#### **VII.5.4. Dosage de l'activité de la Superoxyde dismutase (SOD ; EC 1.15.1.1)**

L'activité de cette enzyme est mesurée selon la méthode de ELSTNER et al. (1983). Le principe est basé sur la réaction chimique qui génère l'ion superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ) à partir de l'oxygène moléculaire en présence d'EDTA, de  $MnCl_2$  et du mercaptoéthanol.

L'oxydation du NADPH est liée à la disponibilité des ions superoxyde dans le milieu. Dès que la SOD est ajoutée dans le milieu réactionnel, elle entraîne l'inhibition de l'oxydation du NADPH.

400  $\mu$ l de réactif (éthanol/ chloroforme ; 62,5/ 37,5 ; v/v) sont ajoutés à 250  $\mu$ l de lysat afin de précipiter les protéines. Après centrifugation à 4000 t/min pendant 5 min, le surnageant est récupéré.

Le milieu réactionnel contient 5 $\mu$ l de lysat, 10 $\mu$ l de tampon et 100  $\mu$ l de réactif 1 (contenant 5 ml de tampon phosphate (0,2 mol/l, pH 7,8), 1 ml d'hydroxylamine chloride (0,69 mg/ml), 1 ml d'antraquinone (0,132 mg/ml) et 1 ml de diaphorase (1mg/ml d'une solution de 15 U/ml)). Le mélange est ensuite incubé avec 10  $\mu$ l de NADPH pendant 15 min à température ambiante. Puis 100  $\mu$ l de réactif 2 (contenant 6 ml de sulfanilamide à 10 mg/ml d'HCl à 25% et 6 ml de naphthylethylène diamine à 0,2 mg/ml) sont ajoutés. La lecture se fait à 540 nm, après incubation de 20 min.

La gamme d'activité est réalisée avec la SOD étalon.

**VIII. Analyse statistique** Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard. Après analyse de la variance, la comparaison des moyenne est réalisée par :

1- Le test de rang multiple DUNCAN (1955) pour les paramètres variants en fonction de l'âge.

2- Le test « t » de student pour les différents groupes :

\* Effet diabète : Diabétiques Isio versus Témoins Isio

Diabétiques Epax versus Témoins Epax

§ Effet régime : Témoins Epax versus Témoins Isio

Diabétiques Epax versus Diabétiques Isio

Cette analyse est réalisée grâce à un logiciel STATISTICA, version 4.1 (STATSOFT, TULSA, OK)

Les différences sont considérées significatives à \*, §  $P < 0,05$  et hautement significatives à \*\*, §§  $P < 0,01$ .

## **RESULTATS ET INTERPRETATIONS**

## **Bilans nutritionnels**

## **I. Poids corporel et bilans nutritionnels**

### **I. 1. Evolution du Poids corporel**

Le poids corporel des nouveau-nés macrosomiques à la naissance (J0) et jusqu'à l'âge adulte (j30, j60 et j90) est significativement plus élevé que celui des nouveau-nés témoins quelque soit le régime des mères. Cette élévation varie respectivement à j0, j30 et j90 de 70%, 28% et 18% pour le régime Isio et de 30%, 30%, 18% pour le régime Epax. Cependant les rats dont les mères étaient nourries avec le régime Epax présentent une diminution du poids (allant de -23 à -9% ; de j0 à j90) par rapport aux nouveau-nés macrosomiques dont les mères étaient nourries avec le régime Isio (fig5).

### **I. 2. Bilans nutritionnels**

#### **I. 2. 1. Consommation alimentaire, apport énergétique et rapport d'efficacité nutritionnelle (REN) (fig 6)**

La consommation alimentaire quotidienne (exprimée en g/j/100 de poids corporel) diminue avec l'âge des animaux. De BI à BIV, la consommation alimentaire diminue d'environ -25% chez tous les groupes de rats (témoins et obèses, Isio et Epax). En outre, la nourriture ingérée est similaire chez les rats macrosomiques et témoins quelque soit le régime.

Quand à l'apport énergétique, aucune différence n'est notée entre les différents groupes quelque soit le type de régime.

Le rapport d'efficacité nutritionnelle diminue avec l'âge des animaux de BII à BIV. Cependant ce rapport augmente significativement chez les obèses Isio par rapport à leurs témoins aux 4 bilans, alors que cette élévation n'est notée chez les obèses Epax qu'aux bilans II et IV. Pour les bilans I, II et III, une diminution significative est notée chez les obèses Epax par rapport aux obèses Isio.

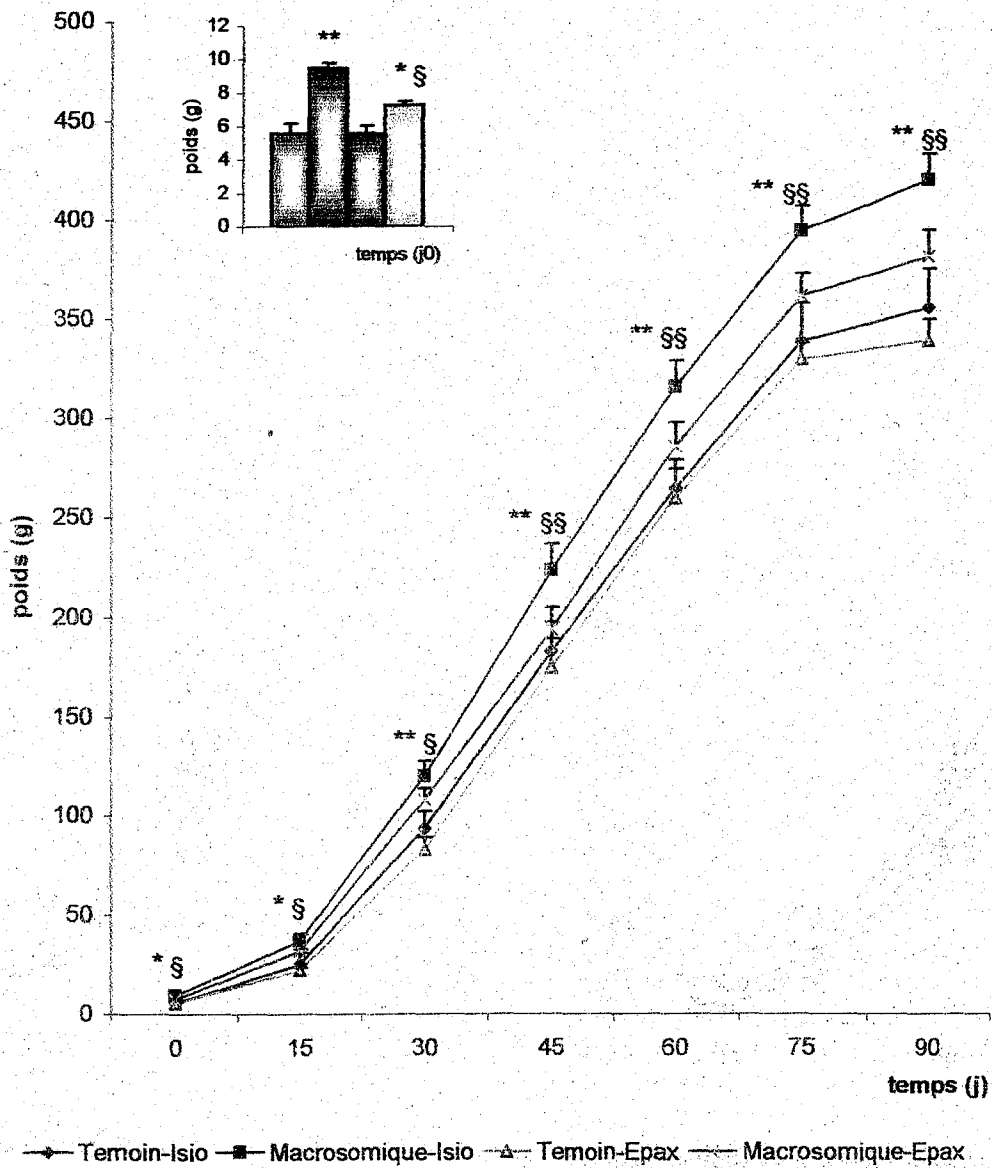


Fig : Evolution du poids corporel (g) chez les rats témoins et macrosomiques de la naissance à l'âge adulte (3 mois)

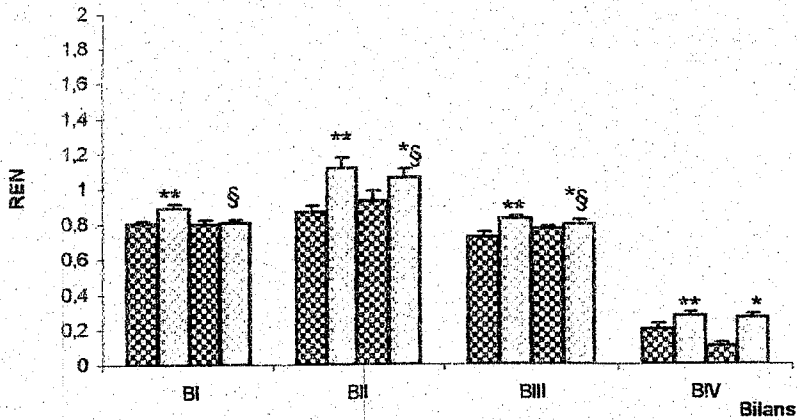
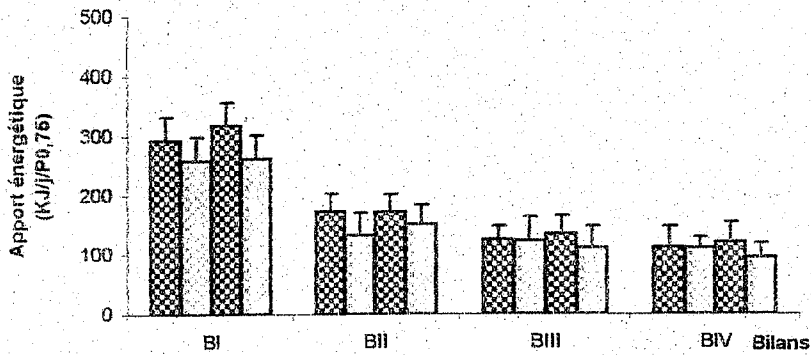
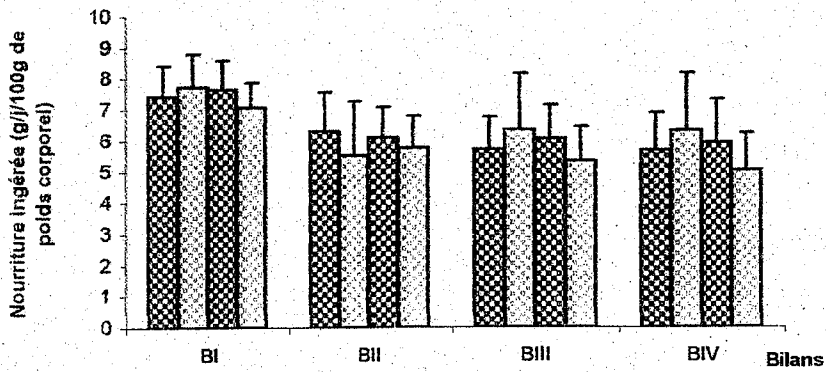
Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=8 rats

La comparaison des moyennes est réalisée par l'ANOVA II

\*P 0,05; \*\*P 0,01 Différence significative témoins versus obèses pour chaque régime

§P 0,05; §§P 0,01 Différence significative régime Isio versus régime Epax





Témoins-Isio  
 obèses-Isio  
 Témoins-Epax  
 obèses-Epax

Fig. 4 : Effet du régime EPAX sur l'apport énergétique, la nourriture ingérée et le rapport d'efficacité nutritionnelle (REN) au cours des bilans nutritionnels. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=8 BI: 30<sup>ème</sup>-37<sup>ème</sup> j; BII: 53<sup>ème</sup>-60<sup>ème</sup>, BIII: 60<sup>ème</sup>-67<sup>ème</sup> j, BIV: 83<sup>ème</sup>-90<sup>ème</sup> j de l'expérimentation. La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student

\* (P<0.05) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

### **I. 2. 2. Azote ingéré et excrété (fig 7)**

▪ **Azote ingéré** Une diminution progressive de l'azote ingéré (exprimé en mg/j/ 100g de poids corporel) est notée avec l'âge des animaux (de B I à BIV). Cependant aucune différence n'est notée chez les rats macrosomiques Isio et Epax comparés à leurs témoins, et le régime Epax n'entraîne également aucune différence par rapport au régime Isio. Cette évolution est corrélée à la nourriture ingérée puisque le taux de protéines dans les deux régimes est identique.

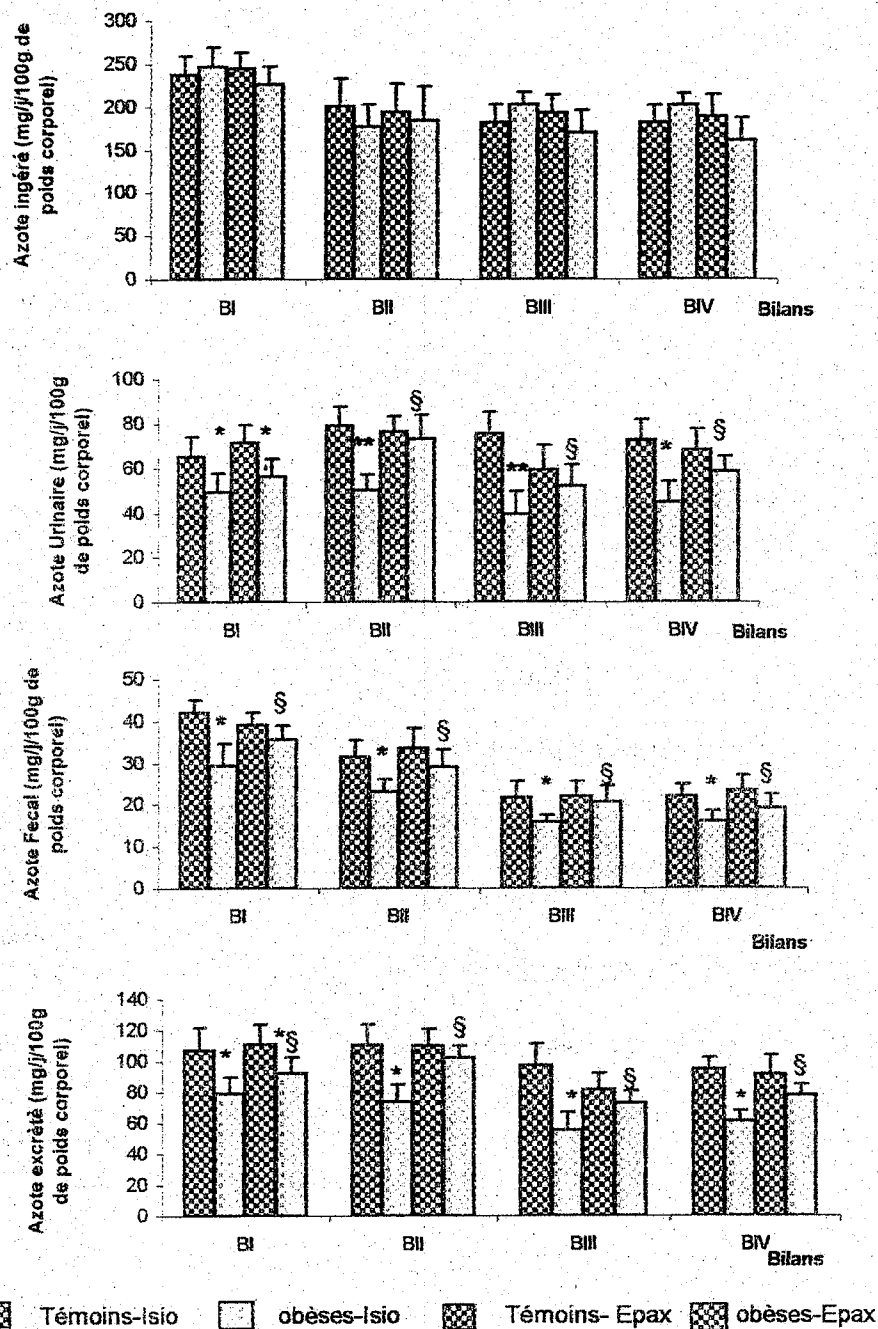
▪ **Azote excrété** L'azote urinaire diminue (de -20 à -50%) chez les rats macrosomiques Isio comparés à leurs témoins aux quatre bilans. Par contre, aucune différence significative n'est observée entre les rats macrosomiques Epax et leurs témoins, à l'exception du bilan I où une diminution est notée. Le régime Epax entraîne une augmentation significative de l'azote urinaire (allant de +30% à +45%) chez les rats macrosomiques par rapport au régime Isio de B II à BIV.

L'évolution de l'azote fécal est similaire à celle de l'azote urinaire pour les différents groupes de rats, sauf que le régime Epax entraîne une augmentation significative de l'azote fécal par rapport au régime Isio chez les rats macrosomiques de BI jusqu'au BIV.

L'azote excrété étant directement corrélé à l'azote urinaire et fécal, les variations notées pour ce paramètre, sont identiques aux deux premiers.

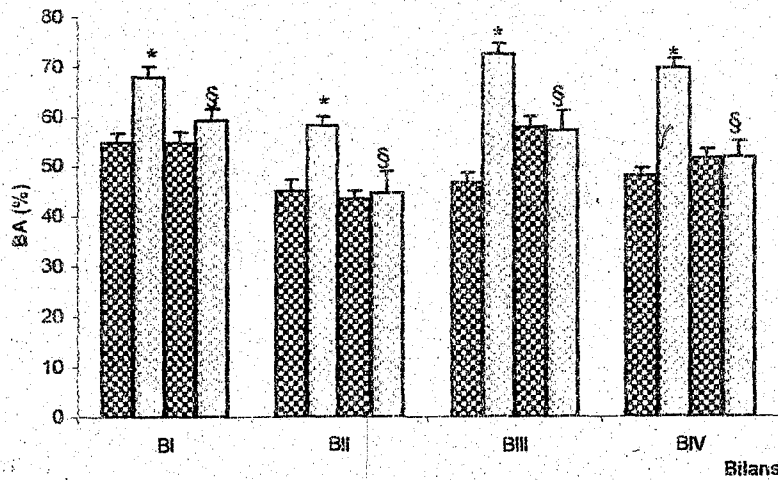
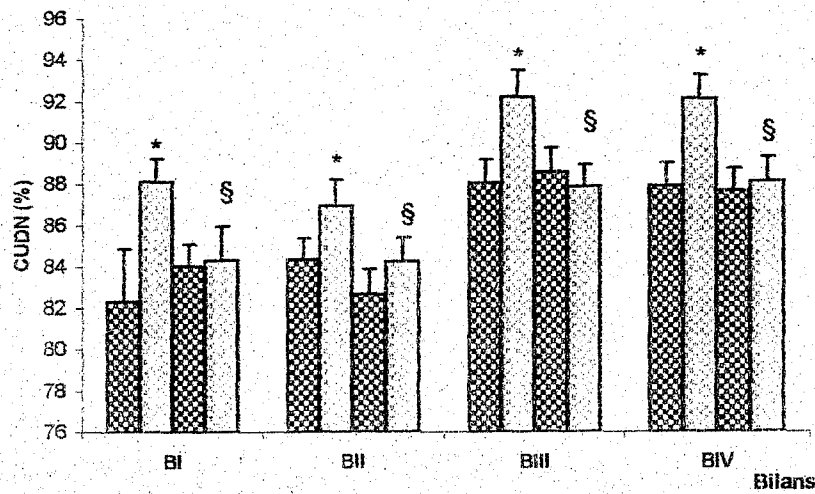
### **I.2.3 Coefficient d'utilisation digestive apparente de l'azote (CUD)<sub>N</sub>, bilan azoté (BA) (fig 8).**

Aux bilans BI, BII, BIII et BIV, les CUD<sub>N</sub> et les BA sont élevés en moyenne de 5% et de 30% respectivement, chez les rats macrosomiques Isio comparés à leurs témoins. Par contre le régime Epax n'entraîne aucune différence chez les rats macrosomiques par rapport à leurs témoins ; cependant une diminution des CUD<sub>N</sub> et des BA est notée chez les



**Fig :** Effet du régime EPAX sur l'azote ingéré, urinaire, fécal, et excrété, Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=8 BI: 30<sup>ème</sup>-37<sup>ème</sup> j; BII: 53<sup>ème</sup>-60<sup>ème</sup>, BIII: 60<sup>ème</sup>-67<sup>ème</sup> j, BIV: 83<sup>ème</sup>-90<sup>ème</sup> j de l'expérimentation, La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student

\* (P<0.05) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX



Témoins-Isio  
  obèses-Isio  
  Témoins-Epax  
  obèses-Epax

**Fig 1** : Effet du régime EPAX sur le coefficient d'utilisation digestive apparente de l'azote (CUDN) et le Bilan azoté (BA)

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=8 BI: 30<sup>ème</sup>-37<sup>ème</sup> j, BII: 53<sup>ème</sup>-60<sup>ème</sup>, BIII: 60<sup>ème</sup>-67<sup>ème</sup> j, BIV: 83<sup>ème</sup>-90<sup>ème</sup> j de l'expérimentation,

La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student

\* (P<0.05) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime

§ (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

macrosomiques Epax par rapport aux macrosomiques Isio, elle est de -4% pour les CUD<sub>N</sub> et de -12% à -25% pour les BA, de BI à BIV.

#### **I.2.4 Lipides ingérés et excrétés et coefficient d'utilisation digestive apparente de lipides (CUD)<sub>L</sub> (fig 9).**

Les quantités de lipides ingérés par les rats obèses recevant le régime ISIO ou EPAX (mg/j/100g de poids corporel) sont semblables à ceux des rats témoins recevant les mêmes régimes aux quatre bilans.

Aux bilans BI, B II, B III et BIV, l'excrétion fécale des lipides (mg/j/100g de poids corporel) est significativement diminuée (-28% à -50%) chez les rats obèses consommant le régime ISIO comparés à leurs témoins.

La même variation est notée chez les rats obèses EPAX (-35% à -40%), sauf au bilan BI, où la quantité de lipides fécaux est similaire à celle des témoins.

Ainsi les CUD<sub>L</sub> chez les rats obèses sont plus élevés que ceux de leurs témoins aux quatre bilans pour le régime Isio et au bilans II, III, et IV pour le régime Epax. Cependant, une diminution significative est notée chez les rats macrosomiques Epax par rapport aux rats macrosomiques Isio aux bilans I, III et IV.

#### **I.2.5 teneurs en urée et en créatinine (fig 10)**

Les teneurs en urée au niveau des urines sont significativement diminuées chez les rats obèses recevant le régime Isio par rapport à leur témoins aux bilans II, III et IV. Comparés à leurs témoins, les rats obèses recevant le régime Epax ne présentent aucune variation de l'urée. Cependant, cette dernière augmente chez ces rats comparés aux rats obèses recevant le régime Isio, aux bilans III et IV.

Aucune différence n'est notée pour la créatinine urinaire chez tous les groupes de rats.

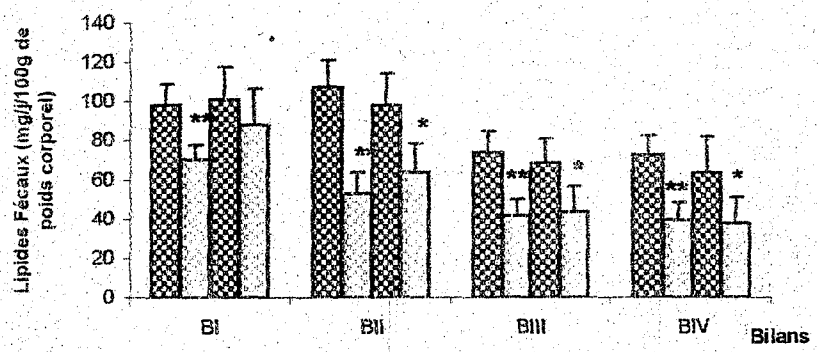
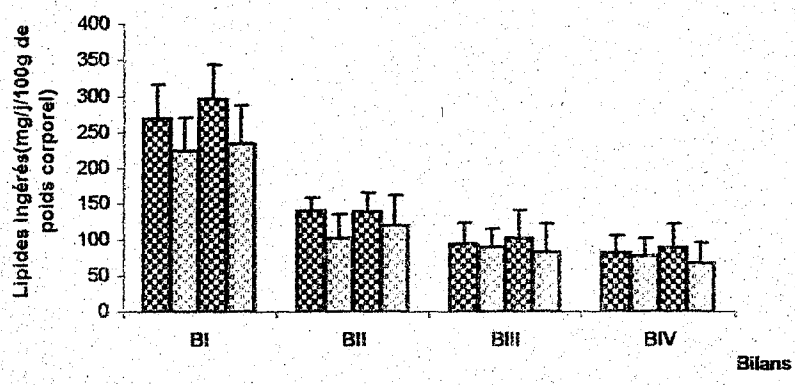
## **II Evolution de la glycémie et de l'insulinémie**

L'injection de la STZ au 5<sup>ème</sup> jour de la gestation entraîne une augmentation significative de la glycémie au 20<sup>ème</sup> jour de la gestation ( $15.20 \pm 2.10\text{mM}$ ) par rapport aux mères

témoins ( $4.89 \pm 0.21\text{mM}$ ), alors que le régime Epax diminue significativement la glycémie chez les mères gestantes diabétiques ( $8.80 \pm 0.21\text{mM}$ ).

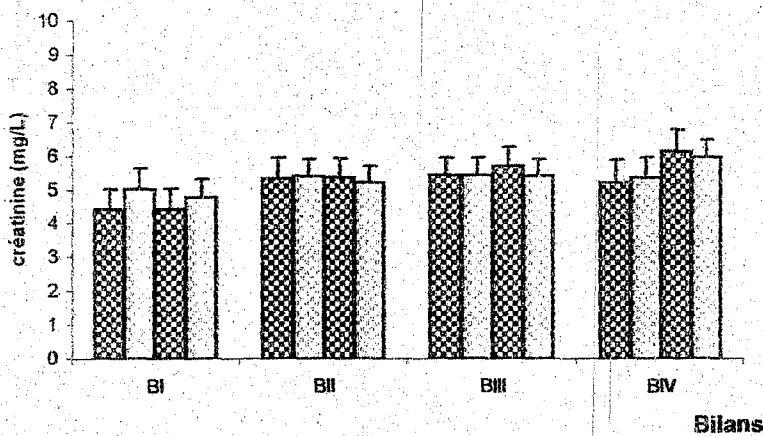
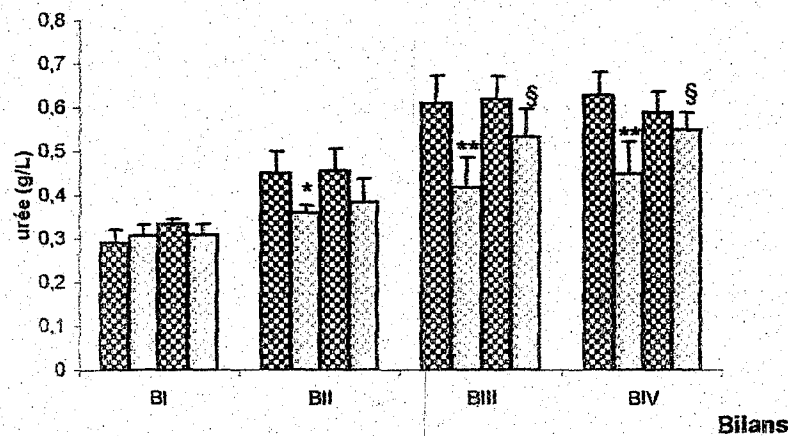
A la naissance, et après la sélection des nouveaux nés obèses, ces derniers sont hyperglycémiques et hyperinsulinémiques comparés aux rats témoins, ces élévations sont maintenues jusqu'à l'âge adulte (fig 11).

La glycémie et l'insulinémie augmentent chez les rats témoins et obèses au cours du temps. Le régime Epax n'influence pas les teneurs sériques en insuline et en glucose durant les premiers mois de la vie postnatale. Cependant, l'Epax entraîne chez les rats obèses une diminution significative, de la glycémie à j60 et j90 (-15% et -18 % respectivement), et de l'insulinémie à J90 (-26%).



Témoins-Isio  
  obèses-Isio  
  Témoins-Epax  
  obèses-Epax

**Fig .** Effet du régime EPAX sur les lipides ingérés, lipides fécaux et le coefficient d'utilisation digestive apparente des lipides (CUD<sub>L</sub>);  
 Chaque valeur représente la moyenne ± ES, n=8 BI: 30<sup>ème</sup>-37<sup>ème</sup> j; BII: 53<sup>ème</sup>-60<sup>ème</sup>, BIII: 60<sup>ème</sup>-67<sup>ème</sup> j, BIV: 83<sup>ème</sup>-90<sup>ème</sup> j de l'expérimentation,  
 La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX



Témoins-Isio
  obèses-Isio
  Témoins- Epax
  obèses-Epax

**Fig :** teneurs urinaires en urée et créatinine chez les rats obèses ou non recevant le régime Isio ou Epax

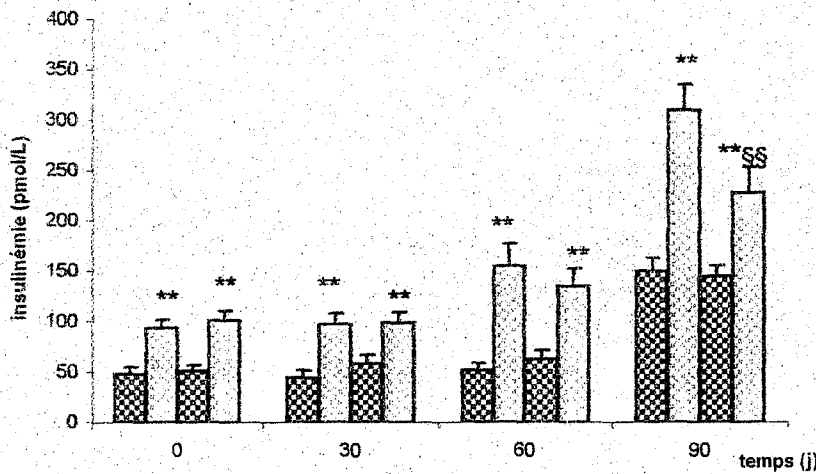
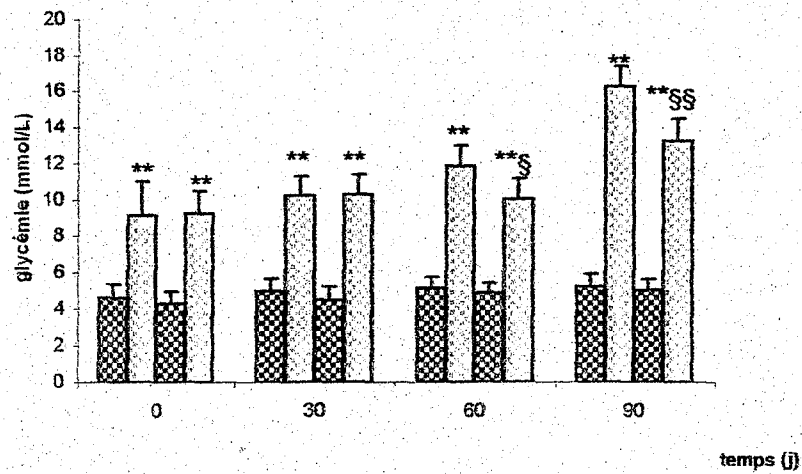
Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=8 BI: 30<sup>ème</sup>-37<sup>ème</sup> j; BII: 53<sup>ème</sup>-60<sup>ème</sup>, BIII: 60<sup>ème</sup>-67<sup>ème</sup> j, BIV: 83<sup>ème</sup>-90<sup>ème</sup> j de l'expérimentation,

La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student

\* (P<0.05) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime

§ (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX





Témoins-Isio  
 obèses-Isio  
 Témoins- Epax  
 obèses-Epax

**Fig :** Evolution de la glycémie et de l'insulinémie au cours du temps chez les rats obèses ou non recevant le régime Isio ou Epax  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=8 La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

## **Métabolisme des lipides et lipoprotéines**

## **I. Poids relatif des organes**

### **I.1. Chez les rates (mères) (fig 12)**

Le poids relatif des organes (poids de l'organe/poids du rat x 100) indique l'évolution pondérale de l'organe par rapport à l'organisme.

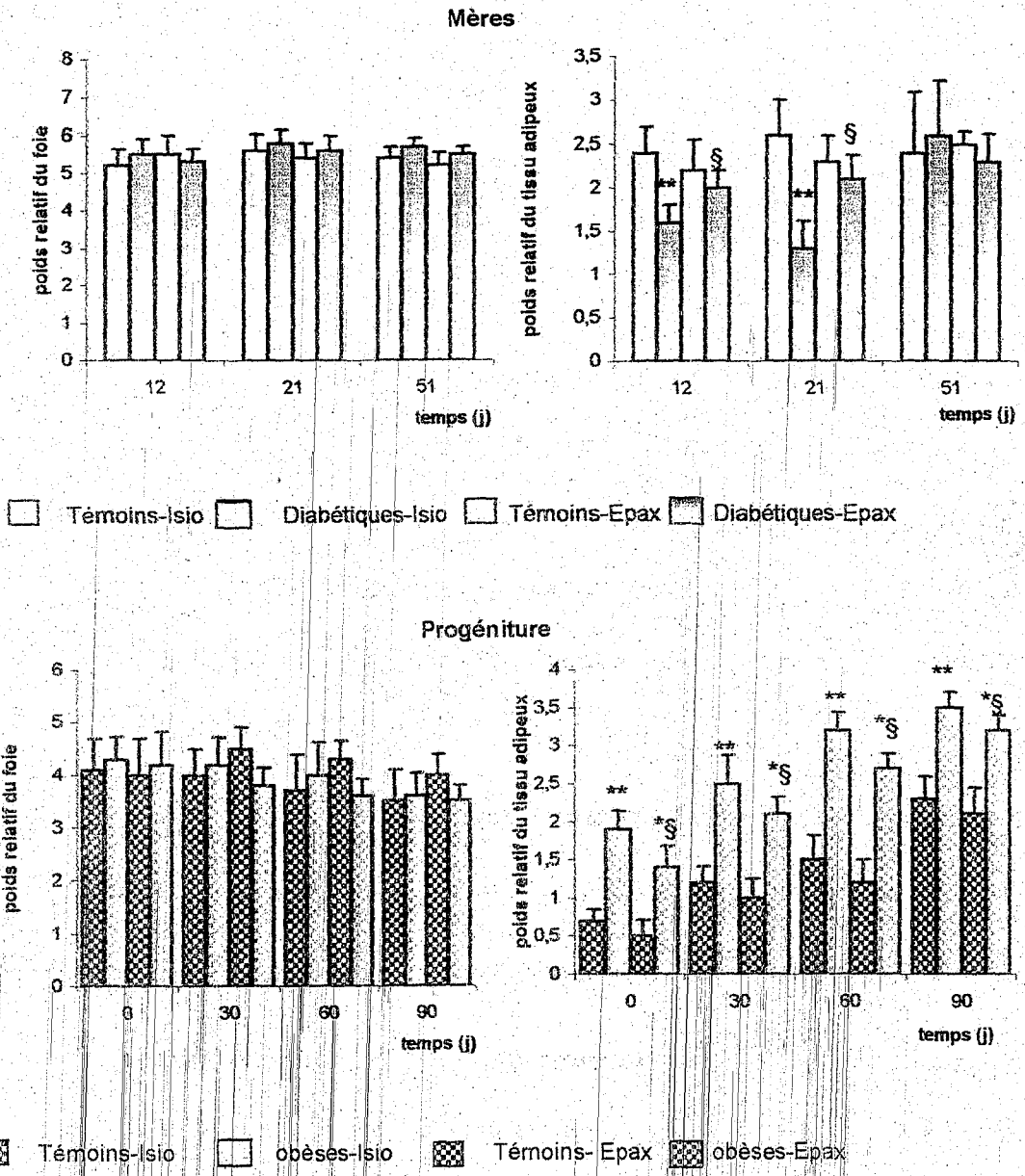
Le poids relatif du foie chez les mères reste stable au cours du temps, alors que celui du tissu adipeux varie chez les mères diabétiques par rapport à leurs témoins pour le régime Isio, en diminuant à j12 et j21 de -33% et -50% respectivement. Par contre les mères diabétiques recevant le régime Epax présentent une augmentation significative (de 25% et 61% à j12 et j21 respectivement) de leur poids relatif du tissu adipeux par rapport aux mères diabétiques recevant le régime Isio. A j51 aucune variation n'est notée pour les quatre régimes.

Quand au muscle, aucune différence n'est notée entre les différents groupes de rats aux différents temps (résultats non présentés).

### **I.2. Chez la progéniture (fig 12)**

Le poids relatif des organes chez les nouveau-nés de j0 à j90 suit la même évolution que chez leurs mères (sauf pour le tissu adipeux). Ainsi le poids relatif du foie ne présente aucune variation entre les macrosomiques et les témoins, alors que celui du tissu adipeux augmente significativement chez les rats macrosomiques comparés à leurs témoins, quelques soient l'âge et le régime. Cette élévation est respectivement à j0, j30, j60 et j90 d'environ 175%, 110%, 120% et 52% pour les deux régimes. Par ailleurs, le régime Epax diminue significativement le poids relatif du tissu adipeux (de -35% à -9%) chez les rats obèses par rapport au régime Isio.

Le poids relatif du muscle ne varie pas significativement entre les différents groupes de rats étudiés (résultats non présentés).



**Fig :** Poids relatif du foie et du tissu adipeux (poids de l'organe (g)/poids corporel(g)x100) chez les mères diabétiques ou non et chez les rats macrosomiques ou non recevant le régime Isio ou Epax. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=6. La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student.

\* (P<0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques ou macrosomiques pour chaque régime.

§ (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX.

## **II. Teneurs en lipides totaux des organes**

### **II.1. Chez les rates (mères) (fig 13)**

Les teneurs en lipides totaux du foie augmentent significativement chez les mères diabétiques comparées à leurs témoins, à j12, j21 et j51 pour le régime Isio, et seulement à j12 et j21 pour le régime Epax. Cependant chez les mères diabétiques recevant le régime Epax, une diminution des lipides totaux (de -40% à -30%) est notée par rapport aux mères diabétiques recevant le régime Isio.

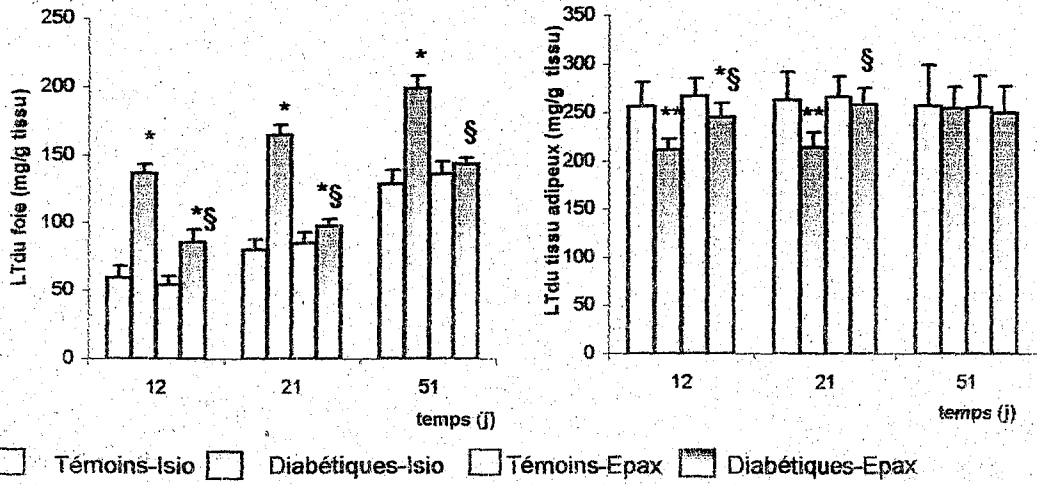
Pour les teneurs en lipides totaux du tissu adipeux des mères diabétiques comparées à leurs témoins, une diminution est notée à j12 et j21 de -17% et -18% respectivement pour le régime Isio, et seulement à j12 de -8% pour le régime Epax. Ce dernier entraîne chez les mères diabétiques une augmentation de 16% et 20% du poids relatif du tissu adipeux à j12 et j21 respectivement, par rapport aux mères diabétiques du régime Isio.

Les teneurs en lipides totaux du muscle ne montrent aucune différence chez les différents groupes de rats (résultats non présentés).

### **II.2. Chez la progéniture (fig 13)**

Les lipides totaux du foie et du tissu adipeux augmentent avec l'âge des nouveau-nés. Par ailleurs, les rats macrosomiques recevant le régime Isio montrent une augmentation significative des taux en lipides du foie (+43% et +69% à j60 et j90 respectivement) et du tissu adipeux (+40%, +58% et +52% à j30, j60 et j90 respectivement) par rapport à leurs témoins. Cependant, l'augmentation des taux des lipides totaux chez les rats macrosomiques recevant le régime Epax, n'est observée qu'à j90 (+33%) pour le foie, et à j30, j60 et j90 (+14%, +15% et +22% respectivement) pour le tissu adipeux. Ainsi, une diminution significative (allant de -20% à -40%) des lipides totaux est notée chez les rats macrosomiques Epax comparés aux rats macrosomiques Isio.

### Mères



### Progéniture

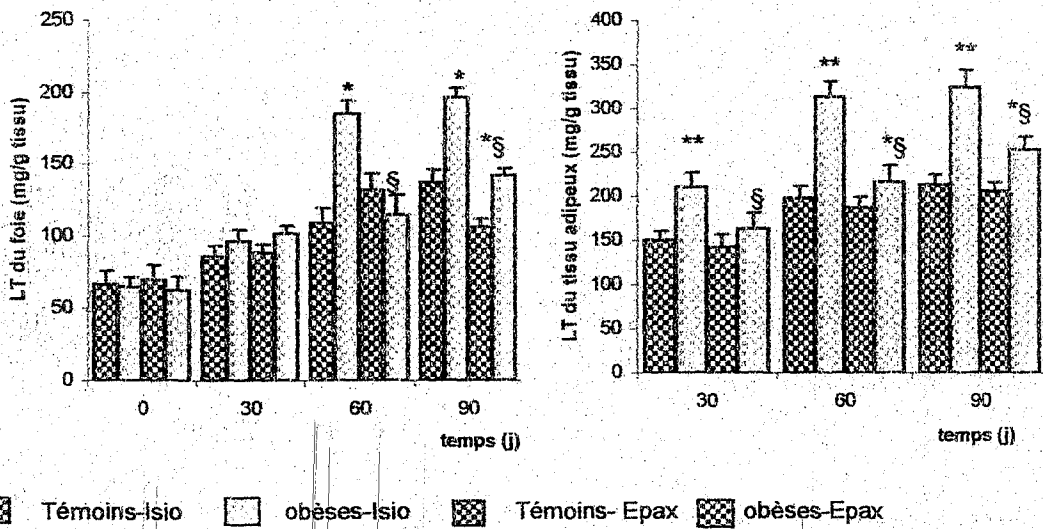


Fig : Teneurs en lipides totaux (LT) du foie et du tissu adipeux chez les mères diabétiques ou non et chez les rats macrosomiques ou non recevant le régime Isio ou Epax  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=6 La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student

\* (P<0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques ou macrosomiques pour chaque régime.  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

Les lipides totaux au niveau du muscle, ne varient pas significativement chez les rats quelque soit leur âge pour les deux régimes.

### **III. Teneurs en protéines des organes (fig 14)**

#### **III.1. Chez les rates (mères)**

Les teneurs en protéines du foie et du muscle ne montrent aucune différence significative chez les différents groupes de rats étudiés et aux différents temps.

#### **III.2. Chez la progéniture**

Les teneurs en protéines du muscle augmentent significativement à j30, j60 et j90 chez les rats macrosomiques du régime Isio et Epax par rapport à leurs témoins respectifs, alors que le taux de protéines du foie ne sont élevés que chez les rats macrosomiques du régime Isio par rapport à leurs témoins. Le régime Epax entraîne une diminution significative des protéines du foie et du muscle comparé au régime Isio, chez les rats macrosomiques.

### **IV. Evolution des activités des lipoprotéines lipases (LPL) tissulaires**

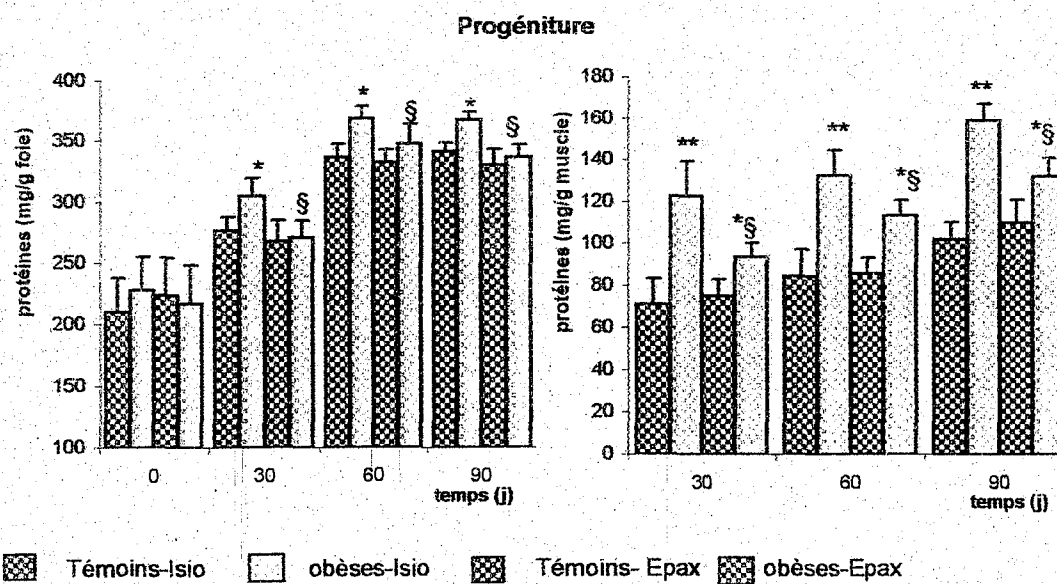
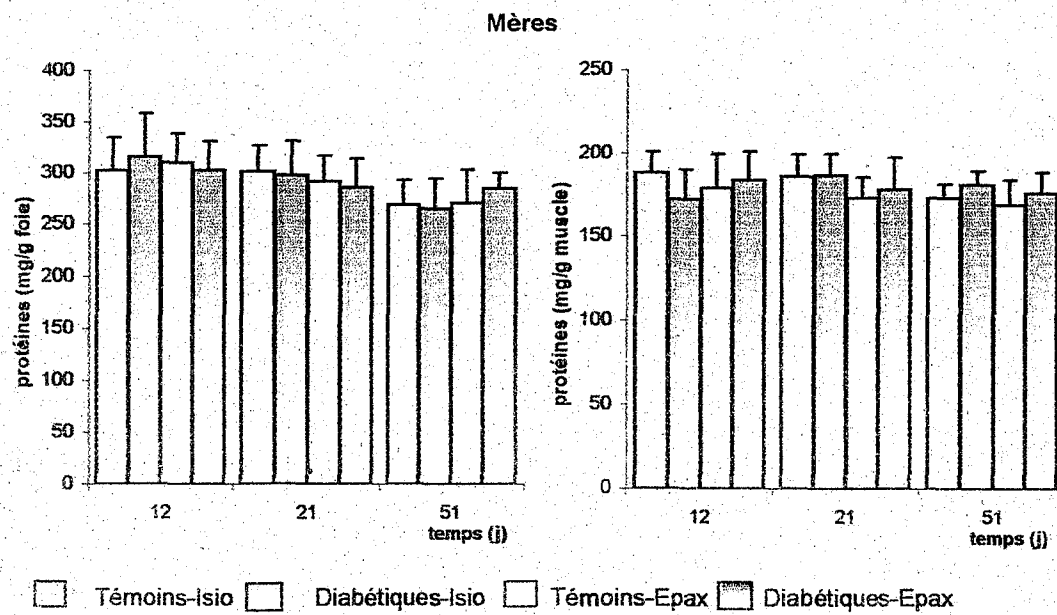
#### **IV.1. Chez les mères (fig 15)**

##### **IV.1.1. Activité de la lipase hépatique (HTGL)**

L'activité de la triglycéride lipase hépatique (nmol d'AG libérés/ min/ g foie) augmente d'environ 30% chez les rates diabétiques du régime Isio par rapport à leurs témoins, alors que les rates diabétiques du régime Epax ne montrent aucune différence comparées à leurs témoins. De plus, les rates diabétiques du régime Epax montrent une diminution de -15% à -20% de l'activité HTGL par rapport aux rates diabétiques du régime Isio .

##### **IV.1.2. Activité de la lipoprotéine lipase (LPL) adipocytaire**

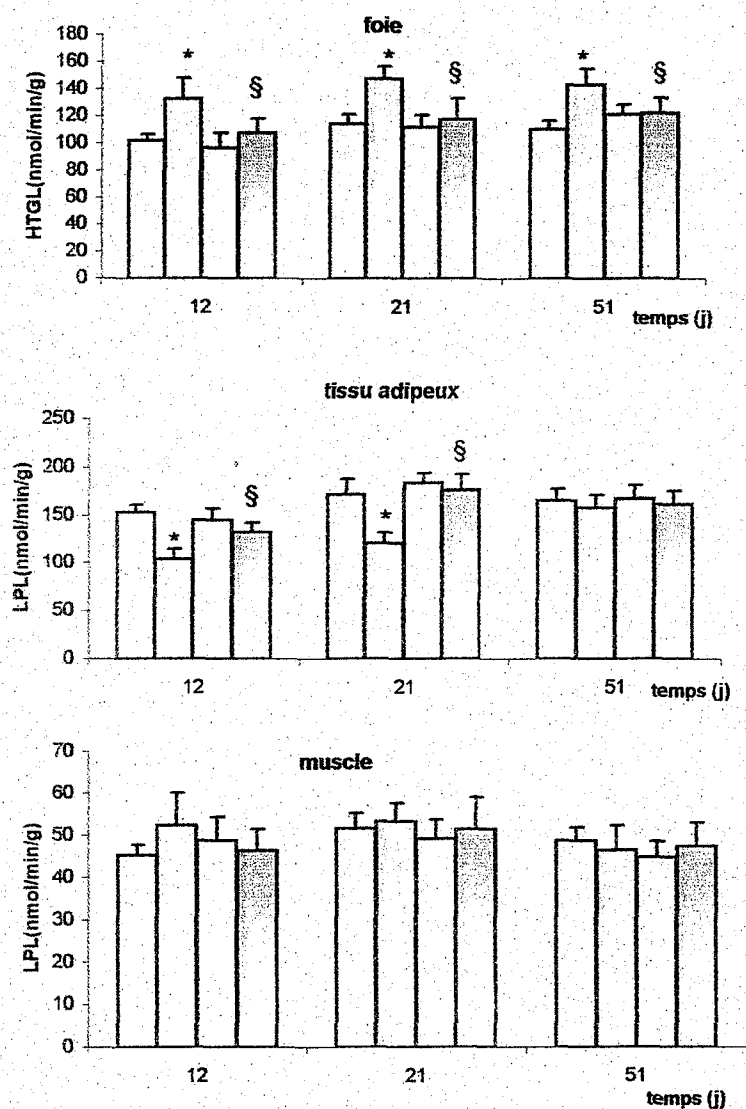
L'activité de la LPL adipocytaire (nmol d'AG libérés/ min/ g tissu adipeux) diminue d'approximativement -30% chez les rates diabétiques du régime Isio par rapport à leurs



**Fig 1 :** Teneurs en protéines du foie et du muscle chez les mères diabétiques ou non et chez les rats macrosomiques ou non recevant le régime Isio ou Epax  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=6 La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student

\* (P<0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques ou macrosomiques pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX





□ Témoin-Isio □ Diabétiques-Isio □ Témoin-Epax □ Diabétiques-Epax

**Fig 1** : Activité de la triglycéride lipase hépatique (HTGL) et des lipoprotéines lipases (LPL) du muscle et du tissu adipeux chez les mères diabétiques recevant le régime Isio ou Epax.

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=6. La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student.

\* (P<0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques pour chaque régime.  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX.

témoins à j12 et j21 ; et augmente chez les rates diabétiques du régime Epax (de 26% et 45% à j12 et j21) comparées aux rates diabétiques du régime Isio. Cependant à j51 aucune variation n'est notée.

#### **IV.1. 3. Activité de la lipoprotéine lipase (LPL) musculaire**

L'activité de la LPL musculaire (nmol d'AG libérés/ min/ g tissu) est similaire chez les différents groupes de rates et aux différents temps.

#### **IV.2. Chez la progéniture (fig 16)**

##### **IV.2.1. Activité de la lipase hépatique (HTGL)**

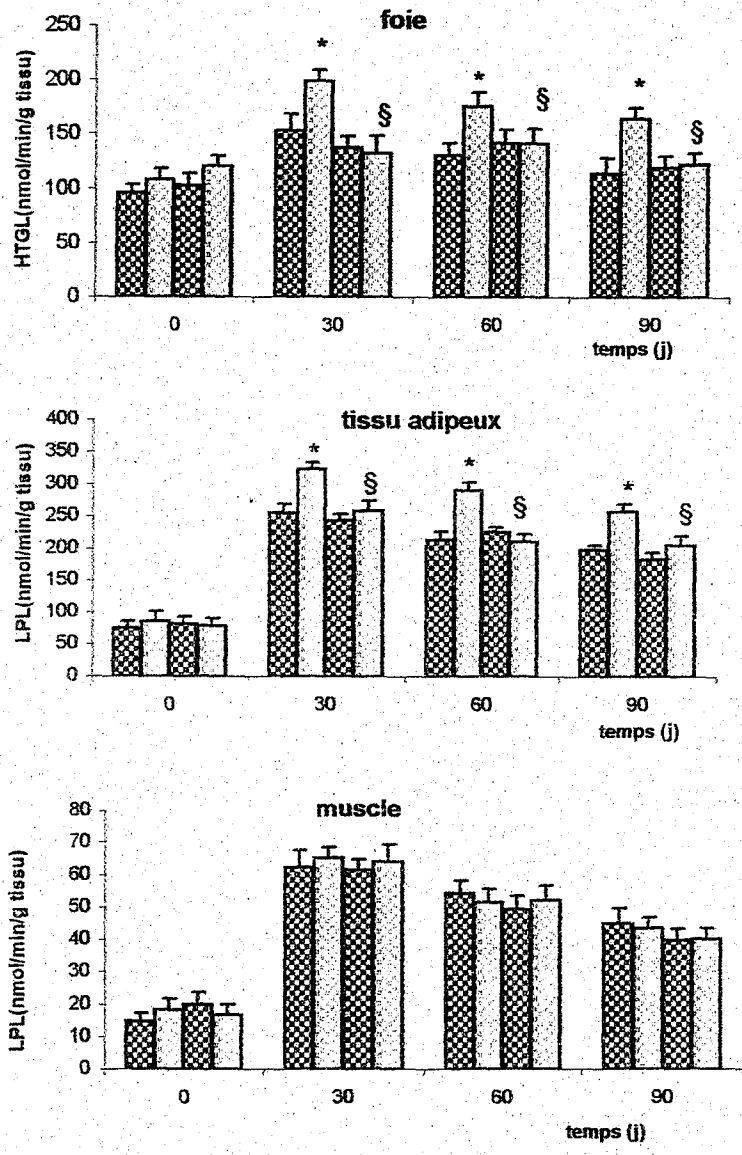
L'activité de la HTGL diminue au cours du temps (de j30 à j90) chez les différents groupes de rats (de -10% à -26%). A j0, cette activité ne montre aucune variation, alors qu'elle augmente à j30, j60 et j90 de 30% à 45% chez les rats macrosomiques du régime Isio par rapport à leurs témoins. Le régime Epax entraîne une diminution significative de la HTGL (de -19% à -33%) par rapport au régime Isio chez les rats macrosomiques.

##### **IV.2.2. Activité de la LPL adipocytaire**

L'activité de la LPL adipocytaire est faible à la naissance, puis augmente et atteint sa valeur maximum à j30. En effet, au-delà de j30, cette activité diminue avec l'âge des rats.. Chez les rats macrosomiques recevant le régime Isio, elle augmente de 26% à 35% par rapport à leurs témoins. La LPL adipocytaire diminue de -20% à -27% chez les rats macrosomiques du régime Epax comparés à ceux du régime Isio.

##### **IV.2. 3. Activité de la LPL musculaire**

Les variations en fonction du temps de l'activité de la LPL musculaire sont similaires à ceux de la LPL adipocytaire chez les quatre groupes de rats. Cependant, cette activité LPL



Témoins-Isio  
 obèses-Isio  
 Témoins-Epax  
 obèses-Epax

**Fig 1** :Activité de la triglycéride lipase hépatique (HTGL) et des lipoprotéines lipases (LPL) du muscle et du tissu adipeux chez les rats macrosomiques recevant le régime Isio ou Epax  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=6 La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \*(P<0.05) Différence significative entre témoins et obèses pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

reste similaire chez les rats macrosomiques comparées à leurs témoins quelque soit le régime.

## **V. Teneurs en lipides des organes, du sérum et des lipoprotéines**

### **V.1. Chez les mères**

#### **V.1.1 Lipides des organes**

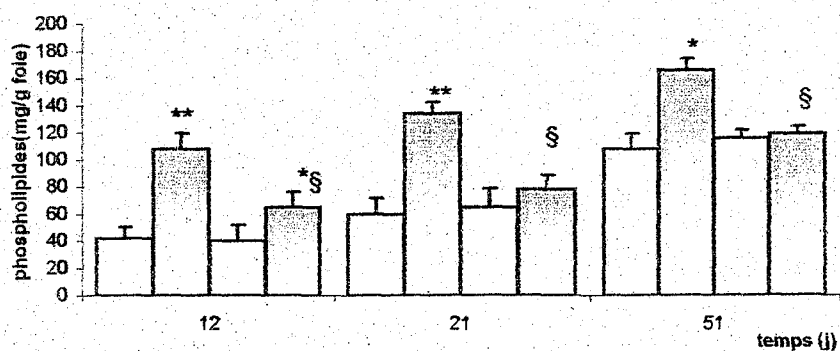
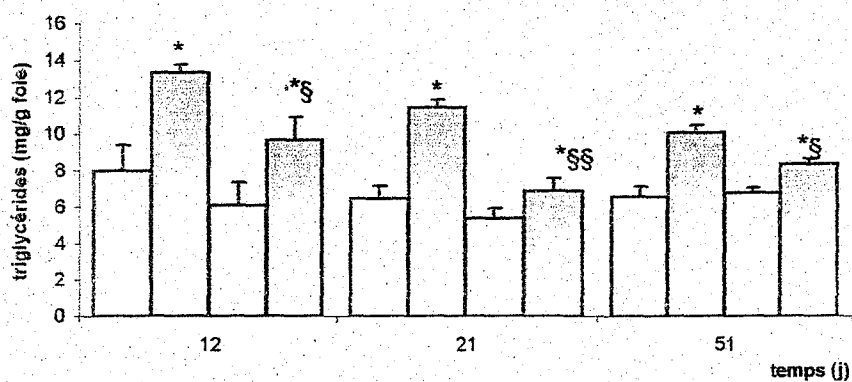
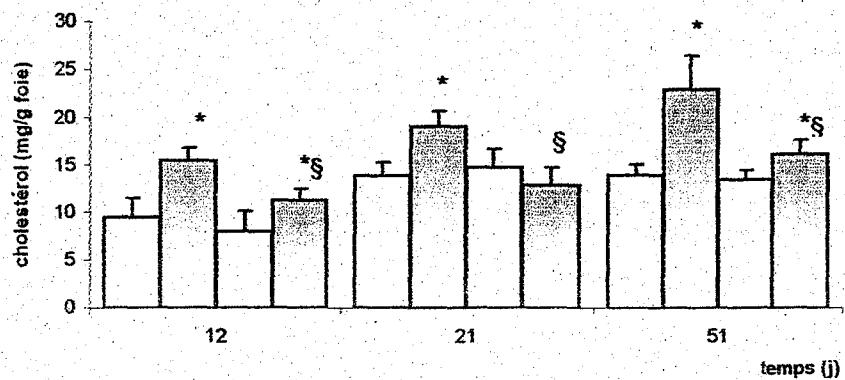
D'une manière générale, les lipides (cholestérol, triglycérides et phospholipides) du foie des mères diabétiques (fig 17) recevant le régime Isio augmentent significativement à j12, j21 et j51 par rapport à leurs témoins. Cette élévation est de 37% à 64% pour le CT, de 53% à 76% pour les TG et de 53% à 157% pour les PL.

Les mères diabétiques recevant le régime Epax, présentent également des teneurs élevées en lipides hépatiques comparées à leurs témoins, sauf pour le CT à j21 et les PL à j21 et j51 où les valeurs sont similaires à celles des témoins. Par ailleurs, les teneurs en lipides des mères diabétiques recevant le régime Epax diminuent significativement (de -27% à -32% pour le TC, de -16% à -40% pour les TG et de -28% à -41% pour les PL), comparées aux valeurs trouvées pour le régime Isio.

L'évolution des lipides du tissu adipeux suit la même variation que celle des lipides hépatiques (résultats non présentés)

#### **V.1.2 Lipides du sérum et des lipoprotéines (fig 18, 19 et 20)**

Chez les mères diabétiques du régime Isio, les lipides du sérum et des lipoprotéines augmentent significativement comparés aux valeurs obtenues chez les témoins, à l'exception du C-HDL et des TG-HDL. Les mères diabétiques du régime Epax ne montrent généralement pas de différence significative de leurs taux de lipides sériques et lipoprotéiques, à l'exception des PL qui augmentent par rapport aux valeurs témoins. Ainsi chez les rates diabétiques recevant le régime Isio comparées à leurs témoins, le



Témoins-Isio
  Diabétiques-Isio
  Témoins-Epax
  Diabétiques-Epax

**Fig 1 :** Teneurs en lipides du foie chez les mères diabétiques ou non recevant le régime Isio ou Epax

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=6. La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student

\* (P<0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques pour chaque régime

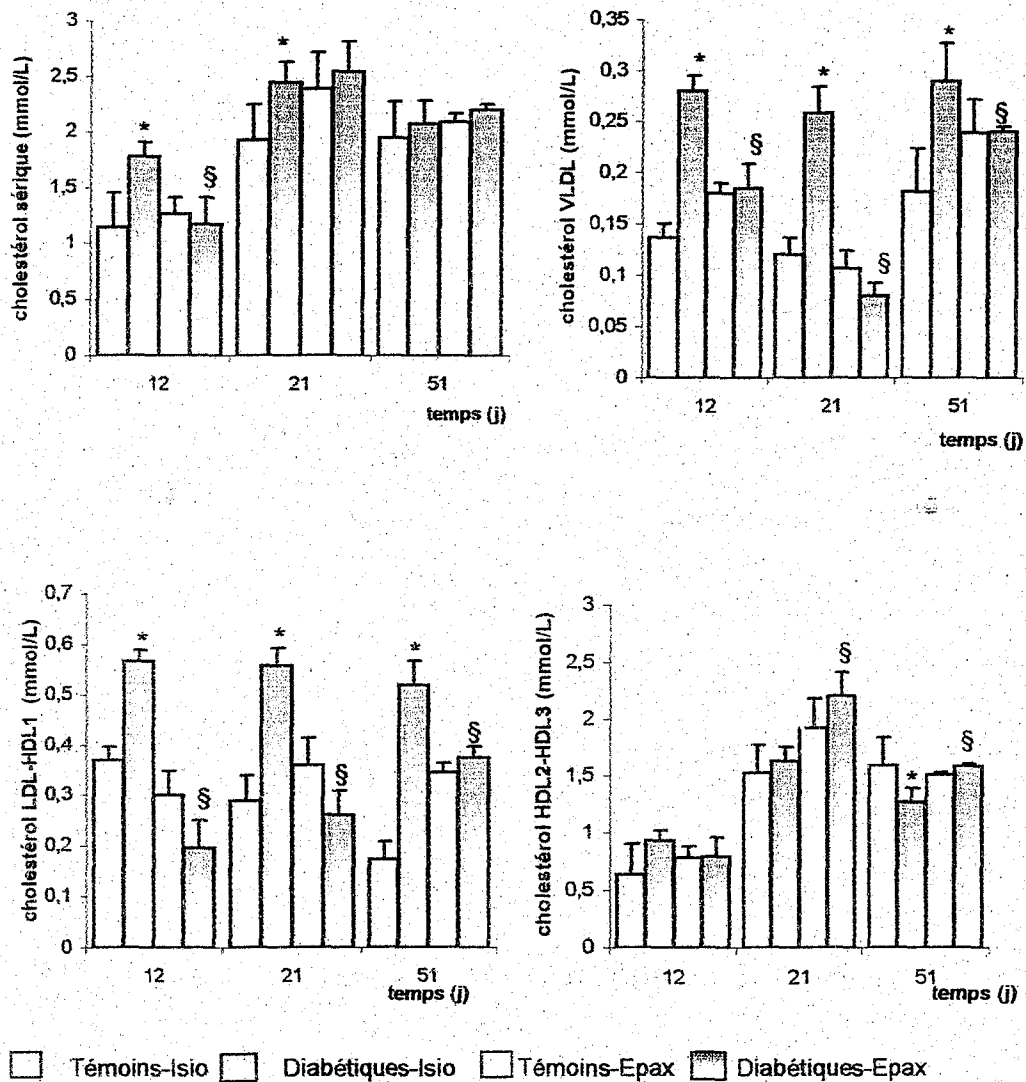
§ (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

cholestérol sérique total augmente de 26% et 56% à j12 et j21 respectivement; par contre l'Epax entraîne une diminution de -34% à j12 de CT chez les rates diabétiques. Au niveau des lipoprotéines, les mêmes variations sont notées (fig 18):

Le Cholestérol augmente à j12, j21 et j51 de 61% à 115% pour les VLDL et de 55% à 205% pour les LDL-HDL1, alors que pour les HDL2-HDL3 une diminution de -20% est notée à j51 chez les rates diabétiques Isio versus leurs témoins. Le régime Epax entraîne une diminution significative à j12, j21 et j51 du C-VLDL (-17% à -68%) et du C-LDL-HDL1 (-28% à -66%), et une augmentation de 34% et 25% respectivement à j21 et j51 du C-HDL2-HDL3, chez les rates diabétiques comparé au régime Isio.

Au niveau du sérum des rates diabétiques recevant le régime Isio comparées à leurs témoins, une élévation des TG de 45% à 52%, de j12 à j51 est notée (fig 19), alors que le régime Epax diminue les TG de -22% à -63% chez les rates diabétiques. Pour les lipoprotéines, une élévation des TG-VLDL (de 26% à 146%) à j12, j21 et j51, et des TG-LDL-HDL1 (de 154% à 151%) à j21 et j51 est observée. Les TG-HDL2-HDL3 ne présentent aucune variation significative chez les différents groupes de rats. L'Epax entraîne une diminution des TG d'environ -50% à -75% pour les VLDL et LDL-HDL1.

Les teneurs en PL (fig 20) présentent des augmentations sériques de 22% à 48% chez les rates diabétiques du régime Isio, et des diminutions par le régime Epax allant de -16% à -30%. Les PL-VLDL augmentent de 30% à 82% à j12, j21 et j51, les PL-HDL2-HDL3 augmentent seulement à j12 et à j51, de 11% et 37% respectivement, alors que les PL-LDL-HDL1 augmentent à j21 et j51 d'environ 40% pour les rates diabétiques du régime Isio comparées à leurs témoins, et d'environ 25% pour les rates diabétiques du régime Epax comparées à leurs témoins. Par ailleurs, le régime Epax entraîne une diminution de -15% à -42% pour les PL-VLDL et les PL-HDL2-HDL3 chez les rates diabétiques.



**Fig :** teneurs en cholestérol du sérum et des lipoprotéines chez les rates diabétiques ou non recevant le régime isio ou Epax  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=6 La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

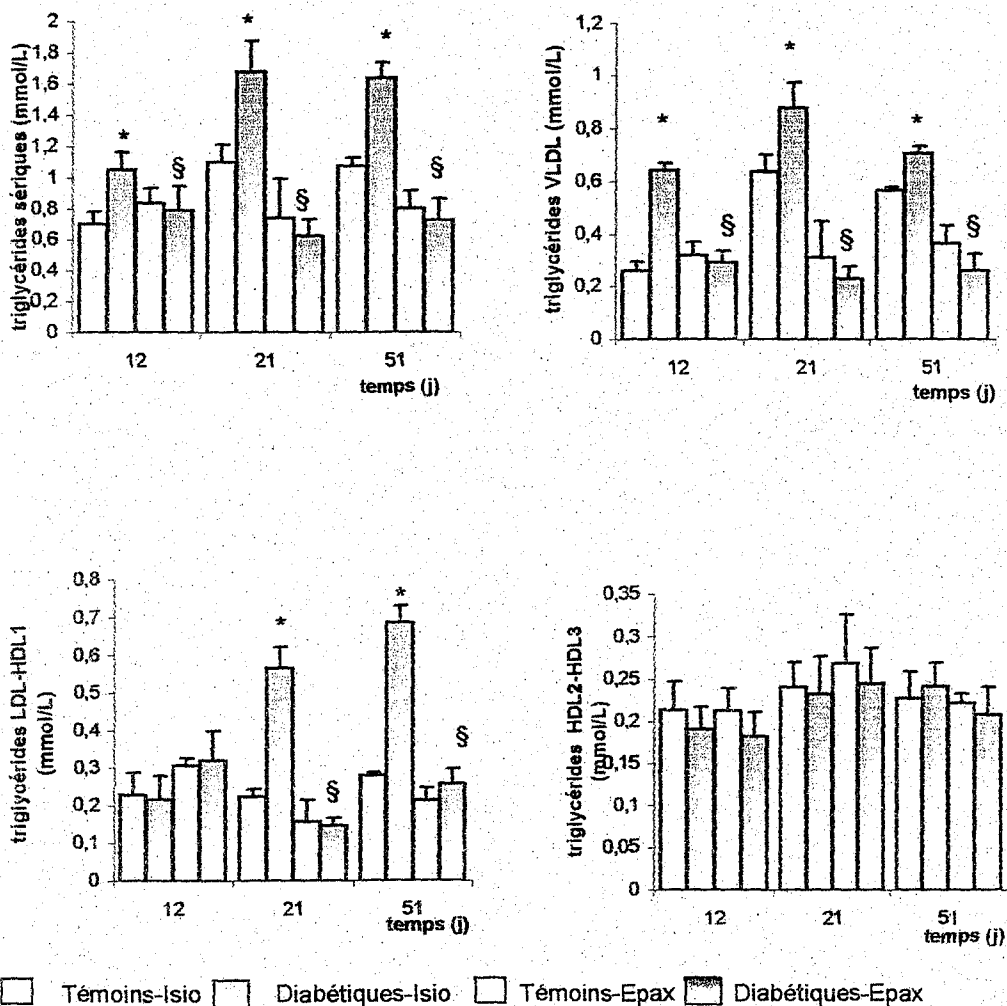
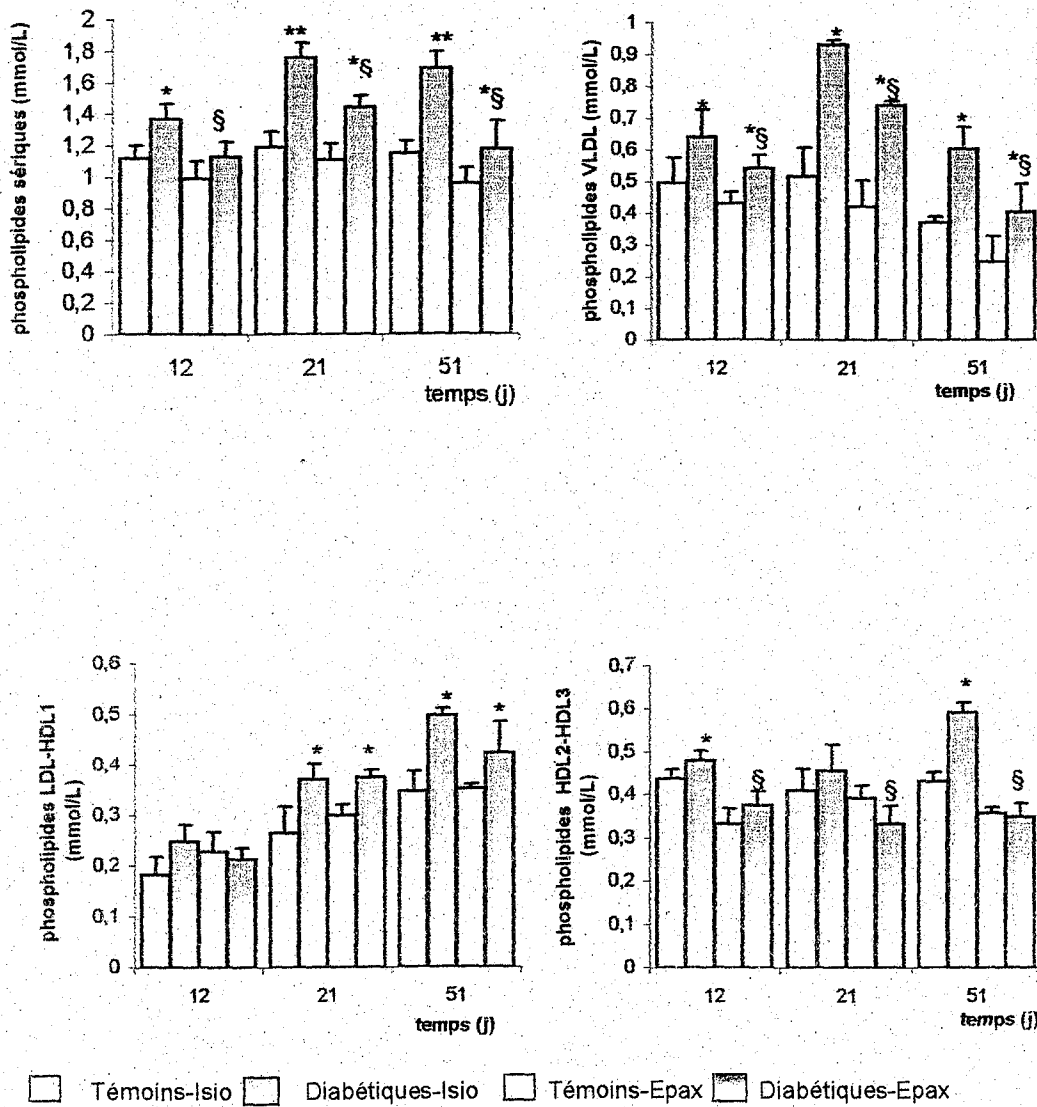


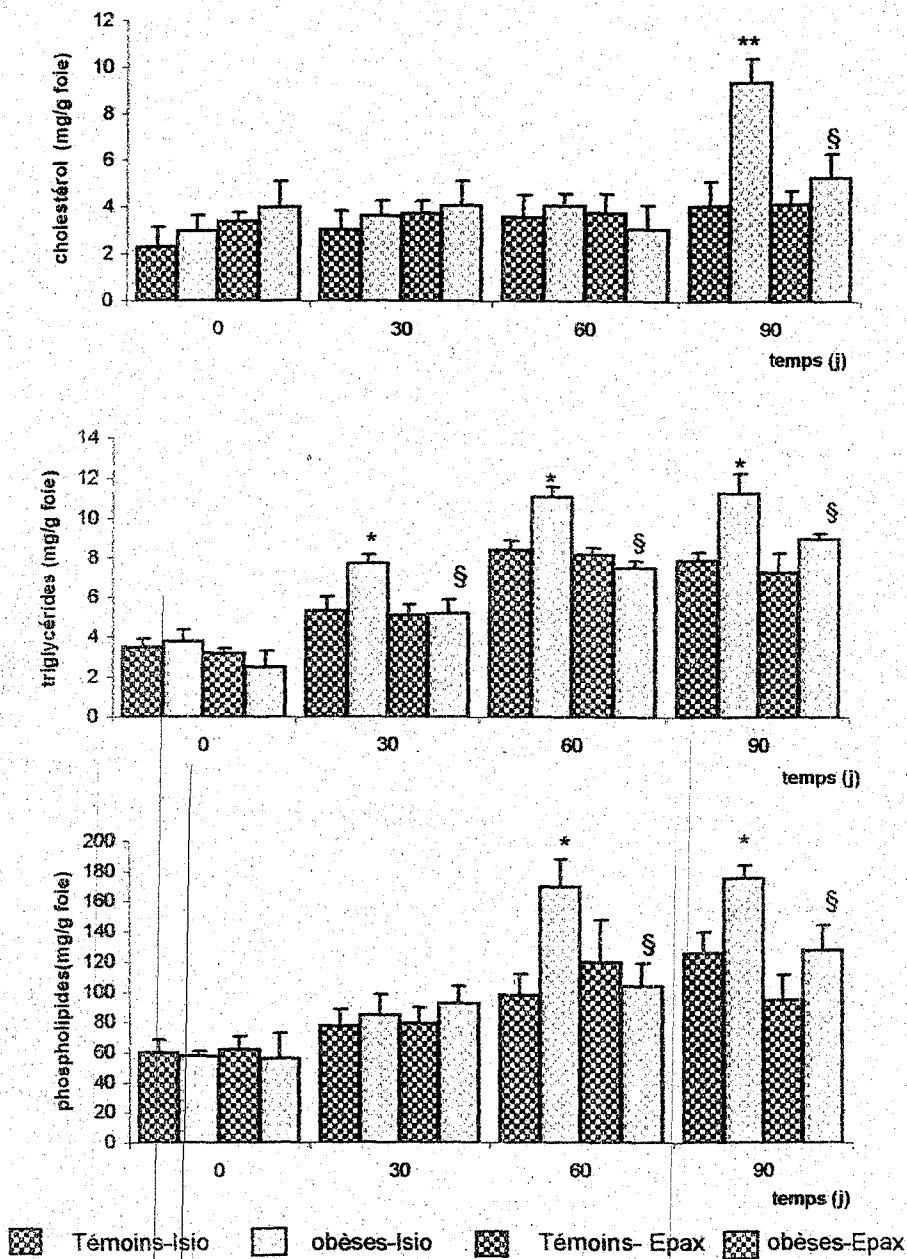
Fig 1 : teneurs en triglycérides du sérum et des lipoprotéines chez les rats diabétiques ou non recevant le régime Isio ou Epax. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=6. La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student. \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques pour chaque régime. § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX.





**Fig :** teneurs en phospholipides du serum et des lipoprotéines chez les rats diabétiques ou non recevant le régime Isio ou Epax. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=6. La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student.

\* (P<0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques pour chaque régime.  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX.



**Fig :** Teneurs en lipides du foie chez les rats macrosomiques ou non recevant le régime Isio ou Epax  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=6 La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et macrosomiques pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

temps du C-VLDL (-25% à -68%) et du C-LDL-HDL1 (-42% à -67%), et une augmentation de 30% et 55% respectivement à j60 et j90 du C-HDL2-HDL3 (fig 22).

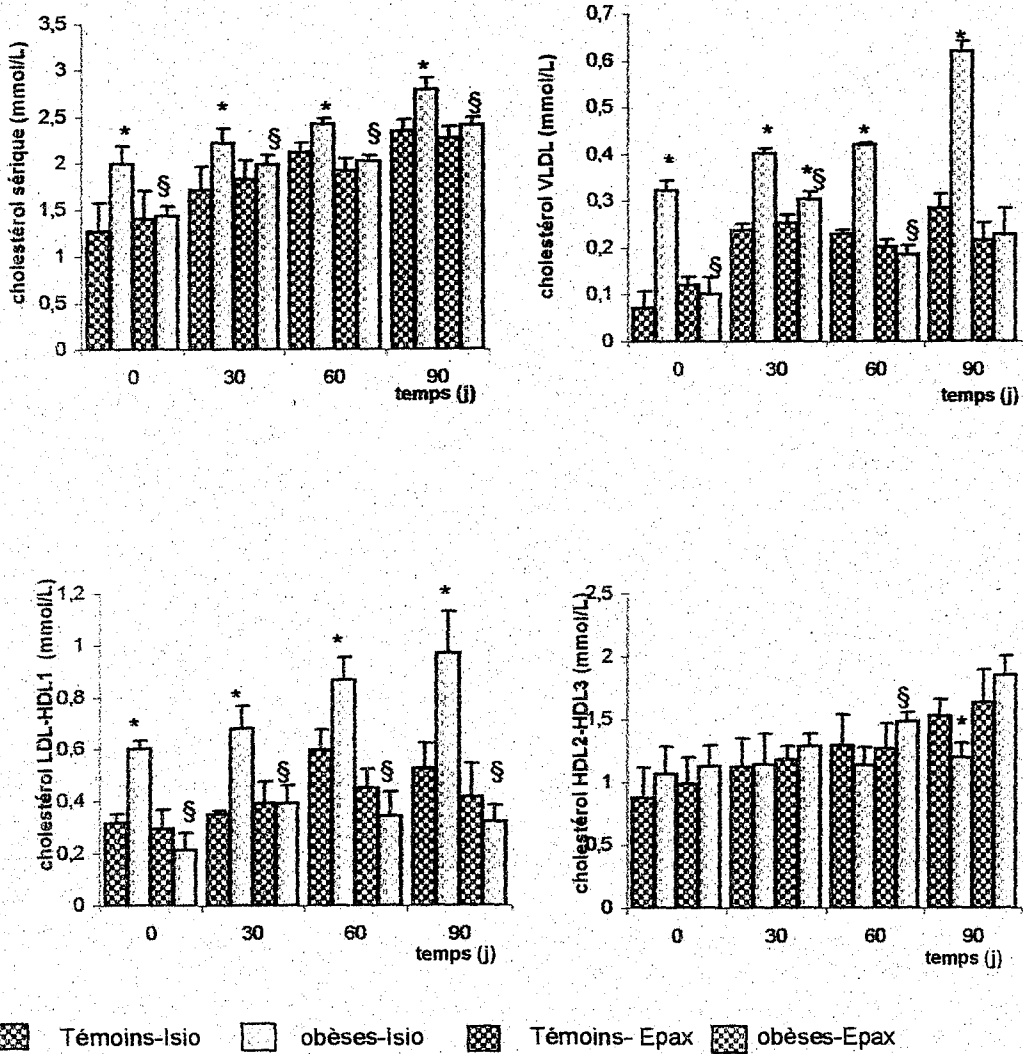
Les teneurs en TG sériques (fig 23) chez les rats macrosomiques recevant le régime Isio, montrent une augmentation significative aux différents temps (57% à 100%) comparées aux valeurs des témoins. Une diminution (-29% à -48%) significative à j0, j30 et j60 et hautement significative à j90, est notée chez les rats macrosomiques du régime Epax par rapport au régime Isio. Les lipoprotéines VLDL et LDL-HDL1 présentent des teneurs élevées (d'environ 45% à 200%) en TG chez les rats macrosomiques Isio par rapport à leurs témoins de j0 à j90. Pour les lipoprotéines HDL2-HDL3, l'augmentation des TG est seulement de 53% et 38% à j0 et j90 respectivement. L'Epax entraîne une diminution de TG, d'environ -30% à -57% pour les VLDL et LDL-HDL1, et de -17% et -38% pour les HDL2-HDL3.

Les PL sériques (fig 24) présentent une augmentation de 27% à 39% chez les rats macrosomiques Isio et une diminution par le régime Epax d'environ -15%. Les PL-VLDL, PL-LDL-HDL1 et les PL-HDL2-HDL3, augmentent en moyenne de 10% à 40%, chez les macrosomiques Isio comparés à leurs témoins. Les rats macrosomiques Epax présentent également une élévation de 10% à 40% de leurs taux en PL-HDL2-HDL3 par rapport à leurs témoins. Le régime Epax entraîne une diminution de -10% à -25% pour les PL des lipoprotéines.

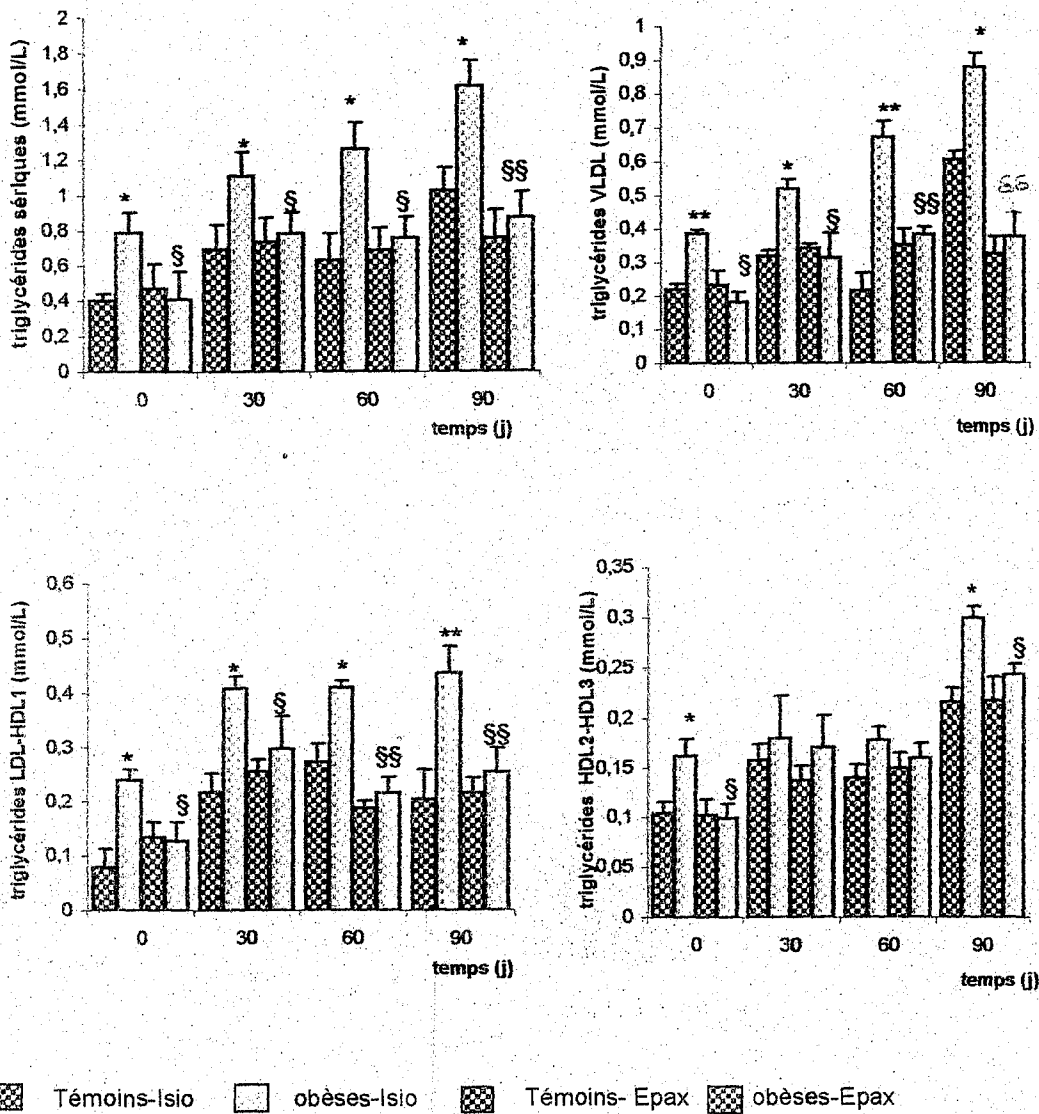
## **VI. Teneurs en apoprotéines des différentes lipoprotéines**

### **VI.1. Chez les mères (fig 25)**

Les teneurs en apoprotéines B100 (apo B 100) des VLDL présentent des augmentations hautement significatives chez les mères diabétiques du régime Isio à j12, j21 et j51 et du régime Epax à j21 et j51 seulement, par rapport à leurs témoins respectifs. Par contre, ces

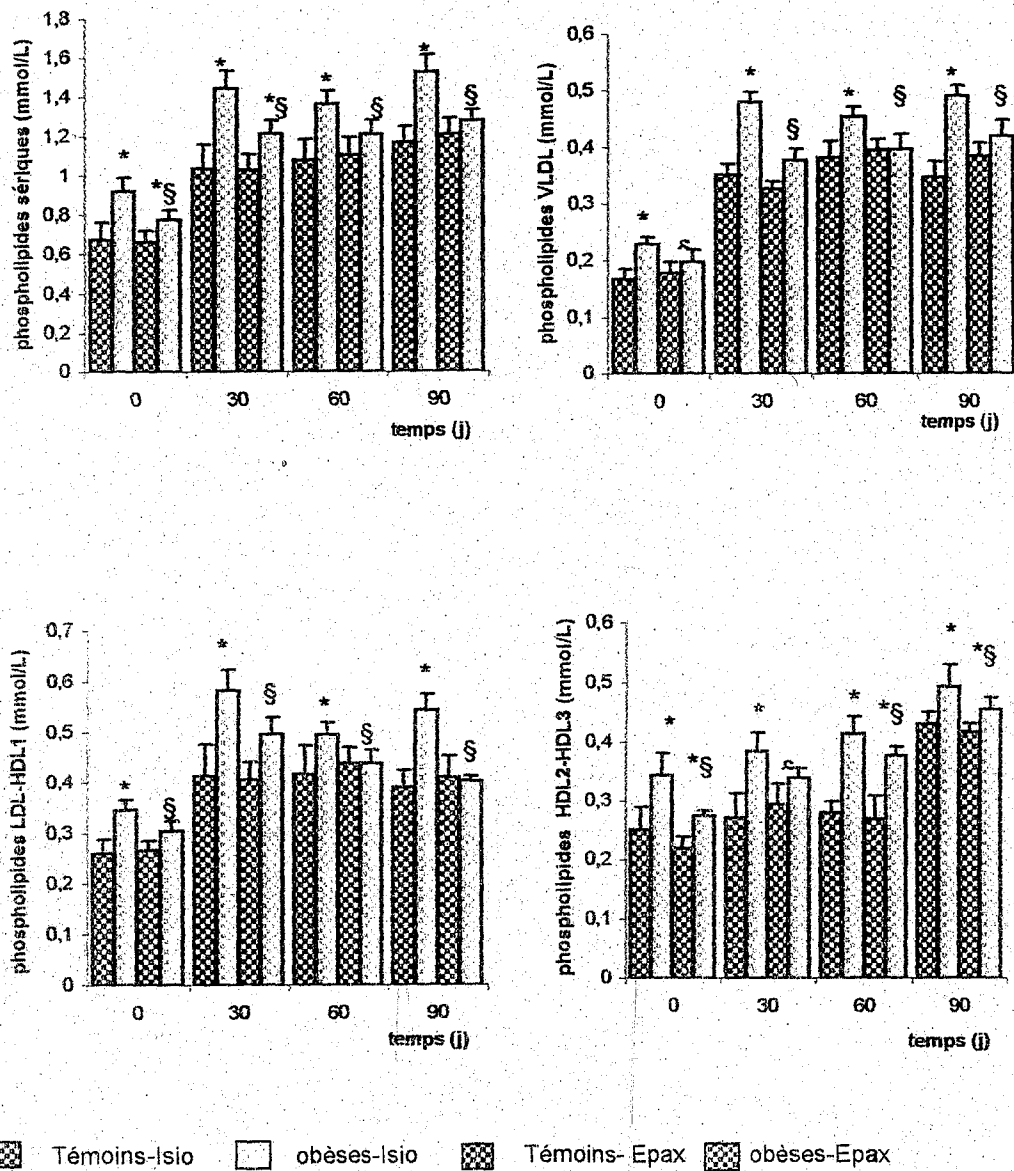


**Fig . . .** teneurs en cholestérol du sérum et des lipoprotéines chez les rats macrosomiques ou non recevant le régime Isio ou Epax  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=6 La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et macrosomiques pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX



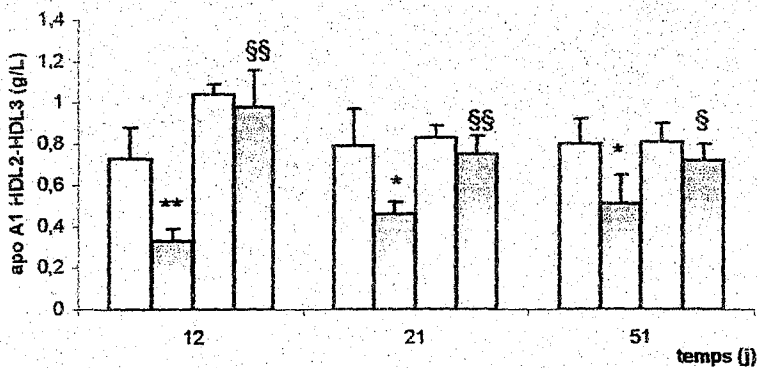
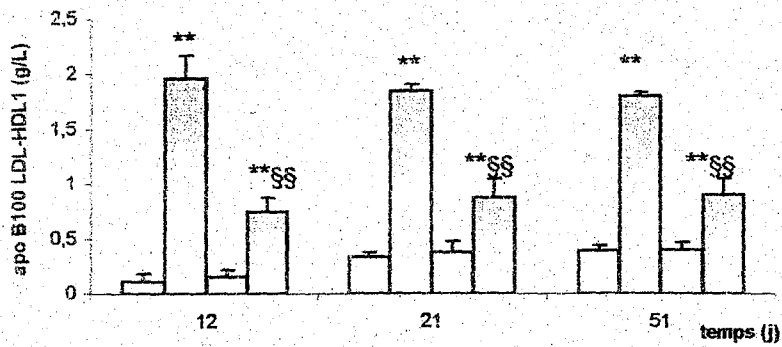
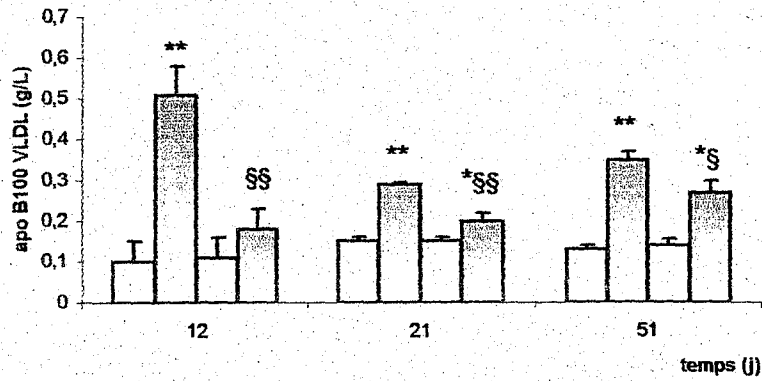
**Fig . . :** teneurs en triglycérides du sérum et des lipoprotéines chez les rats macrosomiques ou non recevant le régime Isio ou Epax. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=6. La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student.

\* (P<0.05) Différence significative entre témoins et macrosomiques pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX



**Fig :** teneurs en phospholipides du sérum et des lipoprotéines chez les rats macrosomiques ou non recevant le régime Isio ou Epax. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=6. La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student.

\* (P<0.05) Différence significative entre témoins et macrosomiques pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX



□ Témoins-Isio □ Diabétiques-Isio □ Témoins-Epax ■ Diabétiques-Epax

**Fig 2** teneurs en apoprotéines (apo) des lipoprotéines sériques chez les rates diabétiques ou non recevant le régime Isio ou Epax. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=6. La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student.  
 \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

teneurs diminuent de façon hautement significative ( $p < 0.01$ ) chez les rates diabétiques du régime Epax par rapport aux rates diabétiques du régime Isio. Les teneurs en apo B 100 des LDL-HDL1 présentent les mêmes variations que celles des VLDL. Cependant les apoprotéines A1 des HDL2-HDL3, chez les mères diabétiques recevant le régime Isio, présentent une diminution significative comparées aux témoins, et une diminution hautement significative par rapport aux rates diabétiques recevant le régime Epax.

## **VI.2. Chez la progéniture (fig 26)**

D'une manière générale, les variations des teneurs en apo B100 et apo A1 chez les nouveau-nés sont similaires à celles de leurs mères. Les modifications des teneurs en apo B100 des VLDL et des LDL-HDL1 sont notées dès j0 et se poursuivent jusqu'à l'âge adulte, alors que celles des apo A1-HDL2-HDL3 n'apparaissent qu'à partir de j30.

## **VII. Activités enzymatiques intervenant dans le métabolisme des lipides et lipoprotéines**

### **VII.1. Activité de la LCAT (fig 27)**

#### **VII.1.1 Chez les mères**

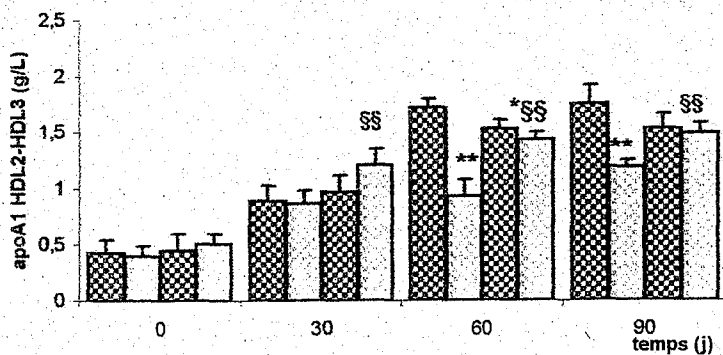
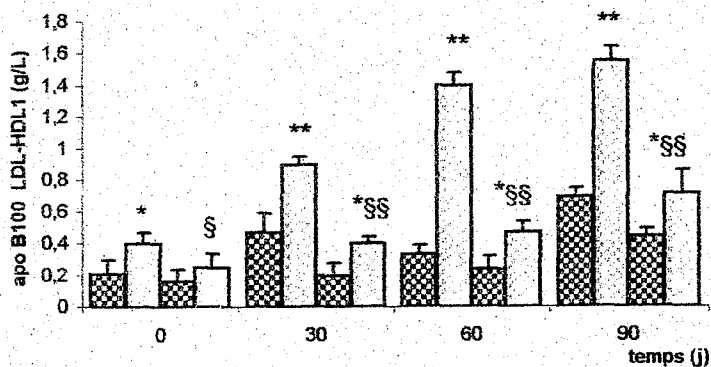
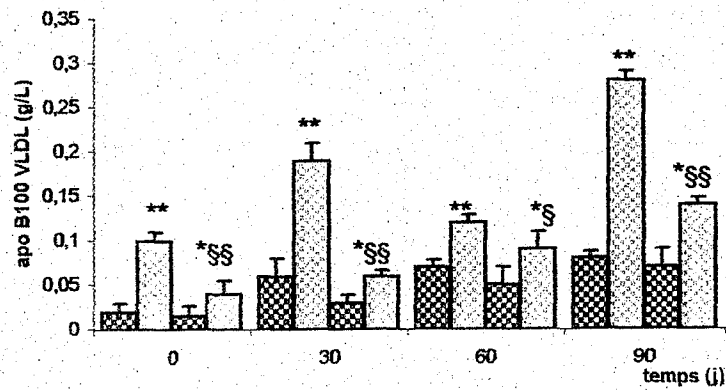
L'activité de la Lécithine Cholestérol Acyl Transférase (LCAT) diminue chez les mères diabétiques (de -23% à -46%) du régime Isio par rapport à leurs témoins.

Les rates diabétiques du régime Epax ne montrent pas de variations par rapport à leurs témoins. Cependant, une augmentation (de 25% à 42%) de l'activité LCAT est notée, par rapport aux rates diabétiques du régime Isio.

#### **VII.1.2 Chez la progéniture**

Contrairement aux mères, l'activité de la LCAT augmente chez les rats macrosomiques du régime Isio (de 40% à 70%) par rapport à leurs témoins, tandis que le régime Epax

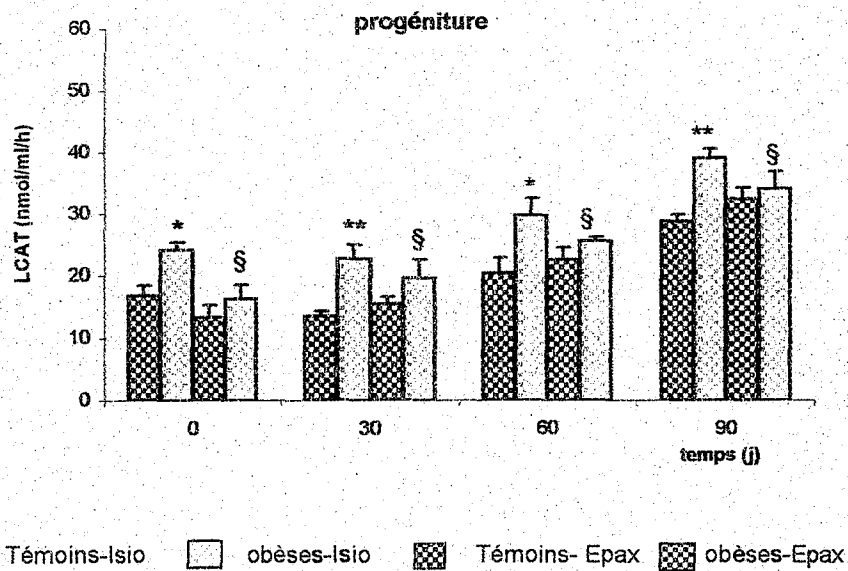
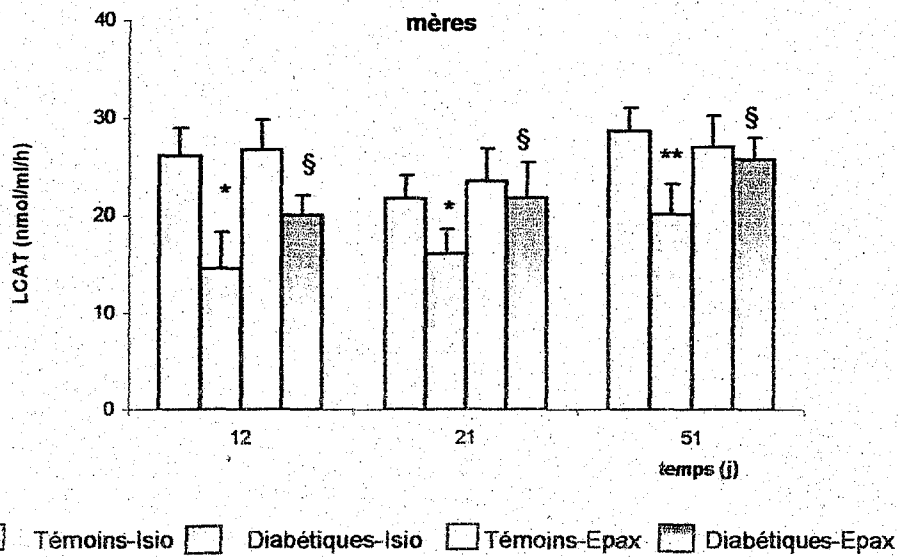




Témoins-Isio  
 obèses-Isio  
 Témoins-Epax  
 obèses-Epax

**Fig 2 : teneurs en apoprotéines (apo) des lipoprotéines sériques chez les rats macrosomiques ou non recevant le régime Isio ou Epax**  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=6 La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student

\* (P<0.05) Différence significative entre témoins et macrosomiques pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX



**Fig 2 :** Activité de la Lécithine Cholestérol Acyl Transférase (LCAT) chez les mères diabétiques et chez les rats macrosomiques recevant le régime Isio ou Epax. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=6. La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student.

\* (P < 0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques ou macrosomiques pour chaque régime.  
 § (P < 0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX.

entraîne une diminution de cette activité enzymatique (de -12% à -33%) chez les rats macrosomiques par rapport au régime Isio.

## **VII.2. Activité des enzymes hépatiques**

### **VII.2.1 Chez les mères (fig 28)**

L'activité des enzymes hépatiques augmente chez les mères diabétiques recevant le régime Isio comparées à leurs témoins, de 36% à 48% pour la HMGCoA réductase, de 53% à 89% pour la 7 $\alpha$  hydroxylase et de 52% à 61% pour l'ACAT ; tandis que les mères diabétiques recevant le régime Epax ne présentent pas de variations par rapport à leurs témoins. Cependant, ces activités enzymatiques sont significativement diminuées (de -20% à -40%) chez ces dernières comparées aux mères diabétiques du régime Isio.

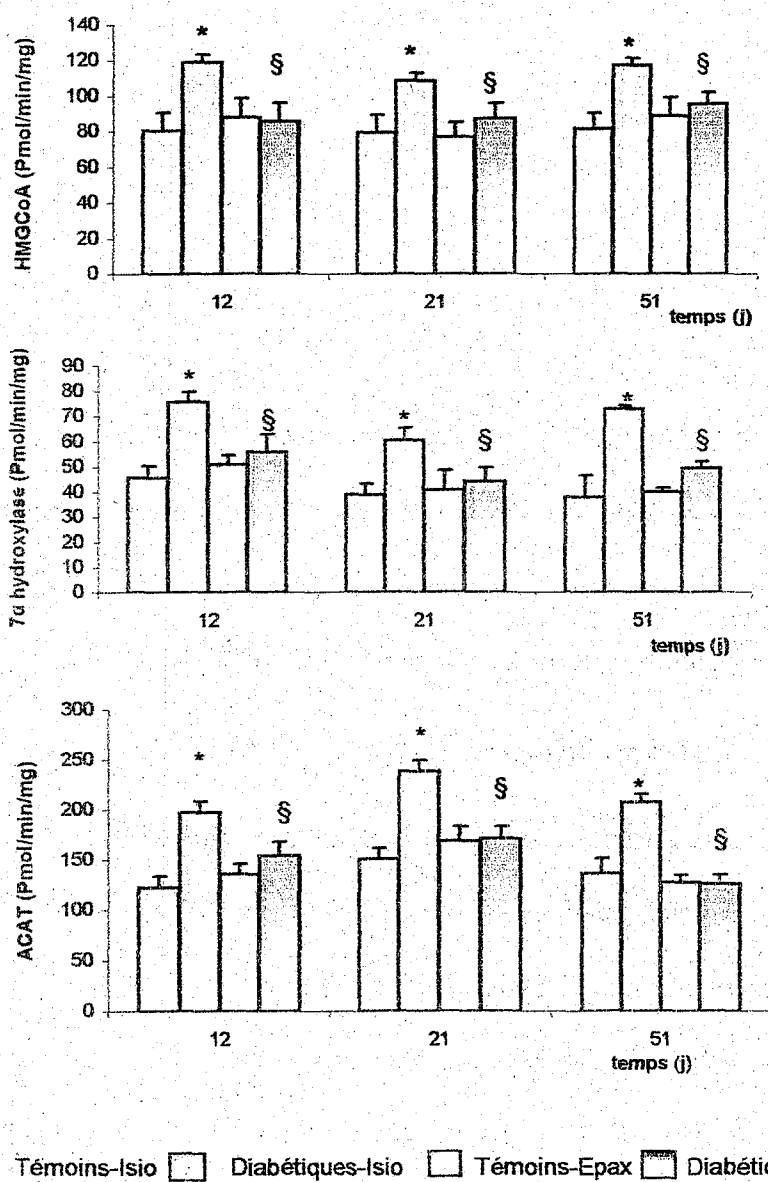
### **VII.2.2 Chez la progéniture (fig 29)**

A la naissance (j0), aucune différence des activités des enzymes hépatiques n'est notée chez les différents groupes de rats. Cependant, dès j30 les activités de la HMGCoA réductase et de la 7 $\alpha$  hydroxylase diminuent avec l'âge des rats. Par contre, l'activité de l'ACAT augmente dès j30 jusqu'à j90 chez les différents groupes de rats. Par ailleurs, la macrosomie entraîne une élévation de ces activités enzymatiques allant de 37% à 78% chez les rats comparés aux témoins pour le régime Isio, alors qu'aucune variation n'est notée chez les rats consommant le régime Epax comparés à leurs témoins. De plus, le régime Epax entraîne une diminution significative de -25% à -40% des différentes activités enzymatiques chez les rats macrosomiques par rapport au régime Isio.

## **VIII. Evolution de la composition en acides gras des lipides sériques et hépatiques**

### **VIII.1. Chez les mères (tableau II et III)**

Au niveau du sérum (tableau II), le taux des acides gras saturés (AGS) reste stable chez les différents groupes de rates à J12 et j21. Cependant, le C18 :1(n-9) et le C18 :2 (n-6)



**Fig 2 :** Activités des enzymes hépatiques chez les mères diabétiques ou témoins recevant le régime Isio ou Epax

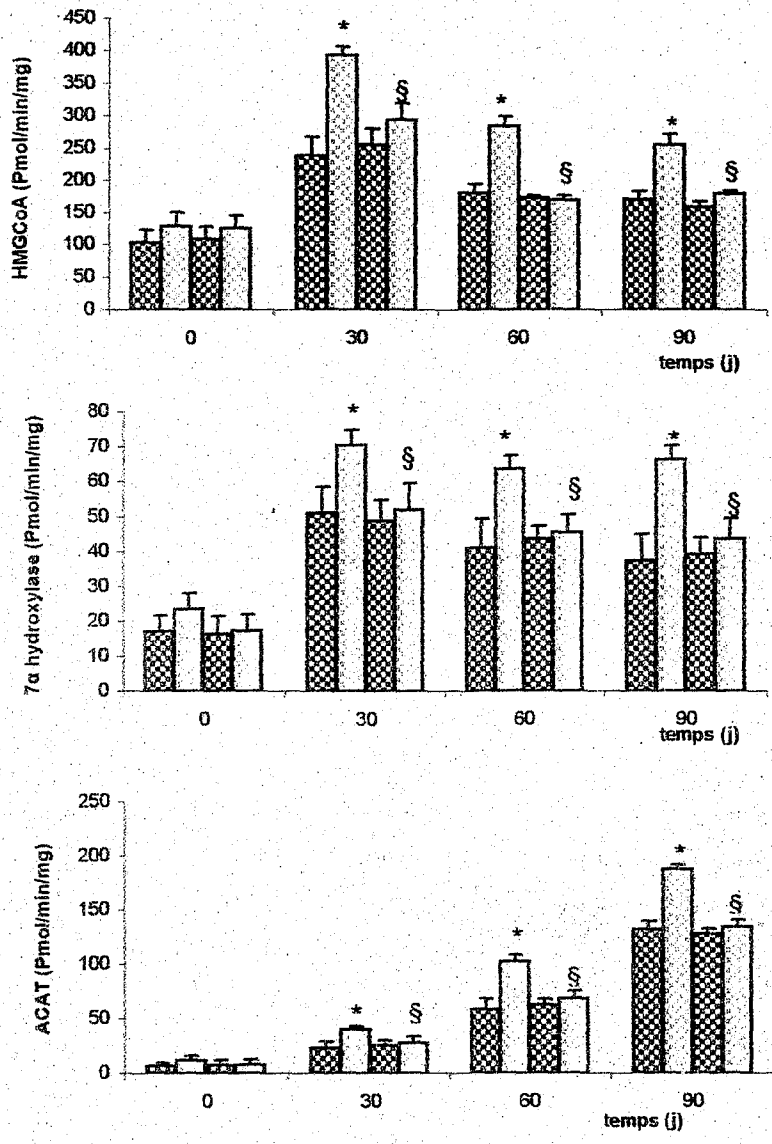
HMGCoA: Hydroxy méthyl glutaryl-coenzyme A réductase

ACAT: Acyl-Coenzyme A : Cholestérol Acyltransférase

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=6 La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student

\* (P<0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques pour chaque régime

§ (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX



Témoins-Isio  
 obèses-Isio  
 Témoins-Epax  
 obèses-Epax

**Fig 2.:** Activités des enzymes hépatiques chez les rats macrosomiques ou témoins recevant le régime Isio ou Epax  
 HMGCoA: Hydroxy méthyl glutaryl-coenzyme A réductase  
 ACAT: Acyl-Coenzyme A : Cholestérol Acyltransférase  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=6 La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \*(P<0.05) Différence significative entre témoins et macrosomiques pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

Tableau II : Composition en acides gras des lipides sériques des rates diabétiques recevant le régime Isio ou Epax comparées à leurs témoins, à j12 et j21 de la gestation

lot	j 12				j 21			
	Rats témoins isio	Rats diabétiques isio	Rats témoins Epax	Rats diabétiques Epax	Rats témoins isio	Rats diabétiques isio	Rats témoins Epax	Rats diabétiques Epax
Acides gras saturés	39.73 ± 1.45	38.59 ± 2.12	41.39 ± 1.92	40.53 ± 1.59	31.30 ± 2.73	33.14 ± 2.07	29.52 ± 1.84	31.26 ± 1.57
18:1	16.60 ± 1.98	24.23 ± 1.14 *	18.7 ± 2.11	17.14 ± 1.39 §	14.09 ± 2.83	22.74 ± 1.29 *	11.63 ± 2.17	11.51 ± 2.01§
18:2(n-6)	16.44 ± 1.22	23.34 ± 1.19 *	9.42 ± 1.17 §	8.25 ± 1.21§	16.40 ± 0.67	27.66 ± 1.92 *	10.87 ± 0.94§	11.74 ± 0.81 §
20:4(n-6)	17.21 ± 1.22	10.47 ± 0.28*	8.58 ± 0.93 §	7.71 ± 0.85	28.58 ± 0.14	11.76 ± 0.30*	9.26 ± 1.12 §	10.31 ± 1.64
20:5(n-3)	1.84 ± 0.06	1.19 ± 0.02*	17.20 ± 1.63 §	15.14 ± 2.44 §	3.46 ± 1.42	0.98 ± 0.2*	13.82 ± 1.05§	15.35 ± 1.85 §
22:6(n-3)	1.94 ± 0.18	0.88 ± 0.04*	5.74 ± 0.80 §	4.93 ± 0.92 §	5.56 ± 1.31	1.86 ± 0.20*	8.59 ± 2.23 §	11.01 ± 2.45§

Chaque valeur représente la moyenne ± ES, n = 6. La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test « t » de student.

→ \* (p < 0,05) ; \* \* (p < 0,01) : Différence significative, témoins versus diabétiques pour chaque régime.

→ § (p < 0,05) ; §§ (p < 0,01) : Différence significative, régime Isio versus régime Epax.

Tableau III: Composition en acides gras des lipides hépatiques des rates diabétiques recevant le régime Isio ou Epax comparées à leurs témoins, à j12 et j21 de la gestation

lot Acides gras %	j 12				j 21			
	Rats témoins isio	Rats diabétiques isio	Rats témoins Epax	Rats diabétiques Epax	Rats témoins isio	Rats diabétiques isio	Rats témoins Epax	Rats diabétiques Epax
Acides gras saturés	35.13± 2.57	42.43± 1.84 *	32.61± 2.41 §	30.61± 1.95 §	32.62± 2.81	38.65 ± 7.34*	35.16± 2.21	36.23± 1.65
18:1	16.31± 1.29	24.55± 2.09*	15.30± 2.37	12.85± 2.30 §	14.85± 3.63	22.45± 5.259 *	7.13± 1.17§	7.1942± 1.07 §
18:2(n-6)	12.62± 2.25	20.08± 2.46 *	14.84± 2.04	16.12± 1.17 §	12.97± 1.54	16.65± 2.82 *	11.60± 1.82	13.85± 2.68
20:4(n-6)	16.15± 2.083	10.70± 1.14 *	8.97± 1.81 §	10.13± 1.73	23.40± 1.42	19.28± 1.39*	13.59± 1.48 §	12.04± 1.36 §
20:5(n-3)	3.15± 0.774	0.807± 0.068 *	17.54± 1.62§	16.12± 1.73§	2.34± 0.16	0.48± 0.145*	10.38± 2.43 §	12.67± 2.12 §
22:6(n-3)	3.24± 0.652	0.506± 0.064*	8.13± 1.67 §	12.20± 1.84 *§	6.39± 1.95	1.748± 0.78*	19.51± 2.02 §	17.65± 1.76 §

Chaque valeur représente la moyenne ± ES, n = 6. La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test « t » de student.

• \* (p<0,05) ; \* \* (p<0,01) : Différence significative, témoins versus diabétiques pour chaque régime.

• § (p<0,05) ; §§ (p<0,01) : Différence significative, régime Isio versus régime Epax.

augmentent, et le C20 :4 (n-6), le C20 :5 (n-3) et le C22 :6 (n-3) diminuent significativement chez les mères diabétiques recevant le régime Isio par rapport à leurs témoins. La consommation du régime Epax entraîne par rapport au régime Isio, une diminution significative du C18 :2 (n-6) et du C20 :4 (n-6) et une élévation du C20 :5 (n-3) et du C22 :6 (n-3) chez les témoins, et de même chez les diabétiques sauf pour l'acide arachidonique qui reste similaire, et le C18 :1(n-9) qui diminue.

Au niveau hépatique (tableau III), les variations des taux d'acides gras notées à j12 sont similaires à celles observées au niveau du sérum. De plus, une augmentation du taux d'AGS est notée chez les diabétiques Isio par rapport aux témoins. Le régime Epax entraîne une diminution significative du taux d'AGS et une augmentation du C20 :5 (n-3) et du C22 :6 (n-3) chez les témoins et les diabétiques par rapport au régime Isio. A j21, les AGS saturés, C18 :1 (n-9) et C18 :2 (n-6) augmentent chez les diabétiques Isio par rapport aux témoins. Par contre, les C20 :4 (n-6), C20 :5 (n-3) et C22 :6 (n-3), sont significativement diminués chez ces rats. Comparé au régime Isio, le régime Epax tend à diminuer les taux en C18 :1(n-9) et C20 :4 (n-6), et à augmenter ceux en C20 :5 (n-3) et C22 :6 (n-3) chez les témoins et les diabétiques.

### **VIII.2. Chez la progéniture (tableau IV et V)**

A j0, les AGS et le C20 :4 (n-6) des lipides sériques (tableau IV) sont significativement élevés alors que les C18 :2 (n-6) et C22 :6 (n-3) sont significativement diminués, chez les nouveau-nés macrosomiques Isio par rapport aux témoins. Chez les nouveau-nés du régime Epax, les variations sont non significatives. A j60 et j90, la macrosomie entraîne en général pour le régime Isio, une augmentation du C18 :2 (n-6) et une diminution du C20 :4 (n-6), du C20 :5 (n-3) et du C22 :6 (n-3). Le régime Epax diminue les taux en C18 :1(n-9), C18 :2 (n-6) et en C20 :4 (n-6), et augmente les pourcentages en C20 :5 (n-3) et C22 :6 (n-3).



Au niveau du foie (tableau V), les mêmes variations sont notées en général qu'au niveau du sérum, de la naissance et jusqu'à l'âge adulte (j90).

Tableau IV: Composition en acides gras des lipides sériques des ratsons macrosemiques recevant le régime Isio ou Epax comparées à leurs témoins, à la naissance (j0), à j60 et à l'âge adulte (j90).

lot Acides gras%	J0				J60				J90			
	Rats témoins isio	Rats obèses isio	Rats témoins Epax	Rats obèses Epax	Rats témoins isio	Rats obèses isio	Rats témoins Epax	Rats obèses Epax	Rats témoins isio	Rats obèses isio	Rats témoins Epax	Rats obèses Epax
Acides gras saturés	30.26± 1.25	42.07± 1.01 *	29.39± 1.72	27.25± 2.44 §	41.96 ± 2.19	42.39 ± 1.94	40.6 ± 1.697	40.54 ± 1.72	34.69 ± 1.14	35.2 ± 1.35	36.15 ± 1.750	36.85 ± 2.16
18:1	12.35± 1.61	14.32± 2.28	12.39± 1.64	13.85± 1.68	13.71 ± 1.38	13.68 ± 1.08	13.05 ± 1.77	13.01 ± 1.39	16.60 ± 2.14	18.43 ± 1.54	15.09 ± 1.35	14.72 ± 1.96§
18:2(n-6)	14.43± 1.56	8.05± 1.87 *	11.48± 1.85	10.28± 2.67	15.16 ± 2.11	22.03 ± 1.1*	13.24 ± 1.98	12.59 ± 1.21§	17.07 ± 1.92	18.50 ± 1.05	12.67 ± 1.22 §	12.45 ± 1.116 §
20:4(n-6)	14.55± 2.21	19.85± 12.66 *	12.39± 2.39	11.97± 1.37§	24.75 ± 1.37	18.09 ± 1.30*	10.53 ± 1.25 §	11.22 ± 1.21§	24.60 ± 1.04	21.75 ± 0.52 *	13.47± 0.87 §	12.28 ± 1.35§
20:5(n-3)	2.08± 0.46	1.92± 0.35	10.23± 2.21 §	12.32± 1.78 §	1.62± 0.65	0.94 ± 0.34*	13.80 ± 1.23 §	15.56 ± 2.10 §	0.92 ± 0.32	0.73 ± 0.08 *	14.43 ± 1.64 §	11.91 ± 2.5 §
22:6(n-3)	7.45± 0.15	4.39± 0.38*	14.81± 0.82 §	15.02± 0.94 §	2.65 ± 0.98	1.06 ± 0.67*	8.95 ± 0.76 §	9.68 ± 0.73 §	3.08 ± 0.83	1.36 ± 0.69 *	10.05 ± 0.95 §	9.75 ± 1.37 §

Chaque valeur représente la moyenne ± ES, n = 6. La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test « t » de student.

• \* (p < 0,05) ; \* \* (p < 0,01) : Différence significative, témoins versus macrosemiques pour chaque régime.

§ § (p < 0,05) ; § § § (p < 0,01) : Différence significative, régime Isio versus régime Epax.

Tableau V : Composition en acides gras des lipides hépatiques des rats macroscopiques recevant le régime Isio ou Epax comparées à leurs témoins, à la naissance (j0), à j60 et à l'âge adulte (j90).

lot Acides gras %	J0				J60				J90			
	Rats témoins isio	Rats obèses isio	Rats témoins Epax	Rats obèses Epax	Rats témoins isio	Rats obèses isio	Rats témoins Epax	Rats obèses Epax	Rats témoins isio	Rats obèses isio	Rats témoins Epax	Rats obèses Epax
Acides gras saturés	32.63± 2.29	37.29± 1.41*	34.72± 2.42	35.05± 2.08	34.25± 1.45	45.83± 2.991*	32.24± 2.39	34.49± 2.38 §	36.70± 2.02	47.42± 1.39 *	36.72± 1.67	38.81± 2.25 §
18:1	23.57± 2.68	28.45± 3.15 *	14.43± 2.42 §	16.18± 1.88 §	15.28± 1.79	17.06± 1.642	13.49± 1.88	12.76± 1.657 §	14.11± 1.02	18.15± 1.62 *	9.55± 1.20 §	9.27± 1.29 §
18:2(n-6)	10.3± 1.41	8.80± 1.05 *	11.17± 1.31	10.01± 2.48	14.31± 2.52	15.31± 1.406	11.82± 2.44	10.78± 1.32 §	14.04± 1.96	15.08± 1.36	13.54± 1.70	14.32± 1.93
20:4(n-6)	10.52± 1.41	13.19± 2.38 *	9.85± 1.54	10.78± 2.57	21.55± 1.74	22.8± 1.283	11.99± 1.09 §	10.05± 1.91 §	28.74± 1.82	22.57± 1.74 *	13.42± 1.66 §	12.77± 1.64 §
20:5(n-3)	1.29± 0.36	1.05± 0.49	8.49± 1.22 §	9.91± 1.75 §	0.89± 0.19	1.92± 0.49*	15.74± 2.28 §	18.08± 2.76 §	1.48± 0.40	1.18± 0.21	17.04± 2.46 §	14.83± 2.21 §
22:6(n-3)	8.20± 0.43	5.99± 0.91*	14.81± 2.22 §	12.07± 1.94 §	3.07± 0.97	5.98± 1.39 *	9.24± 1.30 §	10.08± 1.36 §	4.73± 1.56	6.01± 1.75	15.71± 1.49 §	16.78± 1.41 §

Chaque valeur représente la moyenne ± ES, n = 6. La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test « t » de student.

∞ • \* (p < 0,05) ; \* \* (p < 0,01) : Différence significative, témoins versus macroscopiques pour chaque régime.

‡ • § (p < 0,05) ; §§ (p < 0,01) : Différence significative, régime Isio versus régime Epax.

## **Statut antioxydant**

### **I. Teneurs en vitamines A, C et E (fig 30 et 31)**

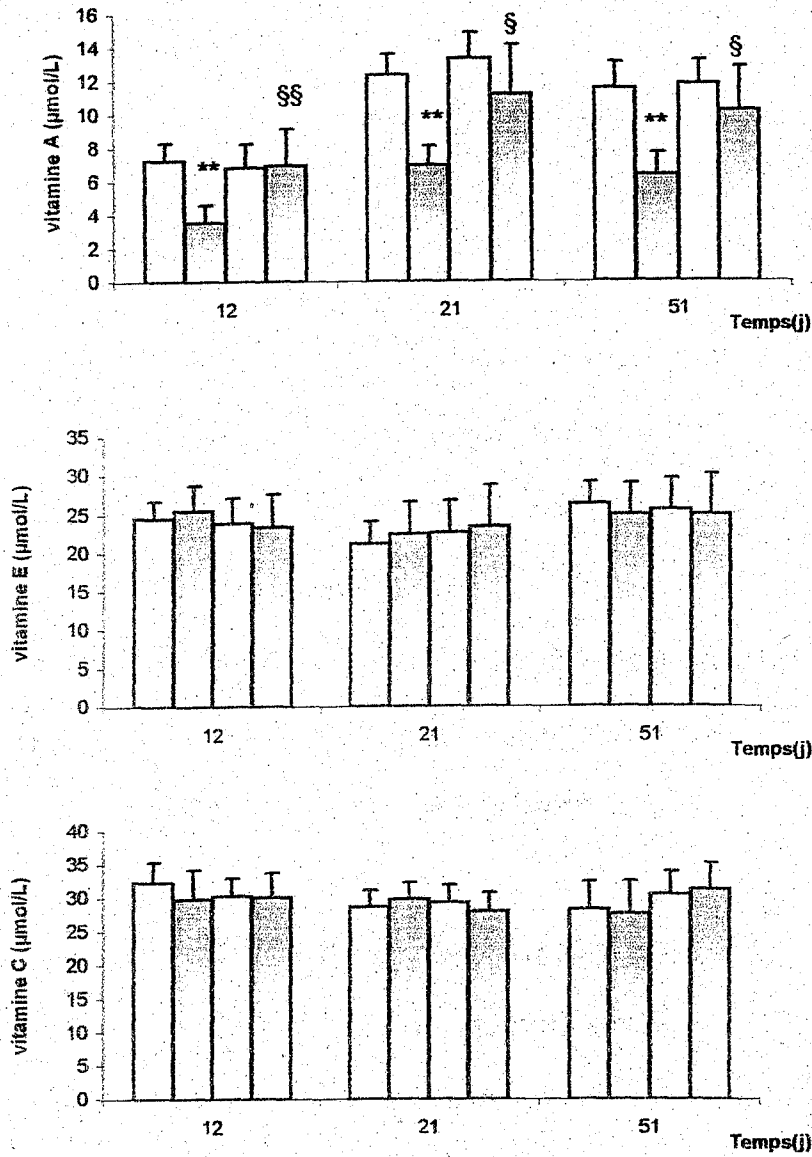
Chez les mères (fig 30), les teneurs en vitamine C et E ne varient pas significativement chez les différents lots de rates. Par contre, la vitamine A montre une diminution d'environ 50%, à j12, 21 et 51 chez les rates diabétiques comparées aux témoins. Les rates diabétiques consommant le régime Epax, ne montrent aucune variation de leurs taux en vitamine A par rapport à leurs témoins, et une augmentation d'environ 40% à 50% par rapport aux rates diabétiques du régime Isio aux différents temps.

Chez la progéniture (fig 31), les teneurs en vitamines A et E augmentent avec l'âge. De j0 à j90, l'augmentation est évaluée à 2,5 fois pour la vitamine A, et de 4,5 fois pour la vitamine E. Les rats macrosomiques montrent des teneurs en vitamine C et E similaires à celles des témoins, quels que soient l'âge et le régime. Les teneurs en vitamine A sont diminuées chez les macrosomiques Isio, et sont augmentées par le régime Epax quelque soit l'âge des rats.

### **II. pouvoir antioxydant total (ORAC), teneurs plasmatiques en hydroperoxydes et en protéines carbonylées (fig 32 et 33)**

La capacité du sérum à absorber les radicaux libres (ORAC) est significativement diminué chez les rates diabétiques (fig 32) et leurs progénitures macrosomiques (fig 33) à tout les temps, comparées à leurs témoins respectifs. L'Epax entraîne une augmentation significative de l'ORAC chez les rates diabétiques et chez les rats macrosomiques par rapport au régime Isio.

Les variations des teneurs plasmatiques en hydroperoxydes et en protéines carbonylées sont augmentées chez les mères diabétiques (fig 32) et chez leurs progénitures obèses (fig33) comparés à leurs témoins respectifs, quelque soit l'âge et le régime. Néanmoins, le régime Epax entraîne une diminution des taux en hydroperoxydes et en protéines



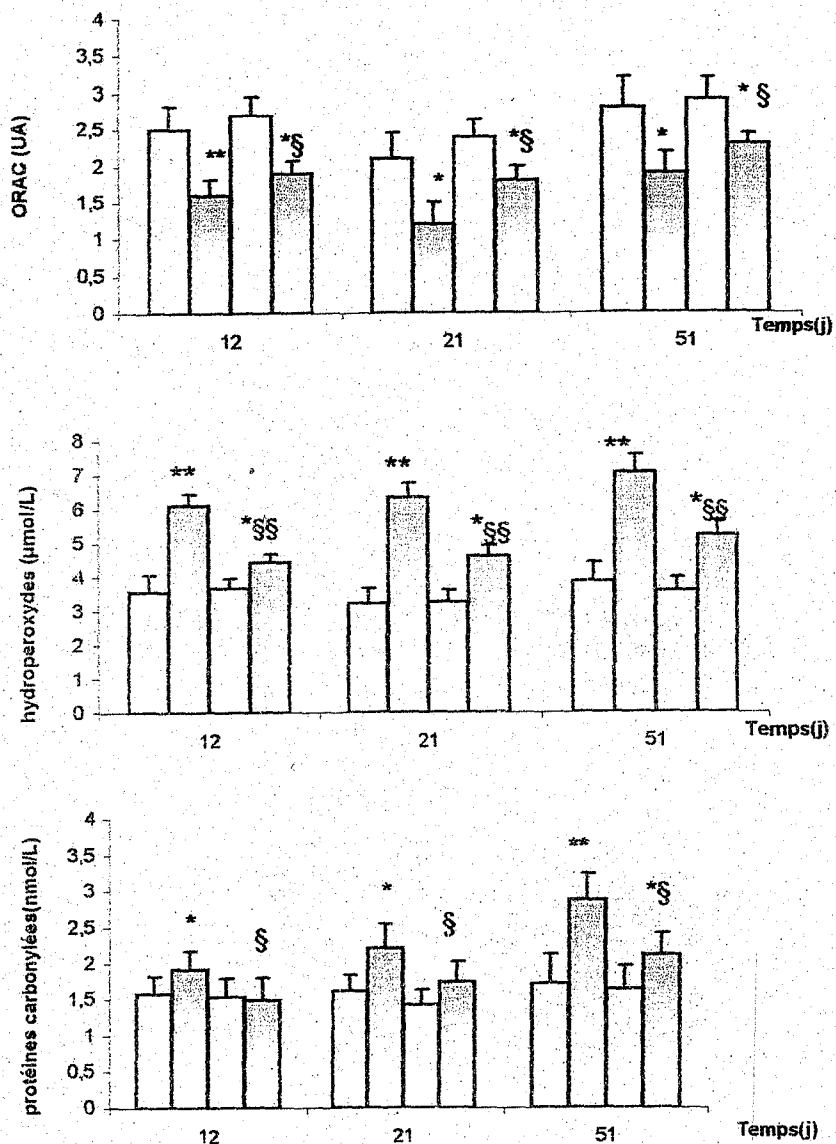
□ Témoins-Isio □ Diabétiques-Isio □ Témoins-Epax □ Diabétiques-Epax

**Fig 2 :** Niveaux sériques en vitamines A, C et E chez les mères diabétiques et témoins recevant le régime Isio ou Epax

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=6 La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student

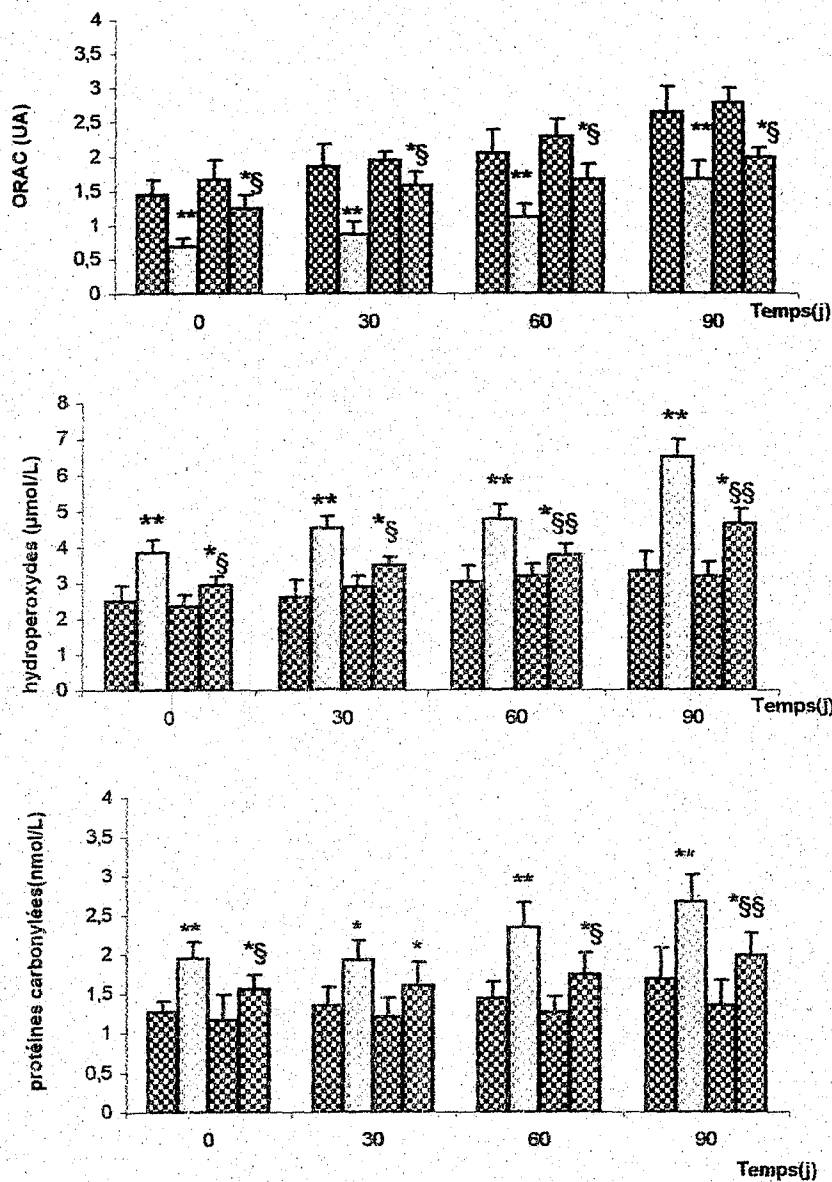
\* (P<0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques pour chaque régime

§ (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX



□ Témoins-Isio □ Diabétiques-Isio □ Témoins-Epax □ Diabétiques-Epax

**Fig.** Pouvoir antioxydant total (ORAC), teneurs plasmatiques en hydroperoxydes et en protéines carbonylées, chez les mères diabétiques et témoins recevant le régime Isio ou Epax, UA: unité arbitraire, Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=6. La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques pour chaque régime § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX



Témoins-Isio
  obèses-Isio
  Témoins- Epax
  obèses-Epax

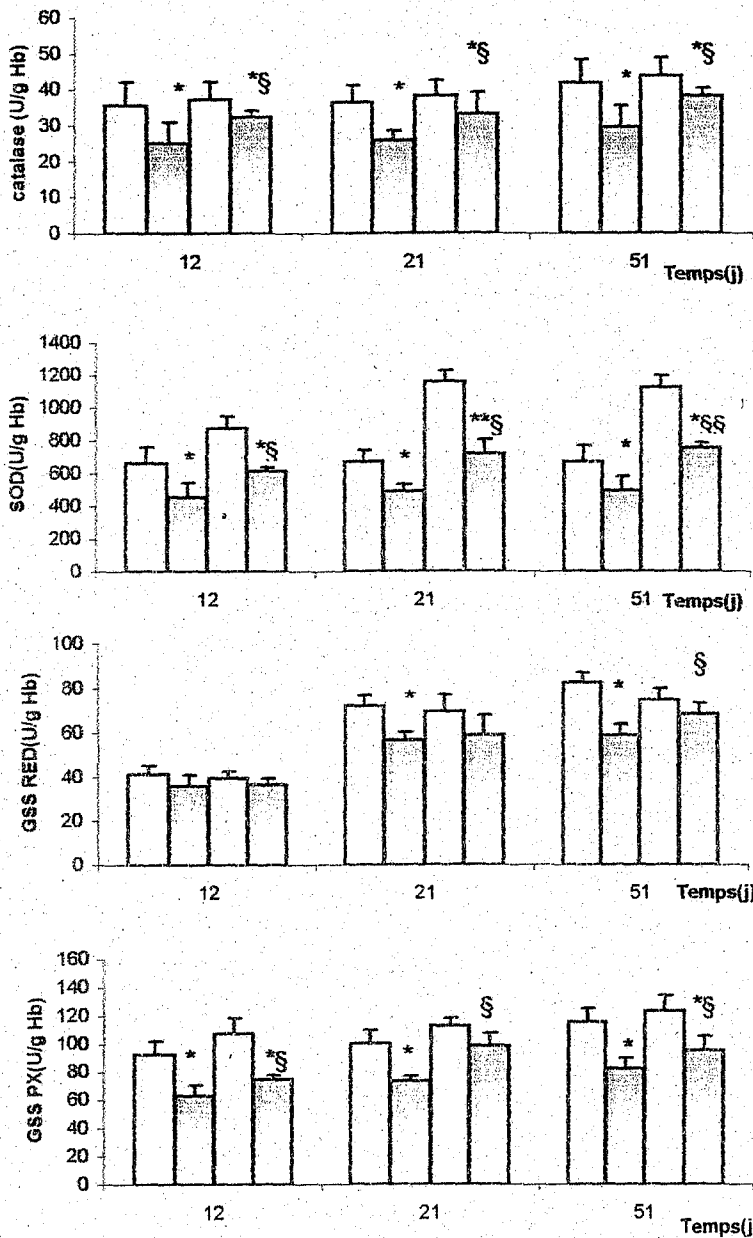
**Fig** : pouvoir antioxydant total (ORAC), teneurs plasmatiques en hydroperoxydes et en protéines carbonylées, chez les rats macrosomiques et témoins recevant le régime Isio ou Epax, UA: unité arbitraire, Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=6 La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \*(P<0.05) Différence significative entre témoins et macrosomiques pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX



carbonylées, chez les mères diabétiques et chez les rats macrosomiques comparés au régime Isio.

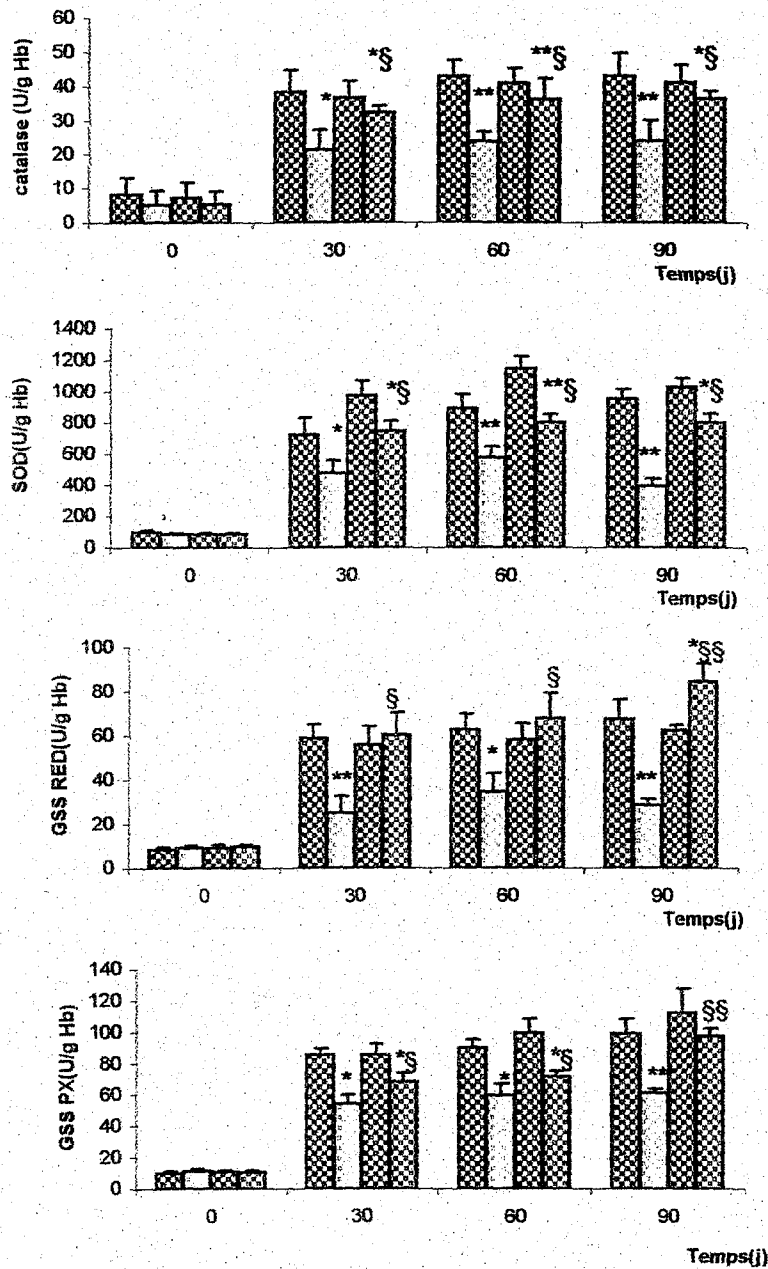
### **III. Activités des enzymes érythrocytaires antioxydantes (fig 34 et 35)**

Les enzymes antioxydantes, la catalase, la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion réductase (GSS RED) et la glutathion peroxydase (GSS PX), sont généralement diminuées chez les mères diabétiques à j12, j21 et j51 pour les deux régimes (fig 34). Chez les rats macrosomiques, ces activités enzymatiques sont également diminuées à j30, j60 et j90 (fig 35), quelque soit le régime, à l'exception de la GSS RED dont l'activité est augmentée chez les macrosomiques, nourris au régime Epax comparés à leurs témoins à j90. En comparant le régime Epax au régime Isio, une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes est notée chez les mères diabétiques et chez les rats macrosomiques de j30 à j90.



□ Témoin-Isio □ Diabétiques-Isio □ Témoin-Epax □ Diabétiques-Epax

**Fig 5 :** Activités des enzymes érythrocytaires antioxydantes chez les mères diabétiques et témoins recevant le régime Isio ou Epax  
 SOD: Superoxyde dismutase; GSS-RED: Glutathion réductase;  
 GSS-PX: Glutathion peroxydase; U/g Hb= Unités par gramme d'hémoglobine  
 Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES, n=6 La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student  
 \* (P<0.05) Différence significative entre témoins et diabétiques pour chaque régime  
 § (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX



■ Témoins-Isio    □ obèses-Isio    ▨ Témoins-Epax    ▩ obèses-Epax

**Fig 3** : Activités des enzymes érythrocytaires antioxydantes chez les rats macrosomiques et témoins recevant le régime Isio ou Epax

SOD: Superoxyde dismutase; GSS-RED: Glutathion réductase; GSS-PX: Glutathion peroxydase; U/g Hb= Unités par gramme d'hémoglobine  
Chaque valeur représente la moyenne ± ES, n=6 La comparaison des moyennes entre les différents groupes de rats est effectuée par le test t de Student

\* (P<0.05) Différence significative entre témoins et macrosomiques pour chaque régime  
§ (P<0.05) Différence significative entre ISIO et EPAX

## **DISCUSSION**

Cette dernière décennie, un intérêt considérable a été porté sur les facteurs affectant le développement fœtal dont résultent des maladies chroniques incluant l'obésité, le diabète et l'athérosclérose. En effet, plusieurs études ont montré que le diabète gestationnel est la cause majeure des altérations du métabolisme lipidique et du développement de l'obésité chez la progéniture (BOULANGE et al., 1981 ; DORNER et PLAGEMANN, 1994 ; PRIBYLOVA et DVORAKOVA, 1996 ; PLAGEMANN et al., 1997 ; SCHWARTZ et TERAMO, 2000 ; MERZOUK H. et al., 2000 ; JONES, 2001 ; CAMPOS, 2004). Aussi, il a été constaté que ces maladies métaboliques entraînent des troubles du système antioxydant (BONNEFONT-ROUSSELOT et al., 2000 ; MERZOUK H. et al., 2003 ; HIGDON, FREI, 2003 ; MERZOUK H. et al., 2004).

Par ailleurs, plusieurs études se sont intéressées aux acides gras polyinsaturés de la famille n-3 (particulièrement l'EPA et le DHA), et leurs bienfaits entre autres sur les dyslipidémies (HARRIS, 1989 ; BERRY, 1997 ; LICHTENSTEIN, 1998 ; AILHAUD et GUESNET, 2003 ; SOULIMANE et al., 2005), et sur les troubles du système antioxydant (HUNKAR et al., 2002 ; YILMAZ et al., 2002 ; MERZOUK H. et KHAN, 2003). Afin de compléter les recherches réalisées chez l'homme, nous avons utilisé un modèle animal du diabète gestationnel et de la macrosomie fœtale. Notre étude traite deux principaux volets:

- Il s'agit en premier lieu de mettre en évidence les perturbations métaboliques majeures (dyslipidémie et statut oxydatif) qu'engendre le diabète chez la mère gestante et ses répercussions sur la progéniture macrosomique.
- Ensuite de tester l'effet des acides gras polyinsaturés n-3 sur ces principales altérations, chez les mères au cours de la gestation et jusqu'à 1 mois après la mise bas d'une part, et chez les nouveau-nés macrosomiques dès la naissance et jusqu'à l'âge adulte d'autre part.

Nos résultats montrent que les nouveau-nés des mères diabétiques sont macrosomiques et que cette macrosomie est plus prononcée pour le régime Isio que pour l'Epax. Ceci s'explique par le fait que l'injection de la streptozotocine à 40mg/kg de poids corporel au 5<sup>ème</sup> Jour de la gestation, provoque chez les mères Isio une hyperglycémie de  $15.20 \pm 2.10\text{mM}$ , alors que celle du régime Epax est modérée ( $8.80 \pm 0.21\text{mM}$ ) ce qui diminue la prévalence de la macrosomie.

L'hyperglycémie de la mère entraîne chez le fœtus une hyperglycémie et un hyperinsulinisme (causes majeures de la macrosomie) associés au développement de l'intolérance au glucose, à l'obésité et au diabète, au cours de l'enfance et l'âge adulte (PEDERSEN ET OSTER, 1961; HILL, 1978 ; STEVENSON et al., 1982 ; BERK et al., 1989 ; DORNER et al., 1994 ; PRIBYLOVA, 1996 ; PLAGEMANN et al., 1997 ; JENSEN et al., 2001 ; WASIKOWA et al., 2005). De plus l'hyperinsulinisme des nouveau-nés macrosomiques des deux régimes montre que la STZ injectée à la mère au 5<sup>ème</sup> jour de la gestation n'a pas d'effet destructeur sur le pancréas foetal mais l'hyperglycémie maternelle conduit à une hyperglycémie foetale qui va stimuler les cellules pancréatiques, entraînant une hyperinsulinémie foetale (OH et al., 1988). Ces résultats sont en accord avec ceux de MERZOUK et al. (2001, 2003).

L'insuline est la principale hormone anabolisante au cours du développement foetal, elle stimule la croissance du fœtus en stimulant la synthèse des protéines, du glycogène et des graisses (HILL, 1978 ; SUSA et SHWARTZ, 1985), ce qui aboutit à une augmentation de l'adiposité, de la masse musculaire et à une organomégalie généralisée (HILL, 1978 ; COWETT ET SHWARTZ, 1982). D'après certains auteurs, les rats obèses sont caractérisés par une période de grande sensibilité à l'insuline *in utero* (OH et al., 1988 ; GELARDI et al., 1990 ; 1991 ; MERZOUK H. et al., 2001). L'augmentation de la sensibilité tissulaire à l'insuline est secondaire au conditionnement de la cellule B pancréatique *in utero* et la persistance d'un nombre élevé de récepteurs à l'insuline et/ou l'augmentation de la fixation de

l'insuline aux cellules cibles. Ceci peut expliquer le développement postnatal de l'obésité chez les nouveaux nés

De nombreux travaux, réalisés chez l'homme, rapportent que l'obésité définie par un excès de masse grasse, s'accompagne très souvent d'une insulino-résistance et de son corollaire, l'hyperinsulinisme (REAVEN, 1988 ; BJOMTORP, 1991).

La croissance postnatale est également accélérée et la macrosomie persiste jusqu'à l'âge adulte, ce qui est en accord avec les résultats de OH et al. (1988) ; GELARDI et al. (1990 et 1991) ; MERZOUK H. et al. (2001 et 2003).

Les rats obèses sous régime Epax présentent une diminution du poids corporel, ainsi qu'une diminution de l'hyperglycémie à partir de j60 et de l'hyperinsulinémie à j90, comparés aux rats obèses nourris par le régime Isio. Ces résultats soulignent l'effet bénéfique du régime Epax. De nombreuses études ont démontré qu'un régime enrichi en AGPI n-3 induit une variation de la balance énergétique et du poids corporel entraînant une réduction de l'obésité (STORLIEN et al., 1987). CUNNANE et al. (1986) ont montré chez la souris ob/ob qu'un régime à base d'huile de poisson entraîne une réduction de gain de poids comparé à un régime enrichi en AGPI n-6.

D'autres études effectuées chez le rat ont montré que l'huile de poisson a un effet bénéfique sur l'insulino-résistance, entraînant une prévention totale du développement de la résistance à l'insuline induite par les régime riches en AGS (CUNNANE et al., 1986., STORLIEN et al., 1987; STORLIEN et al., 1991). De plus, les AGPI réduisent l'utilisation du glucose périphérique chez les rats (LARDINOIS et STARICH, 1991).

L'installation de l'obésité dépend de l'apport nutritionnel et du bilan énergétique qui doit dépasser les besoins. Pour étudier ceci et vérifier que les deux régimes (particulièrement l'Epax) sont bien assimilés par les rats, nous avons établi les bilans nutritionnels.

Les résultats montrent que malgré une prise alimentaire similaire entre les 4 groupes de rats et donc un apport énergétique égal, le rapport d'efficacité nutritionnelle (REN), le CUDn et les bilans azotés (BA) sont augmentés chez les obèses Isio par rapport à leurs témoins. Ceci affirme que la macrosomie n'est pas due à une suralimentation mais plutôt à une perturbation métabolique plus profonde. Ces résultats sont en accord avec ceux de OH et al. (1991) qui notent que la prise alimentaire des rats obèses ne diffère pas de celles des témoins. De plus, nous avons constaté que les rats obèses sont moins actifs que les témoins et donc dépensent moins d'énergie.

De BII à BIV, l'azote urinaire diminue chez les obèses Isio par rapport aux témoins malgré la similitude de l'azote ingéré chez ces mêmes rats, ce qui contribue à l'élévation des CUDn et des BA d'une part, et témoigne d'une meilleure utilisation métabolique de l'azote et d'une meilleure rétention azotée chez les obèses d'autre part. Ceci est en faveur d'une augmentation des synthèses protéiques et / ou une diminution de la dégradation des protéines. Ces résultats sont confirmés par l'augmentation des teneurs en protéines des différents tissus (MERZOUK et al., 2000).

La diminution de l'azote urinaire chez les rats obèses Isio peut être dû d'un côté, à la réduction du taux d'urée observée chez les obèses Isio, et d'un autre côté une réduction de l'azote uréique. Dans l'azote urinaire, l'azote uréique représente la fraction la plus importante. La diminution de l'azote uréique chez les rats obèses résulte probablement de la réduction de la quantité de substrat ( $\text{NH}_3$ ), issu de la désamination oxydative des acides aminés, ce qui est le signe de leur meilleure utilisation pour les synthèses protéiques.

Les valeurs similaires de créatinine urinaire chez tous les groupes de rats affirment que l'azote excrété est bien d'origine exogène (alimentaire), car la créatinine est formée dans l'organisme par déshydratation non enzymatique de la créatine synthétisée par le foie et stockée dans les



muscles (LACOUR, 1992), donc une augmentation de la créatinine dans les urines refléterait une dégradation des protéines endogènes.

Par ailleurs l'azote fécal qui correspond à l'azote alimentaire non absorbé mais aussi à l'azote endogène, diminue également chez les obèses Isio, ce qui confirme la rétention azotée.

Chez les obèses du régime Epax, le taux d'azote urinaire (également le taux d'urée) et fécal est plus important que celui des rats obèses du régime Isio, et donc similaire à celui des témoins, ce qui entraîne chez ces rats, un CUD<sub>n</sub> et des BA plus faibles par rapport aux rats obèses Isio et identiques que ceux des témoins. Ainsi le régime Epax a tendance à régulariser l'efficacité de synthèse et la dégradation des protéines chez les rats obèses.

Les lipides ingérés sont identiques chez les obèses par rapport aux témoins, alors que leur excrétion fécale est plus faible chez les obèses Isio de BI à BIV, et chez les obèses Epax de BII à BIV, ce qui entraîne une élévation du CUD<sub>L</sub> chez ces rats. Ceci va dans le même sens que la macrosomie puisque l'absorption intestinale des lipides est majorée chez les obèses, une meilleure efficacité nutritionnelle (REN) est obtenue, ce qui favorise une plus forte croissance pondérale. Cependant, une diminution de CUD<sub>L</sub> est notée chez les obèses Epax comparés aux obèses Isio, ce qui mène à une diminution du REN chez ces rats. Ceci explique également la différence du poids corporel entre les rats obèses Epax et Isio.

Ces différents résultats, liés à la macrosomie, montrent que les deux régimes Isio et Epax sont bien assimilés et que leur mise en réserve est augmentée, en dépit d'une consommation alimentaire similaire à celle des témoins.

En accord avec plusieurs études (KNOPP et al., 1986 ; OH et al., 1988 ; GELARDI et al., 1990 ; SCHWARTZ et al., 2000 ; KING, 2000 ; JONES et al., 2001 ; MERZOUK H. et al., 2003), nous avons observé que le diabète maternel induit des altérations du métabolisme des lipides et lipoprotéines chez les rates gestantes et leurs progénitures.

Chez les mères à j12 de la gestation et à un mois après (j51), et chez les nouveau-nés de la naissance à l'âge adulte (J0 – J90), les poids relatifs du foie et du tissu musculaire ne présentent pas de variations chez les rats diabétiques (mères) ou obèses (progéniture) quelque soit le régime consommé, alors que celui du tissu adipeux est significativement diminué chez les diabétiques du régime Isio à j12 et j21, et augmenté chez les obèses des deux régimes quelque soit leur âge.

Ceci souligne le caractère précoce de l'installation de l'obésité chez les rats nourris par le régime Isio et Epax comparés à leurs témoins respectifs, et est en accord avec les résultats de COMMERFORD et al. (2001) qui ont noté une élévation de 49% du poids du tissu adipeux chez des rats obèses par rapport aux rats non obèses.

Des auteurs (GELARDI et al., 1990 ; 1991 ; FRAYN et COPPACK, 1992 ; BERRY, 1997) ont établi que le développement de l'obésité foetale est dû à une grande sensibilité à l'insuline, pendant que l'obésité à l'âge adulte est maintenue grâce au développement d'une insulino-résistance.

L'insuline, qui est l'hormone pivot dans la sphère glucidique, joue un rôle essentiel dans le métabolisme des lipides. En effet, l'insuline module l'activité de plusieurs enzymes clés du métabolisme lipidique et intervient dans la production et le catabolisme des lipoprotéines. Pour cette raison, il est facile de comprendre que toute situation au cours de laquelle l'action de l'insuline est altérée, telle l'insulino-résistance ou la déficience en insuline, s'accompagne d'anomalies lipidiques souvent importantes, contribuant au développement accéléré de lésions athéromateuses, et contribuant à accroître le risque cardiovasculaire (VERGES, 2001).

L'hyperinsulinisme intra-utérin induit l'augmentation de l'adiposité (VILEISIS et al., 1983 ; FOWDEN, 1989) qui entraîne à son tour un excès pondéral. Les mécanismes impliqués dans l'insulinorésistance chez l'obèse sont complexes :

L'insuline est un puissant inhibiteur de la lipase hormono-sensible. Elle agit en inhibant l'adénylate-cyclase, réduisant ainsi l'activité de la lipase du tissu adipeux. Ainsi l'insuline a un effet anti-lipolytique, favorisant le stockage des triglycérides dans l'adipocyte et réduisant le déversement d'acides gras libres dans la circulation. L'inhibition du relargage des acides gras libres dans la circulation, sous l'effet de l'insuline, a nettement été démontrée, *in vivo*, par plusieurs études utilisant les clamps hyperinsulinémiques (YKI-JARVINEN, TASKINEN, 1988). Le déficit en insuline (le cas des mères diabétiques) entraînerait donc une élévation de l'activité de la lipase tissulaire et une inhibition de la LPL. Ceci induit une diminution des teneurs en lipides totaux au niveau du tissu adipeux, ce qui peut expliquer la diminution du poids relatif du tissu adipeux observée chez les mères diabétiques. Par contre une augmentation des lipides totaux au niveau du foie est notée chez les mères diabétiques. Celle-ci est induite par l'élévation du CT, des TG et des PL au niveau du foie. Alors que chez les rats macrosomiques, on note une élévation des lipides totaux au niveau du tissu adipeux à partir de j30, et ceux du foie à partir de j60 représentés par une augmentation de CT, des TG et des PL.

Ces résultats concordent avec les travaux de SHAFRIR et BARASH (1987), et HERRERA et al. (2006), qui montrent que l'activité de la lipase intracellulaire placentaire est élevée chez la rate diabétique, ce qui augmente l'hydrolyse des TG maternels et la captation des AG par le placenta, et par la suite leur libération dans la circulation fœtale. Ces acides gras sont alors captés par le foie où ils contribuent à la synthèse des TG. En effet, chez la rate gestante diabétique, les teneurs sériques en TG et en AGL maternels sont corrélées positivement avec les teneurs fœtales en triglycérides (GOLDSTEIN et al., 1985).

L'insuline est un puissant activateur de la lipoprotéine lipase, principale enzyme responsable du catabolisme des lipoprotéines riches en TG, elle la stimule en augmentant directement son activité (TASKINEN et al. 1992). Par ailleurs, il est observé, sous l'effet de l'insuline, une augmentation de l'ARN messager de la LPL dans le tissu adipeux, témoignant d'un effet positif direct de l'insuline sur la synthèse de la LPL (FRIED et al. 1993).

Les travaux de SHAFRIR et al. (1982 et 1987) notent que les teneurs sériques en TG et en AGL sont augmentées chez la rate gestante diabétique. Ceci entraîne une augmentation du transfert transplacentaire des acides gras vers le fœtus qui, en plus de l'augmentation du transfert transplacentaire du glucose et l'hyperinsulinisme fœtal, peut être à l'origine de la stimulation de la production hépatique des TG. Chez les nouveau-nés macrosomiques hyperglycémiques, le glucose capté par le foie en grande quantité, est soit stocké sous forme de glycogène hépatique, soit dégradé par la voie de la glycolyse et la voie des pentoses. La dihydroxyacétone phosphate et le pyruvate, produits de la glycolyse, constituent des substrats pour la synthèse des AG et des lipides. La formation du NADPH par la voie des pentoses est aussi essentielle pour cette synthèse.

L'accumulation progressive des triglycérides dans le tissu adipeux aboutit à une saturation lipidique des adipocytes qui deviennent moins sensibles à l'action principale de l'insuline, à savoir l'entrée du glucose et sa conversion en lipides (OLEFSKY, 1977 ; KISSEBAH et al., 1989). De plus, ces adipocytes montrent non seulement une diminution du nombre et de l'affinité des récepteurs à l'insuline, mais aussi une réduction des activités enzymatiques impliquées dans la conversion du glucose en AG et en TG (KOLTERMAN et al., 1980 ; KISSEBAH et al., 1989 ). Une réduction de l'activité de l'enzyme acyl CoA carboxylase et une inhibition de la voie des pentoses phosphates sont aussi observées, ce qui diminue la synthèse des AG dans les adipocytes déjà très riche en lipides (RICHARDSON & CZECH, 1978 ). Ces mêmes mécanismes de rétrocontrôle de la lipogenèse adipocytaire ont été mis en

évidence par GELARDI et al. (1990) chez les rats obèses, ils apparaissent à l'âge de 10 semaines.

Plusieurs auteurs montrent que l'activité des enzymes hépatiques de la glycolyse et de la lipogenèse est élevée chez le fœtus hyper insulinémique de rates diabétiques (MERZOUK H. et al ; 2000 ; 2002).

La LPL et la HTGL catalysent l'hydrolyse des TG et des PL et jouent un rôle important dans leur métabolisme intravasculaire (AILHAUD, 1990 ; OLIVECRONA et BENGTTSSON, 1990 ; BARRANS et al., 1994). Les molécules de LPL sont fixées sur la membrane des cellules vasculaires endothéliales, elles hydrolysent les TG des chylomicrons et des VLDL (OLIVECRONA et BENGTTSSON, 1990 ; BARRANS et al., 1994). De plus, l'augmentation de l'activité de la HTGL peut permettre de majorer la captation des AG par les hépatocytes après hydrolyse des PL et des TG des lipoprotéines, contribuant aussi à l'élévation des lipides hépatiques chez les mères diabétiques et les obèses adultes.

L'augmentation de l'activité LPL adipocytaire chez les macrosomiques dès j30 facilite la synthèse des TG à partir des AGL au niveau des adipocytes, et participe ainsi à l'excès du tissu adipeux observé chez ces rats. De plus, comme l'activité de la LPL musculaire est normale, alors que celle de l'adipocyte est élevée, cela facilite la mise en réserve de graisse dans le tissu adipeux des macrosomiques. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus chez le rat Zucker obèse (fa/fa) qui montre à l'âge de 4 semaines, un excès de tissu adipeux, avec une augmentation de l'activité LPL adipocytaire, alors que celle de la LPL musculaire reste similaire à celle des témoins (BOULANGE et al., 1981 ; BOIVIN, 2000).

Plusieurs études ont montré une forte corrélation entre le stockage des lipides et l'activité LPL au niveau du tissu adipeux (TASKINEN et NIKKILA, 1977 ; ECKEL, 1989). Une augmentation des activités LPL et HTGL doit être associée à une élévation du catabolisme des VLDL, donc entraîner une diminution de leur taux circulants.

Durant la gestation (j12 et j21), les rates diabétiques sous régime Isio présentent une augmentation des teneurs sériques en TG, CT et PL. Ces résultats sont corrélés à l'augmentation de synthèse et de sécrétion des lipoprotéines observée durant le diabète gestationnel (SHAFRIR et al., 1982 ; KNOPP et al., 1986, HERRERA et al. 2006). Chez ces femelles diabétiques, des concentrations plus élevées en oestrogènes peuvent expliquer l'augmentation des TG sériques et hépatiques, puisque les oestrogènes stimulent leur synthèse hépatique (WEINSTEIN et al., 1979, SCHAEFFER et al., 1983 ). En effet, l'augmentation des TG sériques s'accompagne de l'augmentation des VLDL. Elle dépend d'une surproduction hépatique des VLDL et parfois d'un déficit de leur catabolisme. En effet, en cas de déficience en insuline, comme c'est le cas chez les mères diabétiques, l'activité LPL est réduite. De plus l'hypertriglycéridémie est dépendante de l'hyperglycémie, c'est-à-dire que le glucose en excès dans le sang est transformé en acides gras et en triglycérides.

Ces perturbations s'étendent en général jusqu'au j51 (1 mois après la mise bas), et ceci est dû au déficit en insuline qui stimule la production hépatique des VLDL et réduit leur catabolisme. L'effet de cette hormone a été bien mis en évidence *in vitro* où il est observé, sous insuline, une diminution de la sécrétion d'apoB des VLDL dans des hépatocytes de rats (JACKSON et al. 1990) et dans des cultures d'hépatocytes humains (SALHANICK et al. 1991). L'effet inhibiteur de l'insuline sur la production hépatique de VLDL a aussi été mis en évidence *in vivo* ; il est observé chez le sujet sain, sous l'effet de l'insuline, une inhibition de la production de VLDL-TG (-67%) et de la production d'apoB des VLDL (-52%) (LEWIS et al. 1993). L'insuline réduit la production de VLDL, non seulement en diminuant le taux d'acides gras libres dans la circulation (limitant ainsi les substrats nécessaires à la formation des VLDL), mais aussi par un effet inhibiteur direct dans l'hépatocyte (MALMSTROM et al. 1998).

L'augmentation du taux de CT sériques chez les mères diabétiques du régime Isio est liée à un taux élevé de LDL. Ceci peut être expliqué par la déficience en insuline sachant que cette hormone facilite le catabolisme des LDL par une action directe sur leurs récepteurs (VERGES, 2001).

En effet, il a été montré *in vitro* que l'insuline augmentait l'activité des récepteurs aux LDL d'une part (CHAIT et al. 1979 ; MAZZONE et al. 1984), et leur nombre d'autre part (KRAEMER et al. 1994 ; STREICHER et al. 1996).

Par ailleurs, BROWN et GOLDSTEIN (2004) ont démontré qu'il existe une anomalie structurale des récepteurs des LDL chez les sujets diabétiques (qui reconnaît et fixe l'apo B<sub>100</sub>) qui deviennent incapables d'assurer la captation cellulaire des LDL, selon la place de mutation dans le gène du récepteur (Chromosome 19). Normalement le cholestérol qui entre dans la cellule par cette voie, est libéré dans le lysosome et sert d'inhibiteur du premier stade de la voie de biosynthèse intracellulaire du cholestérol. Si son entrée est rendue impossible, la synthèse endogène du cholestérol fonctionne sans limitation et ce cholestérol sort de la cellule pour aller accroître la cholestérolémie, déjà rendue anormalement élevée par la stagnation des LDL chez les sujets diabétiques (BROWN et GOLDSTEIN, 2004). Les implications thérapeutiques de la régulation des récepteurs LDL sont devenues apparentes lorsqu'une déficience dans les récepteurs LDL a été identifiée comme étant la cause sous-jacente de l'hypercholestérolémie familiale (GOLDSTEIN et BROWN, 1987).

Le déficit majeur en insuline est associé, à une diminution importante du catabolisme des LDL entraînant une augmentation du C-LDL. Cet effet est lié à la perte de l'effet positif de l'insuline sur le catabolisme des LDL (et sur l'activité des récepteurs). Enfin, il est observé une diminution importante du C-HDL. Celle-ci pourrait être éventuellement liée à une diminution de production des HDL, ou à l'augmentation de leur catabolisme, favorisée par leur enrichissement en TG (VERGES, 1999).

L'insuline intervient aussi dans le métabolisme des HDL (VERGES et al., 2000) ;

- En activant la LCAT (enzyme responsable de l'estérification du cholestérol au sein des particules HDL, participant ainsi à la transformation des HDL3 en HDL2),
- En réduisant l'activité de la PLTP,
- Et en modulant l'action de la lipase hépatique.

Des anomalies lipidiques précoces sont constatées dès le stade de l'obésité où une intolérance au glucose est observée. Puis surviennent des anomalies plus tardives, observées lorsque la carence relative en insuline est présente (diabète de type 2). C'est ainsi que dans le développement des anomalies lipidiques du diabète de type 2, il est possible de décrire une première étape en relation avec une intolérance au glucose, caractérisée par une augmentation du catabolisme des HDL, induisant une diminution du taux plasmatique du C-HDL (VERGES et al. 2000). Ensuite, survient une deuxième étape en relation avec le déficit relatif en insuline au cours de laquelle, il est observé :

- Une diminution du catabolisme des lipoprotéines riches en TG (chylomicrons, VLDL, IDL) qui, s'associant à l'augmentation de production des VLDL, majore l'hypertriglycémie.
- Une diminution du catabolisme des LDL (VERGES et al. 2000 ; DUVILLARD et al. 2000). La réduction du catabolisme des lipoprotéines riches en TG et des LDL a pour conséquence une augmentation significative du temps de résidence des VLDL, des IDL et des LDL (SCOTT et al., 1990), ce qui accroît leur risque d'oxydation et de glycation (VERGES, 2001).

Dans nos résultats, ces anomalies sont observées chez les nouveau-nés macrosomiques du régime Isio dès la naissance, ce qui reflète les perturbations profondes du métabolisme lipidique chez les mères qui les transmettent à leur tour à leur progéniture. L'hyperinsulinisme fœtal et l'abondance de substrats provenant de la mère diabétique sont à l'origine d'une



augmentation de la synthèse des apoprotéines (essentiellement B100) et d'une lipogenèse exagérée dans le foie fœtal (VILEISIS et OH, 1983 ; NORUM, 1992). En effet, les travaux de BOULANGE et al. (1981) ; SUCKLING et JACKSON (1993) et BIOLETTO et al. (2000), montrent que l'hypertriglycéridémie et l'hypercholestérolémie, sont les conséquences directes de l'hyperinsulinémie et de l'hyperlipogénèse hépatique.

Les rats obèses du régime Isio, présentent une augmentation des TG sériques liée essentiellement à une augmentation des TG-VLDL et TG-LDL. Ces résultats sont en faveur d'une augmentation de la synthèse et de la sécrétion des TG par le foie. Ceci va dans le même sens que les travaux de MERZOUK H. et al. (2000 ; 2001) qui ont trouvé des teneurs élevées en LDL, HDL, et VLDL chez des nouveau-nés obèses chez l'homme et chez le rat. TOMKIN et OWENS (1994) ; TASKINEN (1997), ont montré que l'hyperinsulinisme chez les sujets obèses ou diabétiques non insulino-dépendants est à chaque fois lié à une surproduction hépatique des VLDL. STEINER et al. (1984) ont trouvé que le taux de sécrétion des TG par le foie est élevé chez les rats rendus hyperinsuliniques par injection sous-cutanée d'insuline. Chez le rat obèse Zucker (fa/fa), l'hyperinsulinisme est aussi associé à une surproduction hépatique des TG et des VLDL (SCHONFELD et al., 1974; BOULANGE et al., 1981).

Plusieurs auteurs montrent que le nombre de récepteurs à l'insuline, ainsi que leur affinité pour cette hormone, sont plus élevés chez les nouveau-nés macrosomiques de mères diabétiques (PEDERSEN et al., 1981 ; COWETT et SHWARTZ, 1982 ; KAPLAN, 1984), ce qui peut expliquer non seulement l'excès de tissu adipeux, mais aussi la majorité des altérations métaboliques. L'insuline stimule la synthèse et la sécrétion des VLDL par le foie (LAKER et MAYES, 1984) et accroît l'épuration des VLDL en stimulant l'activité du récepteur apparenté au LDL-récepteurs qui lie l'apo E (LRP), qui est exprimé par les adipocytes et les hépatocytes (DESCAMPS et al., 1993).

Par ailleurs, les rats macrosomiques du régime Isio, ont des teneurs sériques en CT significativement élevées par rapport à leurs témoins dès j0, ce qui est lié aux teneurs élevées en CT-VLDL et CT-LDL dès j0, et à la diminution du CT-HDL à j90. Ceci concorde avec les travaux de WOLF et GRUNDY (1983) qui ont relevé des teneurs basses du C-HDL chez des sujets obèses, ce qui est probablement dû à l'augmentation de synthèse des TG-VLDL qui drainent les esters de cholestérol et les apo A1 des HDL.

Chez les nouveau-nés, les récepteurs hépatiques des LDL sont fonctionnels et jouent un rôle important dans la régulation de la concentration sérique en cholestérol (DURER et al., 1987). La synthèse du cholestérol hépatique peut être élevée chez le fœtus obèse, en raison d'un excès d'acétyl-CoA provenant du glucose et des acides gras. Ceci peut entraîner une diminution de la synthèse des récepteurs hépatiques des LDL avec une réduction de la captation des LDL sériques, phénomène de rétrocontrôle destiné à protéger le foie d'une surcharge éventuelle en cholestérol.

Chez les macrosomiques, une plus grande sensibilité des tissus à l'insuline peut également expliquer l'augmentation des activités des enzymes hépatiques (HMG-CoA réductase, 7 $\alpha$  hydroxylase, ACAT) et de la LCAT.

L'élévation de l'activité des enzymes hépatiques chez les rats macrosomiques du régime Isio, est concomitante à :

- Une élévation des protéines totales hépatiques d'une part, ce qui est en faveur d'une stimulation de la synthèse protéique globale dans le foie.
- Une augmentation hépatique du cholestérol d'autre part. La HMG-CoA réductase intervient dans la première étape de la synthèse du cholestérol, en réduisant le HMG-CoA en mévalonate. Elle joue un rôle fondamental dans la vitesse et l'importance de cette biosynthèse. Sa localisation est microsomale (CLINKENBEARD et al., 1975) et elle existe sous deux formes : phosphorylée (inactive) et déphosphorylée (active) (BOVE et HEGARDT,

1978). Un repas riche en cholestérol provoque une diminution de la HMG-CoA réductase et une réduction de sa biosynthèse hépatique (RODWELL, 1976). Le fonctionnement de l'enzyme est régulé par le taux de produit final de synthèse, le cholestérol.

Dans nos résultats, une diminution de l'activité de la HMG-CoA réductase avec l'âge des rats macrosomiques est notée, ce qui va dans le même sens que les travaux de STAHLBERG et al. (1991) et MERZOUK H. et al. (2001). Chez les mères diabétiques, du groupe Isio comparées à leurs témoins, l'activité de la HMG-CoA reductase augmente également, avec une élévation concomitante de l'activité de la 7 $\alpha$  hydroxylase et de l'ACAT. Ceci reflète le rôle critique de l'insuline dans la régulation de la synthèse du cholestérol par la HMG-CoA reductase, en modulant l'expression génique au niveau de son ARNm, et la synthèse des protéines enzymatiques (NESS et al., 1994).

La 7 $\alpha$  hydroxylase favorise la transformation du cholestérol en acides biliaires et leur excrétion sous forme de sels biliaires dans la bile, puis dans l'intestin. Le 7 $\alpha$  hydroxycholestérol formé subit une série de transformations aboutissant aux acides biliaires. Ces derniers ont un effet rétrorégulateur sur l'activité de la 7 $\alpha$  hydroxylase. Un repas riche en cholestérol est généralement à l'origine d'une augmentation de la production des acides biliaires (NESTEL et POYSER, 1976). L'augmentation du contenu en cholestérol libre de l'hépatocyte stimule l'activité de la 7 $\alpha$  hydroxylase (EINARSSON et al., 1987). La présence de cette enzyme en plus grande quantité chez les diabétiques et les macrosomiques devrait réduire le taux de cholestérol, cependant cette hyperactivité n'est pas suffisante pour ramener le cholestérol aux normes. Par ailleurs, chez les obèses, l'augmentation de l'activité de la 7 $\alpha$  hydroxylase, peut favoriser l'absorption intestinale des lipides alimentaires. Ceci entraînerait la diminution des lipides fécaux chez les rats macrosomiques durant les différents bilans nutritionnels. De plus, 90% des acides biliaires sont normalement réabsorbés dans l'intestin et retournent au foie à travers un cycle entéro-hépatique. Ces acides biliaires contrôlent la

synthèse du cholestérol hépatique qui se trouve freinée par leur retour en grande quantité au foie (BJORKHEM, 1985). Cet effet rétro régulateur semble être atténué chez les rats obèses.

Le cholestérol libre hépatique est aussi stocké sous forme estérifiée, grâce à l'enzyme microsomale ACAT. Tout excès d'apport de cholestérol à la cellule entraîne l'activation de la ACAT qui permet la mise en réserve du cholestérol sous forme estérifiée (SUCKLING et STANGE, 1985). De plus, étant donné le rôle du foie dans la synthèse des lipoprotéines, la formation des esters de cholestérol sous l'action de la ACAT constitue une étape importante dans la synthèse et la sécrétion des lipoprotéines par le foie (THOMPSON et al., 1996 ; ROS, 2000).

L'insuline apparaît inhiber l'acyl coA Cholestérol Acyl Transférase (ACAT) au niveau de l'entérocyte. Cet effet a été montré *in vitro* dans des cellules intestinales humaines (JIAO et al. 1989) et *in vivo* chez le rat diabétique (MAECHLER et al., 1992). Chez l'animal diabétique, la carence en insuline se traduit par une réduction de l'inhibition de l'ACAT et donc par une augmentation de synthèse et de sécrétion de cholestérol estérifié par l'entérocyte.

Chez les mères diabétiques, l'augmentation de l'activité HMGC<sub>o</sub>A réductase peut être expliquée par l'excès de substrat. En effet, l'hyperglycémie et l'élévation du flux d'acides gras parvenant au foie sont à l'origine d'une augmentation des taux d'acetyl CoA et de la stimulation de la synthèse du cholestérol hépatique. De plus, comme la synthèse des lipoprotéines par le foie (permettant d'exporter le cholestérol en dehors du foie) est réduite chez ces rates diabétiques, le cholestérol synthétisé en excès est soit éliminé sous forme d'acides biliaires suite à l'action de la 7 $\alpha$  hydroxylase (d'où activité élevée), soit stockée sous forme estérifiée suite à l'activation de l'enzyme ACAT.

D'une manière générale, l'augmentation de l'activité HMGC<sub>o</sub>A réductase, chez les diabétiques et les macrosomiques, entraîne une élévation de la synthèse hépatique du

cholestérol qui stimule par la suite les activités des enzymes ACAT et la 7 $\alpha$  hydroxylase (JIAO et al., 1991 ; FANTAPPIE et al., 1992 ; MERZOUK H. et al. 2001). Ces enzymes agissent de façon coordonnée afin de maintenir l'homéostasie du cholestérol à l'intérieur de l'hépatocyte. En effet, l'augmentation de la synthèse du cholestérol hépatique, combinée à l'élévation de son excrétion sous forme d'acides biliaires, et à son estérification, permettraient de garder un pool hépatique de cholestérol libre et estérifié similaire à celui des témoins chez les macrosomiques.

Chez les obèses Isio, l'augmentation de l'activité LCAT est probablement due à une plus forte quantité d'enzyme. Cette activité est corrélée positivement avec les teneurs en ester de cholestérol des HDL chez les rats nouveau-nés macrosomiques (KAARE et NORUM, 1992). Cependant, chez l'homme, la macrosomie n'est pas associée à une augmentation de l'activité LCAT (MERZOUK H. et al., 2001). Par contre, chez nos rates diabétiques l'activité de la LCAT est diminuée par rapport aux témoins, ce qui est probablement dû au déficit en insuline.

Nos résultats montrent également que le taux en apo A1 est diminué chez les diabétiques et les macrosomiques. Ceci est en accord avec les travaux de LAAKSO et al. (1990) ; BAYNES et al. (1991) ; GINSBERG (1991) et BRINTON et al. (1994), qui ont trouvé chez l'homme, que les teneurs en apo A1 et des HDL sériques diminuaient chez les obèses et les diabétiques non-insulinodépendant, anomalie liée à l'effet direct de l'insulinorésistance sur les étapes clés du métabolisme des HDL.

Par ailleurs, la composition en acides gras du sérum chez les diabétiques est en faveur d'une élévation du C18 :1(n-9) et du C18 :2 (n-6), et une diminution du C20 :4 (n-6), du C20 :5 (n-3) et du C22 :6 (n-3). Au niveau hépatique la même évolution est notée en plus d'une élévation des AGS. Ce qui concorde avec les résultats de DAS et al. (1994) qui ont noté une élévation des AGS et du C18 :1(n-9) en faveur d'une diminution des AGPI chez des patients

diabétiques. Ceci est probablement dû à une dépression des activités enzymatiques  $\Delta 5$  et  $\Delta 6$ -désaturases, liée au diabète, et à une élévation de l'oxydation des AGPI par les radicaux libres (DANG et al., 1989 ; POISSON et CUNNANE, 1991 ; PELIKANNOVA et al. 2001 ; SURESH et al., 2003 )

Chez les macrosomiques du régime Isio (à j0), les AGS et le C20 :4 (n-6) des lipides sériques sont significativement élevés alors que les C18 :2 (n-6) et C22 :6 (n-3) sont significativement diminués, alors qu'à partir de j30 jusqu'à j90, une augmentation du C18 :2 (n-6) et une diminution du C20 :4 (n-6), du C20 :5 (n-3) et du C22 :6 (n-3) sont notées au niveau du sérum et du foie. Les anomalies observées à la naissance peuvent être expliquées par une augmentation de synthèse des acides gras ou une réduction de leur oxydation résultant de l'hyperinsulinisme fœtal (CHOI et al., 1989 ; MERZOUK H., 2002).

Un taux élevé en C20 :4 (n-6) accompagné par une diminution du C18 :2 (n-6) est le résultat d'une conversion importante du C18 :2 (n-6) en C20 :4 (n-6), ce qui est dû à une élévation de l'activité des  $\Delta 5$  et  $\Delta 6$ -désaturases et des élongases (MERZOUK H., 2002). Il est aussi connu que l'insuline active les désaturases en augmentant leur synthèse (ECK et al. 1979 ; POISSON et CUNNANE, 1991). De plus les teneurs en C20 :5 (n-3) et C22 :6 (n-3) sont diminuées chez les macrosomiques, ce qui peut être dû à une augmentation de l'utilisation de ces AG par les macrosomiques. Il a été montré que le tissu adipeux accumule une grande quantité d'AGPI chez le fœtus près du terme, et le dépôt d'AGPI de la famille n-3 dans le tissu adipeux, dépasse largement celui des autres tissus fœtaux (INNIS, 1991). L'excès de tissu adipeux chez le fœtus hyperinsulinique macrosomique peut être en faveur d'une augmentation de l'accumulation du C20 :5 (n-3) et du C22 :6 (n-3) dans ce tissu, ce qui diminuerait leurs teneurs dans les lipides circulants.

L'augmentation du C18 :2 (n-6) chez les macrosomiques à partir de j30 peut être due aux modifications de la composition en acides gras du lait de la mère diabétique. En effet

BITMAN et al. (1989) notent une plus forte concentration du C18 :2 (n-6) dans le lait de la mère diabétique. Des études réalisées chez le rat montrent que le métabolisme des AG de la glande mammaire est régulé par l'insuline (MC NEILLIE et ZAMMIT, 1982 ; JONES et al., 1984). Ainsi toute déficience en insuline de la mère induit des changements du métabolisme lipidique de la glande mammaire, et par la suite modifie la composition du lait (BITMAN et al., 1989).

L'élévation des AGS et AGMI hépatiques peut être due à une augmentation de leur synthèse hépatique à partir des glucides.

Les résultats du métabolisme des lipides obtenus paraissent établir que le diabète maternel et la macrosomie fœtale sont associés à des altérations du métabolisme des lipides et des lipoprotéines. Il est donc nécessaire de rechercher des moyens simples notamment nutritionnels pour corriger ces anomalies métaboliques. Ainsi, le deuxième objectif de notre travail vise à étudier le rôle des AGPI (apportés par le régime Epax) qui sont des agents hypolipidémisants auxquels on attribue également des propriétés antiathérogènes.

L'étude de BURR et al. (1989) a démontré les bienfaits des AGPI n-3 en administrant 3 régimes différents à 3 groupes atteints de maladies coronariennes. Le premier groupe reçoit un régime avec un apport modérément élevé en acide linoléique (P/S=1), le deuxième groupe reçoit un régime "poissons" et le troisième un régime "fibres". Tous avaient un apport faible en graisses saturées. Seul le groupe « poissons » (poissons gras : 300 g, 2 fois/semaine) a eu une réduction de la mortalité coronarienne et totale de 29%.

Par ailleurs, les études épidémiologiques ont démontré la diminution de l'incidence des pathologies inflammatoires chez les Japonais et les esquimaux de Groenland. Ceci est attribué à une grande consommation de poissons de mer froide riches en AGPI n-3 (JOLLY et al., 1997; MILES et CALDER, 1998; ROBERTS et al., 1998 ; WESLY et al., 1998).

Nos résultats montrent que le régime Epax atténue l'hyperglycémie des mères diabétiques, et l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie de leur progéniture, ce qui explique la diminution de la prévalence de la macrosomie chez les nouveau-nés des mères diabétiques consommant le régime Epax. Ceci est en accord avec les résultats de FASCHING et al. (1991) qui ont reporté que l'administration pendant deux semaines d'huile de poisson aux patients obèses souffrants d'une insulino-résistance, augmente significativement leur sensibilité à l'insuline. FICKOVA et al. (1998) ont montré que les rats recevant un régime enrichi en AGPI n-3 présentent un poids corporel et une concentration en insuline inférieurs aux rats recevant un régime enrichi en AGPI n-6. Les AGPI n-3 diminuent la lipogenèse adipocytaire par l'augmentation de la sensibilité du tissu musculaire à l'insuline et donc diminution du transport de glucose, en plus d'une diminution de stockage des lipides dans le tissu adipeux (LOVEJOY, 1999). Cependant, l'addition de l'acide arachidonique à l'huile de poisson, inverse ces effets, car comme l'ont reporté LING et al. (1998), l'incorporation des AGPI n-3 aux tissus et particulièrement l'EPA et le DHA, impose une diminution du taux de l'acide arachidonique puisque l'EPA et le DHA rentrent en compétition avec l'acide arachidonique qui se fixe préférentiellement sur la position sn-2 du glycérol. Toutefois, l'EPA exerce un effet inhibiteur sur la conversion de l'acide di-homo- $\gamma$ -linoléique en acide arachidonique (NASSAR et al., 1986).

JUCKER et al. (1999) ont comparé les effets de la consommation des AGPI n-3 aux effets de la consommation des AGPI n-6, et ont déduit que ces derniers augmentent le taux des triglycérides intramusculaires, entraînent une insulino-résistance et diminuent la glycolyse musculaire. C'est pourquoi la balance n-3/n-6 constitue un facteur important dans le métabolisme cellulaire. OAKES et al. (1997) ont attribué l'augmentation du taux des triglycérides intramusculaires à la diminution *in situ* du taux d'insuline responsable de la



stimulation du métabolisme du glucose au niveau du muscle et de la glycogénèse au niveau hépatique.

Par ailleurs, le rôle potentiel du DHA dans l'amélioration de l'insulinorésistance a été souligné chez les rats. OZANNE et al. (1998), ont montré que l'insulinorésistance des mères entraîne un taux faible de DHA chez leur progéniture.

Les AGPI n-3 atténuent également l'hyperlipidémie et les complications à long terme de la macrosomie. KINSELL et al. (1961), HARRIS et al. (1983 ; 1984 ; 1988), CONNOR (1986), GRUNDY (1986), SIRTORI et al. (2002) ont montré une diminution du taux des TG et CT sériques sous l'effet des AGPI n-3.

Nos résultats vont dans le même sens que ceux des études précédentes. En effet, nous avons noté que l'Epax corrige les troubles lipidiques des mères diabétiques et leur progéniture macrosomique. Ceci est représenté par une diminution du taux des TG sériques provenant de la diminution du taux des TG hépatiques.

Plusieurs études ont montré que la réduction du taux des TG hépatiques sont à l'origine de la diminution du taux des TG sériques (WONG et al., 1985 ; SANDERS et al., 1985 ; NASSAR, 1986 ; HARRIS, 1989 ; LICHTENSTEIN et al., 1998 ; HORROCKS et YEO, 1999 )

Dans notre étude, nous avons aussi observé que le régime Epax a un effet hypocholestérolémiant chez les mères diabétiques à J12 de la gestation, ainsi que chez les nouveaux nés obèses de j0 à j90, reflété surtout au niveau des VLDL et des LDL. L'effet hypocholestérolémiant des AGPI n-3 est accompagné par une diminution du cholestérol hépatique suggérant une diminution de synthèse du cholestérol ou une augmentation de son excrétion dans la bile. En effet, il a été démontré que l'huile de poisson induit des variations du métabolisme de cholestérol dans le foie des rats conduisant à une augmentation de son excrétion biliaire (CONNOR, 1986 ; SMIT et al., 1991).

Plusieurs études ont aussi reporté l'effet hypocholestérolémiant des AGPI n-3 chez les rats (MERZOUK H. et KHAN, 2003). Cependant, chez l'homme, l'effet de ces derniers sur le métabolisme du cholestérol est discuté. SANDERS et al. (1985 ; 1989) ont reporté que 20 g/jour d'huile de poisson (contenant 5g d'AGPI n-3) diminue significativement les TG sériques chez l'homme alors que la cholestérolémie ne diminue que chez des sujets ayant un taux de cholestérol initial élevé. L'étude de KROMHOUT et al. (1985) montre que les huiles de poisson réduisent la mortalité, sans abaisser la cholestérolémie.

Toutefois, dans notre étude, il est important de souligner que le régime Epax entraîne une augmentation significative du C-HDL<sub>2-3</sub> chez les rates gestantes diabétiques et leur progéniture macrosomique à l'âge adulte. Ces résultats concordent avec ceux de SANDERS et al. (1983a ; 1983b). Les HDL sont connus pour leur effet antiathérogénique et leur protection des LDL contre les modifications oxydatives (HIGDON et FREI, 2003).

Par ailleurs, FAILOR et al. (1988) ont noté une réduction significative des apoprotéines B chez des sujets consommant les AGPI n-3. Nos résultats concordent avec cette étude puisque le taux des apoprotéines B100 est réduit chez les rats diabétiques et macrosomiques du régime Epax.

GRUNDY (1986) a expliqué l'effet des AGPI n-3 sur la réduction des LDL et de l'hypercholestérolémie, par la facilitation de la clairance des chylomicrons, et via la diminution de la compétition de petites quantités de VLDL.

D'une façon générale, l'effet hypolipémiant des AGPI n-3 peut être expliqué de la manière suivante : ces acides gras peuvent réduire la synthèse des TG et la sécrétion des chylomicrons par les cellules intestinales (HARRIS, 1988 ; 1989), et suppriment la synthèse hépatique des acides gras et la production des TG, et de ce fait limitent la sécrétion des VLDL (CONNOR,

1985 ; 1986 ; SANDERS, 1984 ; 1986 ; WONG et MARSH, 1988 ; SANDERS et MISTRY, 1984 ; SANDERS et al. 1985, 1989). Chez les rats, les AGPI n-3 réduisent l'activité de la glucose- 6- phosphate déshydrogénase, l'enzyme malique et l'acetyl-CoA carboxylase (IRITANI et al., 1980). L'EPA réduit les TG hépatiques en inhibant la phosphatidate phosphohydrolase et les acyltransférases (RUSTAN et DREVON, 1989 ; WONG et MARSH, 1988). Les AGPI n-3 diminuent le pool des TG des VLDL en inhibant la synthèse des TG et peut être en augmentant la clairance des TG-VLDL (IRITANI et al., 1980 ; CONNOR et BRISTOW, 1985 ; CONNOR, 1986 ; WONG et MARSH, 1988 ; HARRIS, 1989). Ces acides gras diminuent également la synthèse des apoprotéines (ILLINGWORTH et al. 1984 ; 1989 ; WONG et MARSH, 1988). Il a été rapporté que l'EPA diminue la production des apoprotéines chez l'homme et chez le rat (NESTEL et al., 1984 ; 1986) et peut réduire le flux de transport des apoprotéines B des VLDL.

Par ailleurs, l'effet des AGPI n-3 sur l'activité de la LCAT a été démontré par plusieurs auteurs. TSUKAMOTO et al. (1982) et SUBBAIAH et al. (1998) ont trouvé que la consommation d'un régime riche en AGPI diminue l'activité de la LCAT. SINGER et al. (1990), ont trouvé la même chose après un régime riche en huile de graines de lin (riches en AGPI n-3). De plus, PARKS et GERBE (1997) ont conclu que les AGPI à longue chaîne en position sn-2 du glycérol diminuent l'efficacité catalytique de la LCAT. Ceci entraîne une diminution du taux des esters de cholestérol et de la taille des particules LDL qui deviennent moins athérogènes (PARKS et al., 1989).

L'Epa diminue également l'activité des enzymes hépatiques intervenant dans le métabolisme du cholestérol. La diminution de l'activité de la HMG-CoA réductase concorde avec les résultats de DUNCAN et al. (2005) qui ont reporté que l'EPA et le DHA régulent l'activité de la HMG-CoA réductase essentiellement par un effet post-transcriptionnel. Un régime riche en

huile de poisson peut exercer un effet bénéfique en inhibant la formation du mévalonate (DUNCAN et al., 2005).

Les résultats de LI et al. (2005) ont montré chez des souris nourries par un régime enrichi en AGPI une augmentation de la production des acides biliaires ou de leur excrétion qui diminue simultanément l'accumulation du cholestérol au niveau hépatique, malgré une diminution de l'expression de l'ARNm du gène contrôlant la synthèse de la 7 $\alpha$  hydroxylase (CYP7 $\alpha$ 1 gène expression).

L'effet des AGPI n-3 sur l'activité LPL est discuté, certains auteurs ont trouvé que cette activité reste inchangée sous régime enrichi en AGPI n-3 (DAVID et al., 1987). Cependant, nos résultats montrent une diminution de l'activité HTGL et LPL chez les rats sous régime Epax, ce qui va dans le même sens que les résultats de HAUG et HOSTMARK (1987) qui ont noté une réduction de 50% de l'activité LPL chez des rats consommant un régime enrichi en huile de poisson.

La diminution de l'activité de l'ACAT par les AGPI a été démontrée par BOTHAM et al. (2001). Ces auteurs ont montré que les AGPI une fois relâchés dans les hépatocytes à partir des remnants de chylomicrons, régulent l'activité des enzymes modulant les taux d'ester cholestérol intracellulaire. Ils suggèrent également que les AGPI n-3 et n-6 ou leurs métabolites, ont des effets sur l'expression des gènes intervenant dans la synthèse de ces enzymes au niveau de l'ARNm, et au niveau post-transcriptionnel.

En effet, YU-POTH et al. (2005) ont noté que l'EPA, le DHA et l'acide arachidonique, s'opposent à l'abaissement de l'expression du gène « récepteurs aux LDL » par le 25OH-cholesterol, et augmentent le taux des récepteurs aux LDL, et que l'ACAT joue un rôle dans la modulation de l'effet de l'acide arachidonique sur le taux des récepteurs aux LDL, alors que l'EPA et le DHA semblent indépendants de l'effet de cet enzyme.

De plus, la consommation du régime Epax par les mères diabétiques et leur progéniture entraîne un taux élevé en AGPI (EPA et DHA), suivi d'une diminution du taux de l'acide arachidonique, ce qui concorde avec les résultats de DANG et al. (1989). Le DHA paraît inhiber la conversion du C18 :2 (n-6) en C20 :4 (n-6), en diminuant l'activité des  $\Delta 6$ -désaturases (RAZ et al., 1997) ce qui peut expliquer l'augmentation du C18 :2 (n-6) au niveau du sérum et du foie des mères diabétiques et leur progéniture, et la diminution du C20 :4 (n-6) au niveau du sérum et du foie des rats macrosomiques.

Des perturbations du système antioxydant ont été reportées dans le cas de l'obésité, du diabète et de l'athérosclérose (BONNEFONT-ROUSSELOT, 2000 ; HIGDON et FREI, 2003; MERZOUK S. et al., 2003 ; 2004 ).

Le stress oxydatif s'installe quand la production de radicaux libres dépasse la capacité de la défense antioxydante. Les radicaux libres induisent des altérations des cellules, des lipides et des protéines, à l'origine de différentes pathologies (BONNEFONT-ROUSSELOT, 2000 ; HIGDON et FREI, 2003; MERZOUK S. et al., 2003 ; 2004 ).

Le diabète gestationnel augmente le taux de la peroxydation lipidique et de la carbonylation protéique chez les mères et leur progéniture (CEDERBERG et al., 2001). La mesure des taux d'hydroperoxydes, de protéines carbonyles et d'ORAC, est un facteur déterminant le statut oxydant/antioxydant.

Les résultats obtenus montrent une diminution de l'ORAC chez les mères diabétiques et leur progéniture macrosomique, ce qui concorde avec les résultats de Mc LENNAN et al. (1991); YOUNG et al. (1992) ; YESSOUFOU et al. (2006). Ceci peut s'expliquer par une défaillance du système de défense antioxydant, et une élévation de la production des radicaux libres, relevées également dans le cas de diabète type 1 et type 2 chez l'humain (MERZOUK S. et al. ; 2003 ; 2004) et chez le rat (YESSOUFOU et al., 2006).

La réduction du taux d'ORAC est associée à l'augmentation des hydroperoxydes et des protéines carbonylées chez les mères diabétiques et les rats macrosomiques. Les hydroperoxydes sont des marqueurs de la peroxydation lipidique, dont le taux augmente, chez l'homme, dans le cas de diabète type 1 et type 2, résultant de l'hyperglycémie (MERZOUK S. et al., 2004). Il est connu que, l'augmentation du taux de glucose augmente la production de radicaux libres et diminue la défense naturelle antioxydante (BONNEFONT-ROUSSELOT et al., 2000). CEDERBERG et al. (2001) ont montré que le taux des hydroperoxydes est élevé chez des rates diabétiques non gestantes par rapport à des rates non diabétiques, et que la gestation augmente ce taux davantage.

Les protéines carbonylées sont considérées comme des marqueurs de l'oxydation des protéines (MAYNE, 2003). Les protéines carbonylées augmentent dans le diabète clinique et expérimental (CERIELLO, 2000 ; BONNEFONT-ROUSSELOT, 2000 ; CEDERBERG et al., 2001). L'oxydation des protéines est un signe de l'endommagement tissulaire, causé par le stress oxydatif, l'augmentation du taux des carbohydrates, ou les deux (BAYNES, 1999 ; MAYNE, 2003).

Cependant, il existe un système antioxydant complexe incluant des composants enzymatiques ou non, qui protège les biomolécules (protéines, lipides...) contre les effets des radicaux libres. En effet, l'hyperproduction de radicaux libres et donc les dégâts tissulaires sont limités par la présence naturelle endogène de substances antioxydantes. La phosphorylation oxydative a lieu dans les mitochondries (les radicaux libres sont fortement liés) ; le radical superoxyde est dismuté en  $H_2O_2$  grâce à la superoxyde dismutase (SOD) ; l' $H_2O_2$  est éliminé par la catalase et la glutathion peroxydase. D'autres systèmes de destruction des radicaux libres ne sont pas enzymatiques mais stoechiométriques, les molécules réagissent une à une. Lorsqu'elles ont réagi avec un radical libre, elles sont détruites. Le principal destructeur stoechiométrique des radicaux libres est l'alpha-tocophérol (vitamine E) qui inhibe la

propagation de la chaîne oxydative en réagissant avec les radicaux libres. En plus de son rôle antioxydant, l'acide ascorbique (vitamine C) régénère la vitamine E. La vitamine A, inhibe la peroxydation lipidique mais peut également inhiber directement les radicaux hydroxyles (JAESCHKE, 1995).

CEDERBERG et al. (2001) ont noté une diminution du taux des vitamines E et C chez des rates gestantes diabétiques, signe d'un système oxydant/antioxydant défaillant. Seulement, nos résultats ne corroborent pas avec ces derniers, puisque le taux des vitamines E et C reste inchangé chez nos rates diabétiques et leur progéniture. Toutefois, le taux de la vitamine A diminue chez ces rats.

Par ailleurs, une diminution des activités d'enzymes antioxydantes chez les mères diabétiques et les rats macrosomiques a été notée. En effet, plusieurs auteurs ont démontré une diminution des activités enzymatiques antioxydantes et le taux de certaines vitamines chez des rats diabétiques (Mc LENNAN et al., 1991; YOUNG et al., 1992). Des résultats similaires ont également été obtenus par DINCER et al. (2002), qui ont noté une diminution de l'activité de ces enzymes au niveau du foie et des poumons des nouveau-nés de mères diabétiques.

Ces résultats suggèrent que le stress oxydatif s'installe chez les mères gestantes après induction du diabète, et chez les rats macrosomiques durant la vie intra-utérine, et persiste jusqu'à l'âge adulte. Ce stress oxydatif est vraisemblablement lié à l'hyperglycémie qui augmente la formation des produits finaux de la glycation qui à leur tour, augmentent la production des radicaux libres et contribuent au stress oxydatif cellulaire via la stimulation de la production des radicaux par les macrophages et autres cellules vasculaires (HUNT et WOLFF, 1990)

Par ailleurs, nos résultats indiquent que l'Epax augmente le taux d'ORAC, de la vitamine A, et des activités des enzymes antioxydantes érythrocytaires. Par contre, il diminue le taux des hydroperoxydes et des protéines carbonylées chez les mères diabétiques et les rats

macrosomiques, ce qui concorde avec plusieurs études (Mc LENNAN et al., 1991 ; HUNKAR et al., 2002 ; YILMAZ et al., 2002 ; KESAVULU et al., 2002 ; SARSILMAZ et al., 2003). Le régime Epax améliore le statut oxydant/antioxydant et réduit le stress oxydatif induit par la macrosomie, ce qui met en évidence les effets bénéfiques des AGPI n-3 et concorde avec les résultats de YESSOUFOU et al. (2006).

La diminution de la susceptibilité des tissus à l'oxydation par les AGPI n-3 peut être liée à l'amélioration de la stabilité membranaire des cellules, après incorporation de ces acides gras aux phospholipides de la membrane plasmique (YUAN et KITTS, 2002). BRUDE et al. (1997) ont reporté que l'entassement de l'EPA et du DHA dans la membrane plasmique, diminue l'attaque des doubles liaisons par les radicaux libres ou le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Le fait que l'EPAX soit riche en EPA, peut expliquer que cet acide gras peut contribuer largement aux propriétés antioxydantes. KESAVULU et al. (2002) ont reporté que le traitement des diabétiques par les AGPI n-3 améliore leur statut antioxydant. Il a été également montré que les acides gras de l'huile de poisson adhèrent à la composition des phospholipides de la membrane cellulaire, d'où augmentation du taux de l'EPA et du DHA au dépend de celui de l'acide arachidonique (ANDO et al., 1998). Cette substitution peut diminuer l'effet négatif de l'acide arachidonique (n-6) sur le statut antioxydant. En plus, la composition membranaire en acides gras influence les propriétés physiques de la membrane cellulaire (fluidité, perméabilité), l'activité des récepteurs, des enzymes, des canaux ioniques, ainsi que la réponse cellulaire par les seconds messagers aux diverses stimulations.

L'effet bénéfique des AGPI n-3 implique l'EPA et le DHA. Il est connu que l'EPA augmente les eicosanoïdes de la famille n-3, qui exercent un effet opposé aux eicosanoïdes de la famille n-6 (dérivés de l'acide arachidonique). L'EPA peut également être converti en DHA, qui en plus du DHA alimentaire, peut contribuer davantage aux effets bénéfiques. Récemment, une étude a montré que le DHA peut augmenter certains dérivés récemment découverts, comme



les docosatriènes ou les résolvines, qui exercent également un effet bénéfique (SHERHAN et al., 2004). Cependant, le mécanisme par lequel l'EPA et le DHA exercent un effet bénéfique sur le statut antioxydant n'a pas encore été mis en évidence. DAS et al. (2001) suggèrent que la supplémentation en EPA et DHA, inhibe la production des radicaux libres et supprime la peroxydation lipidique et la synthèse du NO chez des patients souffrant du syndrome néphrétique. Ces résultats suggèrent que l'EPA ou le DHA peuvent être impliqués dans l'élimination des radicaux libres et du NO.

Par ailleurs, l'huile de poisson augmente l'activité et le taux d'ARNm de la catalase, la glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase (VENKATRAMAN et al., 1994) et du glutathion réductase du foie chez les souris (DEMOZ et al., 1992).

KHAN et HICHAMI (2002) ont également montré que les AGPI n-3 modulent les mécanismes de la signalisation cellulaire via leur incorporation dans les phospholipides de la membrane cellulaire.

En milieu aqueux, le méthyle ester de l'EPA et du linoléate, se présente sous forme micellaire, et l'oxydabilité du méthyle ester de l'EPA est inférieure à celle du méthyle linoléate. Les micelles de l'EPA ont 2 molécules d'oxygène ou plus dans leur radical peroxy, tandis que ceux du linoléate en ont seulement une molécule (YAZU et al., 1998). Ces auteurs ont discuté le fait que l'EPA est plus polaire que le linoléate, et que les radicaux polaires peuvent migrer depuis le noyau lipophile de la micelle à la surface polaire. Cette migration crée un environnement favorisant la formation de composés stables, ce qui réduit la propagation des réactions oxydatives (WANDER et SHI-HUA, 2000). Ceci est l'un des mécanismes qui peuvent expliquer les propriétés antioxydantes de l'EPA qui se comporte comme un peroxy et un scavenger des radicaux libres. Seulement les mécanismes par lesquels le DHA agit comme antioxydant ne sont pas encore élucidés.

Par ailleurs une relation entre AGPI, radicaux libres et activité de la HMG CoA réductase a été établie par PALLOTTINI et al. (2005). Ces auteurs ont observé chez des rats privés d'AGPI, une augmentation considérable de la production de radicaux libres et de l'activité de la HMG CoA réductase.

De ces résultats, il apparaît clairement que les AGPI n-3 ont un effet bénéfique sur le statut oxydant/antioxydant, altéré par le diabète (chez les mères diabétiques) et la macrosomie (chez la progéniture).

# CONCLUSION

Le diabète durant la gestation est un cadre hétérogène comprenant des affections de sévérité différente. Il est associé à court, moyen et long terme, à des complications maternelles et fœtales qui en font un problème de santé publique. Un certain nombre d'arguments épidémiologiques et l'expérimentation animale suggèrent que la plasticité importante de la période fœtale des premiers mois de vie est à l'origine non seulement d'une sensibilité particulière à certains toxiques mais également d'une « programmation » durable de certaines fonctions de l'organisme par des conditions d'environnement dès la vie intra-utérine.

La contribution de ces phénomènes à la santé ultérieure des individus constitue une raison majeure d'explorer les différents métabolismes impliqués dans les complications dues au diabète (métabolisme des lipides et lipoprotéines, statut oxydant/antioxydant) aux différents temps (pendant la gestation chez les mères et dès la naissance chez les nouveau-nés et jusqu'à l'âge adulte). Pour cela, un modèle animal est nécessaire pour effectuer cette étude. Parallèlement, vu les bienfaits des AGPI n-3 sur ces complications, une approche nutritionnelle consistant à administrer un régime enrichi en AGPI n-3 (Epax), a été étudiée dans notre travail et ceci pour voir si ce régime améliore les troubles métaboliques étudiés chez les diabétiques et leur progéniture macrosomique.

Nos résultats montrent que le profil lipidique des rates diabétiques, consommant le régime Isio, et leur progéniture est perturbé. En effet les mères diabétiques présentent une élévation des lipides (CT, TG et PL) au niveau hépatique, sérique et lipoprotéique, une élévation des apo B100 et une diminution de l'apo A1, avec une élévation concomitante de l'activité des enzymes hépatiques (HMGCoA, 7 $\alpha$  hydroxylase, ACAT, HTGL) et une diminution de l'activité LCAT. Une élévation du C18 :1 (n-9) et C18 :2 (n-6) et une diminution de l'EPA et du DHA chez les rates diabétiques ont également été notées. Les troubles observés chez la

progéniture macrosomique du régime Isio, sont en faveur d'une installation de l'obésité et de l'insulinorésistance. Ceci est reflété comme chez les mères par une élévation des lipides (CT, TG et PL) au niveau hépatique, sérique et lipoprotéique, une élévation des apo B100 et une diminution de l'apo A1, avec une élévation concomitante de l'activité des enzymes hépatiques (HMGC<sub>o</sub>A, 7 $\alpha$  hydroxylase, ACAT, HTGL), en plus d'une hyperinsulinémie, une adipogénèse accrue (élévation du poids relatif du tissu adipeux avec élévation de ses teneurs en lipides et de l'activité LPL) et une augmentation de l'activité LCAT. Le profil de la composition sérique et hépatique en acides gras est en faveur d'une augmentation des AGS et monoinsaturés et une diminution des AGPI (EPA et DHA).

Pour le statut oxydant/antioxydant, les résultats obtenus reflète un stress oxydatif conséquent chez les mères diabétiques du régime Isio et leur progéniture macrosomique. En effet, nous avons noté chez ces rats, une diminution des teneurs en vitamine A, du pouvoir antioxydant total (ORAC), des activités enzymatiques antioxydantes (catalase, glutathion réductase et peroxydase et de la SOD), et une augmentation du taux des hydroperoxydes et des protéines carbonylées.

Concernant, l'effet des AGPI n-3 apportés par le régime Epax, nous avons observé une amélioration des troubles lipidiques et du stress oxydatif chez les mères diabétiques et leur progéniture macrosomique. Ces améliorations sont illustrée par :

- une diminution des teneurs en lipides (CT, TG et PL) au niveau hépatique, sérique et lipoprotéique avec une diminution des apo B100 et une élévation de l'apo A1. L'activité des enzymes hépatiques (HMGC<sub>o</sub>A, 7 $\alpha$  hydroxylase, ACAT, HTGL) augmentent, les AGS diminuent et les AGPI (EPA et DHA) augmentent au niveau sérique et hépatique.

- Les teneurs en vitamine A, le pouvoir antioxydant total (ORAC), et les activités enzymatiques antioxydantes (catalase, glutathion réductase et peroxydase et de la SOD), présentent une augmentation par rapport aux rats diabétiques et macrosomiques du régime Isio, tandis que les hydroperoxydes et les protéines carbonylées diminuent chez ces même rats.

Ces résultats tendent à démontrer que le diabète maternel est susceptible d'entraîner des troubles du métabolisme lipidique, en plus d'une altération du statut oxydant/antioxydant pouvant mener à long terme à des maladies métaboliques (diabète, obésité, athérosclérose ...) chez la progéniture. Pour cette raison le diabète gestationnel doit être recherché chez toutes les femmes, même s'il n'existe pas de facteur de risque. La prise en charge doit être multidisciplinaire, précoce et stricte. L'insulinothérapie et les mesures hygiéno-diététiques sont préconisées.

Dans notre travail, nos résultats montrent que les AGPI n-3 améliorent les perturbations dues au diabète chez les mères gestantes et leur progéniture, ce qui peut prévenir le développement des maladies métaboliques chez ces derniers. Pour cela, l'approche diététique à considérer dans ces pathologies est de remplacer les AGS par les AGPI n-3, ce qui peut utilement contribuer à une alimentation saine et une réduction du risque des maladies métaboliques.

Les stratégies actuelles, qui visent avant tout à modifier les paramètres lipidiques plasmatiques, n'apportent pas de solution thérapeutique à l'ensemble des patients diabétiques. Des études plus fines des mécanismes physiologiques impliqués sont donc à poursuivre pour proposer de nouvelles approches médicamenteuses. Cependant, les AGPI n-3 sont des

molécules prometteuses dans le champ de la prévention et de la potentialisation des traitements. Toutefois, les mécanismes d'action des  $\omega$ -3 ne sont pas encore bien élucidés, et compte tenu des enjeux, l'amplification de la recherche dans ce domaine est plus que jamais légitime.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



1. AEBI, H. (1974) Catalase. In *Methods of enzymatic analysis*. 2<sup>nd</sup> ed. H. U Bergmeyer. Verlag Chemie GmbH, Weinheim. 2: 673-684.
2. AERTS, L. A., HOLEMANS, K., ASSCHE, F. A. (1995) Maternal diabetes during pregnancy and the long-term consequences of the offspring, *IDF Bull.* 40: 24-28.
3. AILHAUD, G. (1990) Cellular and secreted lipoprotein lipase revisited. *Clin. Biochem.* 23: 343-347.
4. AILHAUD, G., GUESNET, P. (2003) Fatty acid composition of fats in an early determinant of childhood obesity: a short review and an opinion. *Obesity reviews* (s press).
5. AL-SHURBAJI, A., LARSSON-BACKSTROM, C., BERGLUND, L., EGGERTSEN, G., BJORKHEM, I. (1991) Effect of n-3 fatty acids on the key enzymes involved in cholesterol and triglyceride turnover in rat liver. *Lipids.* 26: 385-389.
6. American Diabetes Association (1998) Consensus development conference on insulin resistance. *Diabetes Care.* 21 (2) : 310-314.
7. AMMON, H. P., HAGELE, R., YOUSSEF, N., EUGENE, F., EL-AMRI, N. (1983) A possible role of intracellular and membrane thiols of rat pancreatic islets in calcium uptake and insulin release. *Endocrinology.* 112 : 720-726.
8. ANDO, K., NAGATA, K., BEPPU, M., KIKUGAWA, K., KAWABATA, T., HASEGAWA, K., SUZUKI, M. (1998) Effect of n-3 fatty acid supplementation on lipid peroxidation and protein aggregation in rat erythrocyte membranes. *Lipids.* 33: 505-512.
9. ARGILES, J. M., LOPEZ-SORIANO, J., ORTIZ, M.A. POU, J.M., LOPEZ-SORIANO, F. J. (1992) Interleukin-1 and beta-cell function : more than one second messenger ? *Endocr. Rev.* 13 : 515-524.
10. ARMITAGE, J. A., TAYLOR, P. D., POSTON, L. (2005) Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. *J. Physiol.* 565( 1): 3-8.

11. BAKER, J., LIE, J., ROBERTSON, P. (1993) Role of insulin-like growth factors in embryonic and post natal growth. *Cell*. 75 : 73-82.
12. BALASUBRAMANIAM, S., MITROPOULOS, K. A., VENKATESAN, S. (1978) Rat-liver acyl CoA cholesterol acyltransferase. *Eur. J. Biochem.* 90: 377- 383.
13. BANKSON, D. D., KESTIN, M., RIFAI, N. (1993) Role of free radicals in cancer and atherosclerosis. *Clin. Lab. Med.* 13(2): 463-480.
14. BARKER, D.J.P. (1998) Programming the baby, in Mothers, babies and healter in later life. *Churchill Livingstone: Edinburgh*. 13-42.
15. BARRANS, A., COLLET, X., BARBARAS, R., JASPARD, B., MANENT, J., VIEU, C., CHAP, H., PERRET, B. (1994) Hepatic lipase induces the formation of pre-beta high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL- A study comparing liver perfusion to *in vitro* incubation with lipases. *J. Biol. Chem.* 269: 11572-11577.
16. BARTLETT, G. R. (1958) Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 234 : 466-468.
17. BAYNES, C., HENDERSON, A. D., ANYAOKU, V., RICHMOND, W., HUGHES, C. L., JOHNSTON, D. G., ELKELES, R. S. (1991) The role of insulin insensivity and hepatic lipase in the dislipidemia of type 2 diabetes. *Diabet. Med.* 8: 560-566.
18. BAYNES, J. W. (1991) Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes.* 40 : 405-412.
19. BAYNES, J. W., THORPE, S. R. (1999) role of oxidative stress in diabetic complications. A new perspective on an old paradigm. *Diabetes.* 48: 1-9.
20. BERK, M. A., MIMOUNI, F., MODOVNIK, A., HERTZBERG, V., VALUCK, J. (1989) Macrosomia in infants of insulin-dependant diabetic mothers. *Pediatrics.* 83: 1029-1034.

21. BERRY, E. M. (1997) Dietary fatty acids in the management of diabetes mellitus. *Am. J. Clin. Nutr.* 66, 991-997.
22. BIOLETTO, S., GOLAY, A., MUNGER, R., KALIX, B., JAMES, R. W. (2000) Acute hyperinsulinemia and very low density and low density lipoprotein subfractions in obese subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 443-449.
23. BITMAN, J., HAMOSH, M., HAMOSH, P., LUTES, V., NEVILLE, M. C., SEACAT, J., WOOD, D. L. (1989) Milk composition and volume during the onset of lactation in a diabetic mothers. *Am. J. Clin. Nutr.* 50: 1364-1369.
24. BJOMTORP, P. (1991) Metabolic implication of body fat distribution. *Diabetes.* 14: 1132-1143.
25. BJORKHEM, I. (1985) Mechanism of bile acid biosynthesis in mammalian liver. In new comprehensive biochemistry. H. Danielsson and J. Sjoval, Editors. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam. 231-278.
26. BLIGH, E. G., DYER, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 37 : 911-917.
27. BLOND, J. P. (1992) Acides gras essentiels et propriétés de la peau. *Revue Française des corps gras.* N°3/4.
28. BOIVIN, A., DESHAIES, Y. (2000) Contribution of hyperinsulinemia to modulation of lipoprotein lipase activity in the obese Zucker rat. *Metabolism.* 49(1):134-140.
29. BONET, B., BRUNZELL, J. D., GOWN, A. M., KNOPP, R. H. (1992) Metabolism of VLDL triglyceride by human placental cells: The role of lipoprotein lipase. *Metabolism.* 41: 596-603.

30. BONNEFONT-ROUSSELOT, D., BASTARD, J. P., JAUDON, M. C., DELATTRE, J. (2000) Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab.* 26: 163-176.
31. BOTHAM, K. M., MALDONADO, E. N., CHICO, Y., ZHENG, X., AVELLA, M., OCHOA, B. (2001) The influence of chylomicron remnants on cholesteryl ester metabolism in cultured rat hepatocytes: comparison of the effects of particles enriched in n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta.* 30, 1534 (2-3) : 96- 109.
32. BOULANGE, A., PLANCHE, E., GASQUET, P. (1981) Onset and development of hypertriglyceridemia in the zucker rat (fa/fa), *Metab. Clin. Exp.* 30: 1045- 1052.
33. BOVE, J., HEGARDT, F. G. (1978) Reversible modulation of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Evidence for an enzyme catalyzed phosphorylation-dephosphorylation system. *Febs. Lett.* 90: 198-202.
34. BRINTON, E. A., EINSENBURG, S., BRESLOW, J. E. (1994) Human HDL cholesterol levels are determined by apo A-1 fractional catabolic rate, which correlated inversely with estimates of HDL particle size. Effects of gender, hepatic and lipoprotein lipases, triglyceride and insulin levels, and body fat distribution. *Arterioscler. Thromb.* 14: 707- 720.
35. BROWN, M. S., GOLDSTEIN, J. L. (2004) Lowering plasma cholesterol by raising LDL receptors. *Atheroscler. Suppl.* 5 (3) : 57-59.
36. BRUDE, I. R., DREVON, C., HJERMANN, I., SELJEFLOT, I., LUND-KATZ, S., SAAREM, K., SANDSTAD, B., SOLVOL, K., HALVORSEN, B., ANESEN, H., NENSETER, M. S. (1997) Peroxidation of LDL from combined-hyperlipidemic male smokers supplied with omega-3 fatty acids and antioxidants. *Arterio. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 2576-2588.

37. BUETTNER, G. R. (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 300(2): 535-543.
38. BURR, M. L., FEHILY, A. M., GILBERT, J. F., ROGERS, S., HOLLIDAY, R.M., SWEETNAM, P. M., ELWOOD, P. C., DEADMAN, N. M. (1989) Effects of changes in fat fish and fiber intakes on death and myocardial reinfarction : Diet And Reinfarction Trial (DART). *Lancet.* 334 : 757-761.
39. CAMPOS, M. V., RUAS, L., PAIVA, S., LEITAO, P., LOBO, C., MARTA, E., SOBRAI, E., CRAVO, A., CARVALHEIRO, M. (2004) Fetal growth and glycemic control in type 1 diabetes pregnancy. *Acta Med. Port.* 17(2):167-172.
40. CAO, G., ALESSIO, H. M., CUTLER, R. G. (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free radic. Biol. Med.* 14: 303-311.
41. CATLIN, E. A., CHA, C. J. M., OH, W. (1985) Postnatal growth and fatty acid synthesis in insulin-induced macrosomic rat pups. *Metabolism.* 34: 1110-1114.
42. CEDERBERG, J., BASU, S., ERIKSSON, U. J. (2001) Increased rate of lipid peroxidation and protein carbonylation in experimental diabetic pregnancy. *Diabetologia.* 44: 766- 774.
43. CERIELLO, A. (2000) Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism.* 49: 27-29.
44. CERIELLO, A., FALLETI, E., BORTOLOTTI, N., MOTZ, E.,CAVARAPE, A., RUSSO, A.,GONANO, F., BARTOLI, E. (1996) Increased circulating intercellular adhesion molecule- 1 levels in type II diabetic patients: the possible role of metabolic control and oxidative stress. *Metabolism.* 45 : 498-501.
45. CHA, C. H. J., GELARDI, N. L., OH, W. (1987) Accelerated growth and abnormal glucose tolerance in young female rats exposed to fetal hyperinsulinemia. *Pediatr. Res.* 21 : 83-87.

46. CHAIT, A., BIERMAN, E. L., ALBERTS, J. J. (1979) Low-density lipoprotein receptor activity in cultured human skin fibroblasts. Mechanism of insulin-induced stimulation. *J. Clin. Invest.* 64: 1309-1319.
47. CHIRICO, S., SMITH, C., MARCHANT, C., MITCHINSON, M. J., HALLIWELL, B. (1993) Lipid peroxidation in hyperlipidaemic patients. A study of plasma using an HPLC-based thiobarbituric acid test. *Free. Radic. Res. Commun.* 19: 51-57.
48. CHOI, Y. S., IKEDA, I., SUGANO, M. (1989) The combined effects of dietary proteins and fish oil on cholesterol metabolism in rats of different age. *Lipids.* 24:506- 510.
49. CHUKWUMA, C., TUOMILEHTO, J. (1998) The "thrifty" hypotheses : clinical and epidemiological significance for non-insulin dependent diabetes mellitus and cardiovascular disease risk factors. *J. Cardiovasc. Risk.* 5 : 11-23.
50. CLINKENBEARD, K. D., REED, W. D., MONEY, R. A., LANE, M. D. (1975) Intracellular localization of the 3-hydroxy-3 methylglutaryl coenzyme A cycle enzymes. *Liver. J. Biol. Chem.* 250: 3108-3116.
51. COMBS, C. A, GUNDERSON, E., KITZMILLER, J. L., GAVIN, L. A., MAIN, E. K. (1992) Relationship of fetal macrosomia to maternal postprandial glucose control during pregnancy. *Diabetes Care.* 15 : 1251-1257.
52. COMMERFORD, S. R., PAGLIASSOTTI, M. J., MELBY, C. L., WEI, Y., HILL, J. O. (2001) Inherent capacity for lipogenesis or dietary fat retention is not increased in obesity-prone rats. *Am. J. Physiol,* 280: 1680-1687.
53. CONNOR, W. E. (1986) Hypolipidemic effects of dietary  $\omega$ -3 fatty acids in normal and hyperlipidemic humans: Effectiveness and mechanisms. In: Simopoulos A. P., Kifer R. R. Martin R. E., eds. Health effects of polyunsaturated fatty acids in seafoods. *New York: Academic Press.* 173.

54. CONNOR, W. E., BRISTOW, J. D. (1985) Coronary heart disease prevention, complications and treatment. *Philadelphia: Lippincott*. 158.
55. COURDEROT-MASUYER, C., LAHET, J. J., VERGES, B., BRUN, J. M., ROCHETTE, L. (2000) Ascorbyl free radical release in diabetic patients. *Cell. Mol. Biol.* 46: 1397-1401.
56. COWETT, R. M., SCHWARTZ, R. (1982) The infant of the diabetic mother. *Pediatr. Clin. North. Am.* 29: 1213-1231.
57. CUNNANE, S. C., MCADOO, K. R., HORROBIN, D. F. (1986) N-3 essential fatty acids decrease weight gain in genetically obese mice. *Br. J. Nutr.* 56: 87-95.
58. CUNNINGHAM, J. M., GREEN, I. C. (1994) Cytokines, nitric oxide and insulin secreting cells. *Growth Regul.* 4 : 173-180.
59. CURHAN, G. C. WILLETT, W.C., RIMM, E. B., SPIEGELMAN, D., ASCHERIO, A. L., STAMPFER, M. J. (1996) Birth weight and adult hypertension, diabetes mellitus, and obesity in US men. *Circulation.* 94(12): 3246-3250.
60. CURTIN, J. F., DONOVAN, M., COTTER, T. G. (2002) Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Immunol. Methods.* 265:49-72.
61. DAMM, P., KÜHL, C., BERTELEN, A., MOLSTED-PEDERSON, L. (1991) Predictive factors for development of diabetes in women with previous gestational diabetes mellitus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 167 : 607-616.
62. DANDONA, P., THUSU, K., COOK, S., SNYDER, B., MAKOWSKI, J., ARMSTRONG, D., NICOTERA, T. (1996) Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet.* 347 : 444-445.
63. DANG, A. Q., KEMP, K., FAAS, F. H., CARTER, W. J. (1989) Effect of dietary fats on fatty acid composition and delta-5-desaturase in normal and diabetic rats. *Lipids.* 24: 882.

64. DAS, U. N., KUMAR, K. V., MOHAN, I. K. (1994) lipid peroxides and essential fatty acids in patients with diabetes mellitus and diabetic nephropathy . *J. Nutr. Med.* 4:149.
65. DAS, U. N., MOHAN, I. K., RAJU, T. R. (2001) Effect of corticosteroids and eicosapentaenoic acid/docosahexaenoic acid on pro-oxidant and antioxidant status and metabolism of essential fatty acids in patients with glomerular disorders. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty. Acids.* 65: 197-203.
66. DAVID, J. S. K., BAZZAN, A., WEAVER, J., MAYER, D., REICHLER, F. A. (1987) Cholesterol lowering mechanism by n-3 fatty acids in rats models. *Arteriosclerosis.* 7: 535.
67. DE FRONZO, R. A. (1999) Pathogenesis of type 2 diabetes : metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev.* 5 :177-269.
68. DE LORGERIL, M., RENAUD, S., MAMELLE, N. (1994) Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet.* 343:1454-1459.
69. DE MATTIA, G., BRAVI, M. C., LAURENTI, O., CASSONE-FALDETTA, M., ARMIENTO, A., FERRI, C., BALSANO, F. (1998) Influence of reduced glutathione infusion on glucose metabolism in patients with non-insulindependent diabetes mellitus. *Metabolism.* 47 : 993-997.
70. DEMOZ, A., WILLUMSEN, N., BERGE, R. K. (1992) Eicosapentaenoic acid at hypotriglyceridemic dose enhances the hepatic antioxidant defense in mice. *Lipids.* 27: 968-972.
71. DESCAMPS, O., BILHEIMER, D., HERZ, J. (1993) Insulin stimulates receptor-mediated uptake of apo E- enriched lipoproteins and activated  $\alpha$ 2-macroglobulin in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 268: 974-981.



72. DEVILLIERS, T. J., MAC FARLANE, C. M., TSAKALAKOS, N., TALJAARD, J. F. (1984) Neonatal pancreatic function in infants born to mothers with gestational and overt diabetes. *S. Afr. Med. J.* **66**: 690-693.
73. DINCER, Y., ALADEMIR, Z., ILKOVA, H., ACKAY, T. (2002) Susceptibility of glutathione and glutathione- related antioxidant activity to hydrogen peroxide in patients with type 2 diabetes: effect of glycemic control. *Clin. Biochem.* **35**: 297-301.
74. DORNER, G., PLAGEMANN, A. (1994) Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life, *Horm. Metab. Res.* **26**: 213- 221.
75. DUNCAN, D. B. (1955) Multiple range and multiple F tests. *Biometrics.* **11**: 1-42.
76. DUNCAN, R. E., EL-SOHEMY, A., ARCHER, M. C. (2005) Regulation of HMG-CoA reductase in MCF-7 cells by genistein, EPA, and DHA, alone and in combination with mevastatin. *Cancer Lett.* **28** : 221-228.
77. DURAND, G., GUESNET, P., CHALON, S., ALESSANDRI, J. M., RIZKALLA, S., LEBRANCHU, Y. (2002) Importance nutritionnelle des acides gras polyinsaturés dans « Aliments fonctionnels ». TEC and DOC. *Sciences et techniques agroalimentaires.* Cachan.
78. DURER, U., FRANKE, H., SOMMER, M., SCHLAG, B., DARGEL, R. (1987) Binding and internalization of low density lipoproteins in fetal rat liver at term under in vivo and in vitro conditions. *Biomed. Biochem. Acta.* **46**: 695-703.
79. DUVILLARD, L., PONT, F., FLORENTIN, E., GALLAND-JOS, C., GAMBERT, P., VERGES, B. (2000) Metabolic abnormalities of apolipoprotein B- containing lipoproteins in non- insulin- dependent diabetes: a stable isotope kinetic study. *Eur. J. Clin. Invest.* **30**: 685-694.

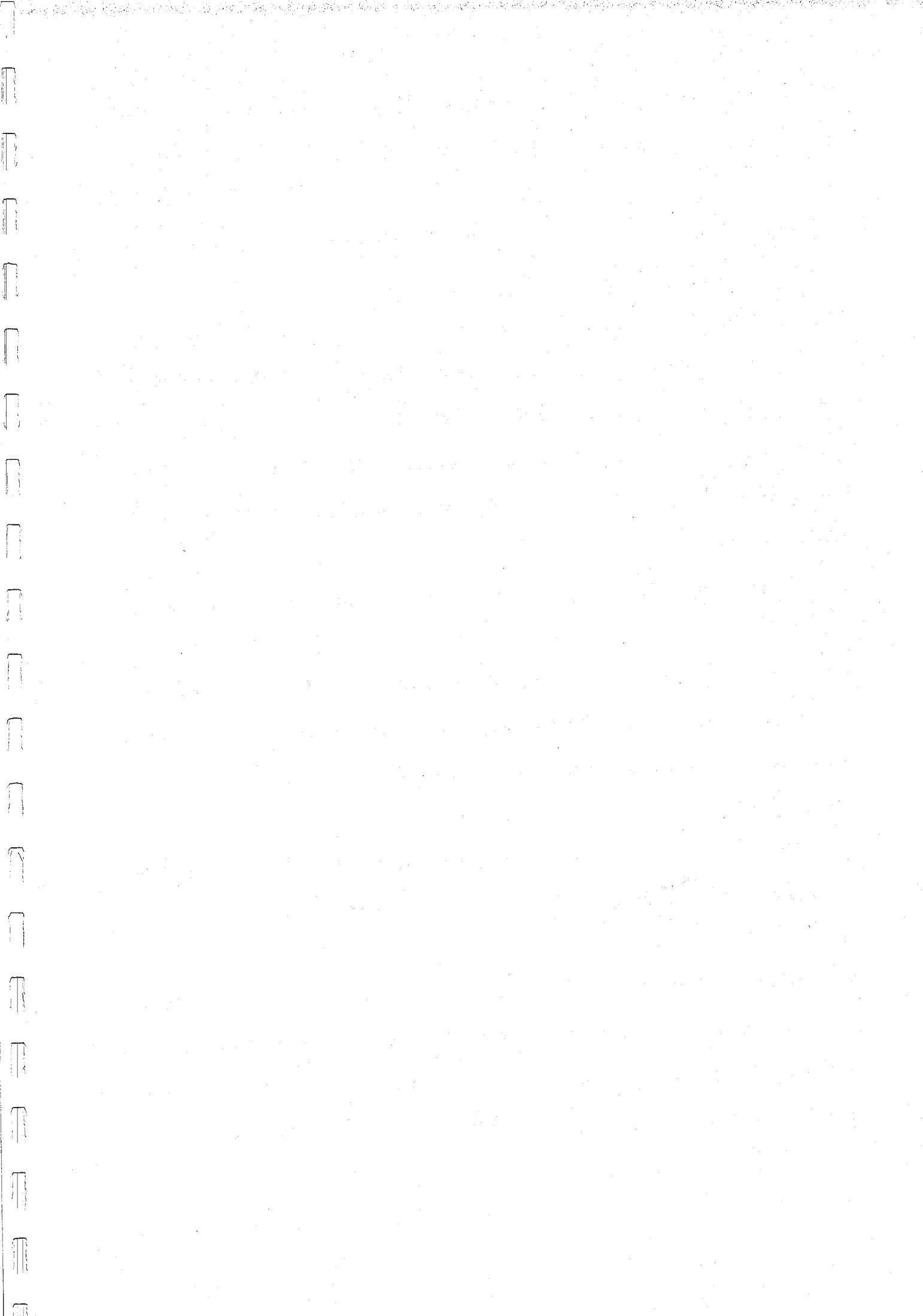
80. ECK, M. G., WYNN, J. O., CARTER, W. J., FAAS, F. H. (1979) Fatty acid desaturation in experimental diabetes mellitus. *Diabetes*. 28: 479-485.
81. ECKEL, R. H. (1989) Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N. Engl. J. Med.* 320: 1060-1068.
82. EINARSSON, K., AKERLUND, J. E., BJORKHEM, I. (1987) The pool of free cholesterol is not of major importance for regulation of the cholesterol 7 $\alpha$  - hydroxylase activity in rat liver microsomes. *J. Lipid. Res.* 28: 253-256.
83. ELNSTER, E. F., YOUNGMAN, R. J., OBWALD, W. (1983) Superoxide dismutase. In *Methods of enzymatic analysis*. H.B. Bergmeyer. 3 : 293-302.
84. ERIKSSON, J. G. FORSEN, T., TUOMILEHTO, J., WINTER, P. D., OSMOND, C., BARKER, D. J. (1999) Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: longitudinal study. *B.M.J.* 318(7181): 427-431.
85. ESTERBAUER, H. (1995) The chemistry of oxidation of lipoproteins. in: Rice-Evans C, Bruckdorfer KR (eds) *Oxidative stress. Lipoproteins and cardiovascular dysfunction* : 55-79.
86. FAILOR, R. A., CHILDS, M. T., BIERMAN, E. (1988) The effects of n-3 and n-6 fatty acid enriched diets on plasma lipoprotein and apoproteins in familial combined hyperlipidemia. *Metabolism*, 37: 1021- 1027.
87. FANTAPPIE, S., CATAPANO, A. L., CANCELLERI, M., FASOLI, L., DE FABIANI, M., BERTOLINI, M., BOSISIO, E. (1992) Plasma lipoproteins and cholesterol metabolism in yoshida rats : an animal model of spontaneous hyperlipemia. *Life Sci.* 50: 1913- 1924.
88. FASCHING, P., RATHEISER, K., WALDHAUSL, W., ROHAC, M., OSTERRODE, W., NOWOTNY, P., VIERHAPPER, H. (1991) Metabolic effect of fish-oil supplementation in patients with impaired glucose tolerance. *Diabetes*, 40: 583-589.

89. FICKOVA, M., HUBERT, P., CREMEL, G., LERAY, C. (1998) Dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acids rapidly modify fatty acid composition and insulin effects in rat adipocytes. *J. Nutr.* 128: 512 - 519.
90. FOLCH, J., LEES, M., SLOANE-STANLEY, G.H. (1957) A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.
91. FOURNIE, A. (1997) Collège National des Gynécologues et obstétriciens Français. Le diabète gestationnel. Recommandation. *Diabetes & Metabolism.* 23 : 48-52.
92. FOWDEN, A. L. (1989) The role of insulin in prenatal growth. *J. Dev. Physiol.* 12: 173-182.
93. FRAYN, K. N., COPPACK, S. W. (1992) Insulin resistance, adipose tissue and coronary heart disease. *Clin. Sci.* 82: 1-8.
94. FRIED, S. K., RUSSELL, C. D., GRAUSO, N. L., BROLIN, R. E. (1993) lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissues of obese women and men. *J. Clin. Invest.* 92: 2191-2198.
95. FUKUI, T., NOMA, T., MIZUSHIGE, K., AKI, Y., KIMURA, S., ABE, Y. (2000) Dietary troglitazone decreases oxidative stress in early stage type II diabetic rats. *Life Sci.* 66 : 2043-2049.
96. FUMERON, F., BRIGANT, L., OLLIVIER, V., DE PROST, D., DRISS, F., DARCET, P., BARD, J.M., PARRA, H.J., FRUCHART, J.C., APFELBAUM, M. (1991) N-3 polyunsaturated fatty acids raise low-density lipoproteins, high-density lipoprotein 2, and plasminogen-activator inhibitor in healthy young men. *Am. J. Clin. Nutr.* 54: 118-122.
97. GARCIA-MOLINA, V., AGUILERA, J. A., GIL, A., SANCHEZ-POZO, A. (1996) Changes in plasma lipoproteins and liver lipids in neonatal rats. *Comp. Biochem. Physiol.* 113B: 789-793.

98. GAUGUIER, D., BIHOREAU, M. T., KTORZA, A., BERTHAULT, M. F., PICON, L. (1990) Inheritance of diabetes mellitus as a consequence of gestational hyperglycemia in rats. *Diabetes*. 49: 734-739.
99. GELARDI, N. L., CHA, C. J., OH, W. (1990) Glucose metabolism in adipocytes of obese offspring of mild hyperglycemic rats. *Pediatr. Res.* 28: 641- 645.
100. GELARDI, N., L., CHA, C. J., OH, W. (1991) Evaluation of insulin sensitivity in obese offspring of diabetic rats by hyperinsulinemic-euglycemic clamp technique. *Pediatr. Res.* 30, 40-44.
101. GHISELLI, A., SERAFINI, M., NATELLA, F., SCACCINI, C. (2000) Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radi. Biol. Med.* 29:1106-1114.
102. GINSBERG, H. N. (1991) Lipoprotein physiology in nondiabetic and diabetic states. Relationship to atherogenesis. *Diabetes Care*. 14: 839-855.
103. GINSBERG, H. N., GOLDBERG, I. J. (1998) Disorders of lipoprotein metabolism. In: Fauci AS et al. (eds) *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill, New York 2 :2138-2149.
104. GLOMSET, J. A., WRIGHT, J. L. (1964) Some properties of cholesterol esterifying enzyme in human plasma. *Biochim. Biophys. Acta*. 89: 266-271.
105. GOLDBERG, D. M., SPOONER, R. J. (1992) Glutathione reductase. In *Methods of enzymatic analysis*. H.B. Bergmeyer. 3 : 673-684.
106. GOLDSTEIN, J. L., BROWN, M. S. (1987) Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circulation*, 76(3): 504-507.

107. GOLDSTEIN, R., LEVY, E., SHAFRIR, E. (1985) Increased maternal-fetal transport of fat in diabetes assessed by polyunsaturated fatty acid content in fetal lipids. *Biol. Neonate*. 47: 343-349.
108. GOODMAN, D. S., DEYKIN, D., SHIRATORI, T. (1964) The formation of cholesterol esters with rat liver enzymes. *J. Biol. Chem.* 239: 1335-1345.
109. GOPAUL, N. K., MANRAJ, M. D., HB, A., YAN, S. L. K., JOHNSON, A., CARRIER, M. J., ANGGARD, E. E. (2001) Oxidative stress could precede endothelial dysfunction and insulin resistance in Indian Mauritians with impaired glucose metabolism. *Diabetologia*. 44: 706-712.
110. GRANKVIST, K., MARKLUND, S. L., TALJEDAL, I. B. (1981) CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem. J.* 199: 393-398.
111. GRUNDY, S. M. (1986) Effect of fatty acids on lipoprotein metabolism in man: perspectives for actions of fish oil fatty acids. In: Simopoulos A. P., Kifer R. R. Martin R. E., eds. Health effects of polyunsaturated fatty acids in sea foods. *New York: Academic Press*. 153- 172.
112. GUTTERIDGE, J. M. C. (1992) Invited review free radicals in disease processes : a compilation of cause and consequence. *Free Rad. Res. Comm.* 19: 598-620.
113. HALLIWELL, B. (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 344: 721-724.
114. HALLIWELL, B. (2000) The antioxidant paradox. *Lancet*. 355: 1179-1180.
115. HANSEN, L. L., IKEDA, Y., OLSEN, G. S., BUSCH, A. K., MOSTHAF, L. (1999) Insulin signaling is inhibited by micromolar concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Evidence for a role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in tumor necrosis factor alpha-mediated insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 274 : 25078-25084.

116. HARRIS, E. D. (1992) Regulation of antioxidant enzymes. *FASEBJ.* 6: 2675-2683.
117. HARRIS, W. S. (1983) N-3 fatty acids and LDL cholesterol or looking beyond the risk factors. *n-3 news.* 3: 1-3.
118. HARRIS, W. S. (1989) Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: A critical review. *J. Lipid Res.* 30: 785- 807.
119. HARRIS, W. S. (1990) Omega-3 fatty acids effect on lipid metabolism. *Cur. Op. Lipid.* 1 : 5-11.
120. HARRIS, W. S., CONNOR, W. E., ALAM, N., ILLINGWORTH, D. R. (1988) Reduction of postprandial triglyceridemia in humans by dietary n-3 fatty acids. *J. Lipid. Res.* 29: 1451-1457.
121. HARRIS, W. S., CONNOR, W. E., ILLINGWORTH, D. R., FOSTER, D. M. (1984) The mechanism of hypoglyceridemic effect of dietary  $\omega$ -3 fatty acids in man. *Clin. Res.* 32: 560A.
122. HAUG, A., HOSTMARK, A. T. (1987) lipoprotein lipases, lipoproteins and tissue lipids in rats fed fish oil or coconut oil. *J. Nutr.* 117: 1011-1016.
123. HAVEL, R. J., EDER, H. A., BRAGDON, J. H. (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.* 34:1345-1353.
124. HERRERA, E., AMUSQUIVAR, E., LOPEZ-SOLDADO, I., ORTEGA, H. (2006) Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Horm. Res.* 65 (3): 59-64.
125. HIGDON, J. V., FREI, B. (2003) Obesity and oxidative stress: a direct link to CVD. *Arteriosclr. Thromb. Vasc. Biol.* 23: 365-367.
126. HILL, D. E. (1978) Effect of insulin on fetal growth. *Semin. Perinatol.* 2: 319-328.



135. ILLINGWORTH, D. R., CONNOR, W. E., HATCHER, L. F., HARRIS, W. S. (1984) Hypolipidaemic effects of n-3 fatty acids in primary hyperlipoproteinaemia. *J. Int. Med.* 225: 91-98.
136. ILLINGWORTH, D. R., HARRIS, W. S., CONNOR, W. E. (1984) Inhibition of low density lipoproteins synthesis by dietary n-3 fatty acids in humans. *Atherosclerosis.* 4: 270-275.
137. INNIS, S. M. (1991) Essential fatty acids in growth and development. *Prog. Lipid Res.* 30: 39-103.
138. IRITANI, N., INOBUCHI, K., ENDO, M., FUKUDA, E., MORITA, M. (1980) Identification of shellfish fatty acids and their effects on lipogenic enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* 618: 378-385.
139. JACKSON, T. K., SALHANICK A. I., ELOVSON, J., DEICHMAN, M. L., AMATRUDA, J. M. (1990) Insulin regulates apolipoprotein B turnover and phosphorylation in rat hepatocytes. *J. Clin. Invest.* 86: 1746-1751.
140. JAESCHKE, H. (1995) Mechanism of oxidant stress-induced acute tissue injury. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 209: 104-111.
141. JELINEK, D. F., ANDERSSON, S., SLAUGHTER, C. A., RUSSEL, D. W. (1990) Cloning and regulation of 7  $\alpha$ -hydroxylase, the rate-limiting enzyme in bile acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 265: 8190-8197.
142. JENSEN, D. M., DAMM, P., SORENSEN, B. (2001) Clinical impact of mild carbohydrate intolerance in pregnancy: A study of 2904 non-diabetic Danish women with risk factors for gestational diabetes mellitus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 185: 413-419.
143. JIAO, S., MATSUZAWA, Y., MATSUBARA, K., KUBO, M., TOGUNAGA, K., OKADA, H., IKEDA, H., MATSUO, T., TARUI, S. (1991) Abnormalities of plasma



lipoproteins in a new genetically obese rat with non-insulin-dependent diabetes mellitus (wistar fatty rat). *Int. J. Obes.* 15: 487-495.

144. JIAO, S., MOBERLY, J. B., COLE, T. G., SCHONFELD, G. (1989) Decreased activity of acyl CoA: Cholesterol acyltransferase by insulin in human intestinal cell line Caco-2. *Diabetes.* 38: 604-609.

145. JOLLY, C. A., JIANG, Y. H., CHAPKIN, R. S., MC MURAY, D.N. (1997) Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids suppress murine Lymphoproliferation, Interleukin-2 secretion, and the formation of diacylglycerol and ceramide. *J. Nutr.* 127: 37-43.

146. JONES, C. W. (2001) Gestational diabetes and its impact on the neonate, *Neonat. Netw.* 20: 17- 23.

147. JONES, R. G., ILIC, V., WILLIAMSON, D. H. (1984) Regulation of lactating-rat mammary gland lipogenesis by insulin and glucagon *in vivo*. *Biochem. J.* 223: 345-351.

148. JUCKER, B. M., CLINE, G. W., BARUCCI, M. SHULMAN, G. I. (1999) Differential effects of safflower oil versus fish oil feeding on insulin-stimulated glycogen synthesis , glycolysis, and pyruvate dehydrogenase flux in skeletal muscle. *Diabetes*, 48: 134-140.

149. KAARE, R. NORUM, M. D. (1992) Dietary fat and blood lipids. *Nutr. Rev.* 50: 30-37.

150. KALKHOFF, R. K., KANDARAKI, E., MORROW, P. G., MITCHELL, T. H., KELBER, S., BORKOWF, H. I. (1988) Relationship between neonatal birthweight and maternal plasma amino acid profiles in lean and obese nondiabetic women and in type 1 diabetic pregnant women. *Metabolism.* 37: 234-239.

151. KALOUSOVA, M., SKRHA, J., ZIMA, T. (2002) Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol. Res.* 51 : 597-604.

152. KAPLAN, S. A. (1984) The insulin receptor. *J. Pediatr.* **104**: 327-336.
153. KATHER, H. (1981) Hormonal regulation of adipose tissue lipolysis in man: Implications for the pathogenesis of obesity. *Triangle.* **20**: 131-143.
154. KEHRER, J. P. (1993) Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. toxicol.* **23**(1): 21-48.
155. KESAVULU, M. M., KAMESWARARAO, B., APPARAO, C. H., KUMAR, E. G., HARINARAYAN, C. V. (2002) Effect of omega-3 fatty acids on lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in type 2 diabetic patients. *Diabetes. Metab.* **28**: 20-26.
156. KHAN, N. A., HICHAMI, A. (2002) Role of n-3 polyunsaturated fatty acids in the modulation of t-cell signaling. In: PANADLAI G (ed). *Recent Research developpment in lipids*, **6**: 65-78.
157. KING, J. C. (2000). Physiology pregnancy and nutrient metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**: 1218S- 1225S.
158. KINSELL, L. W., MICHAELS, G. D., WALKER, G., VISITINE, R. E. (1961) The effect of fish oil on plasma lipids. *Diabetes.* **10**: 316- 324.
159. KISSEBAH, A. H., FREEDMAN, D. S., PEEIRIS, A. N. (1989) Health risks of obesity. *Med. Clin. North Am.* **73**, 11-138.
160. KJELDHAL, L. (1883) Neue methode zur bestimmung des sticktoffs in organischem korpen. *Z. Anal. Chem*, **22**: 366- 382.
161. KNIPPING, G. (1986) Isolation and properties of porcine lecithine:cholesterol acyltransferase. *Eur. J. Biochem.* **154**: 289-294.
162. KNOPP, R. H., WARTH, M. R., CHARLES, D., CHILDS, M., LI, J. R., MABUCHI, H., VAN ALLEN, M. I. (1986) Lipoprotein metabolism in pregnancy, fat transport to the foetus, and the effects of diabetes. *Biol. Neonate.* **50**: 297-317.

163. KOLB, H., KOLB-BACHOFEN, V. (1992) Nitric oxide: a pathogenic factor in autoimmunity. *Immunol. Today*. 13: 157-160.
164. KOLTERMAN, O. G., INSEL, J., SAEKOW, M., OLEFSKY, J. M. (1980) Mechanisms of insulin resistance in human obesity, evidence for receptor and post-receptor defects. *J. Clin. Invest.* 65: 1272-1284.
165. KRAEMER, F. B., SATHER, S. A., PARK, B., SZTALRYD, C., NATU, V., MAY, K., NISHIMURA, H., SIMPSON, I., COOPER, A. D., CUSHMAN, S. W. (1994) Low-density lipoprotein receptors in rat adipose cells: subcellular localization and regulation by insulin. *J. Lipid Res.* 35: 1760-1772.
166. KRALIK, P. M., XU, B., EPSTEIN, P. N. (1998) Catalase transfection decreases hydrogen peroxide toxicity in a pancreatic beta cell line. *Endocr. Res.* 24 : 79-87.
167. KRIPPEIT-DREWS, P., KRAMER, C., WELKER, S., LANG, F., AMMON, H. P., DREWS, G. (1999) Interference of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic beta-cells. *J. Physiol.* 514 : 471-481.
168. KRIPPEIT-DREWS, P., LANG, F., HAUSSINGER, D., DREWS, G. (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced hyperpolarization of pancreatic B-cells. *Pflugers Arch.* 426 : 552- 554.
169. KROMHOUT, D. (1989) N-3 fatty acids and coronary heart disease: epidemiology from Eskimos to Western populations. *J. Intern. Med. Suppl.* 225: 47-51.
170. KROMHOUT, D., BOSSCHIETERR, B., DE LEZENNE-COULANDER, C. (1985) The inverse relation between fish consumption and 20 years mortality from coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* 312 :1205-1209.
171. KUBISCH, H. M., WANG, J., BRAY, T.M., PHILLIPS, J. P. (1997) Targeted overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase protects pancreatic beta-cells against oxidative stress. *Diabetes.* 46 : 1563-1566.

172. KUBISCH, H. M., WANG, J., LUCHE, R., CARLSON, E., BRAY, T. M., EPSTEIN, C. J., PHILLIPS, J. P. (1994) Transgenic copper/zinc superoxide dismutase modulates susceptibility to type I diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91 : 9956-9959.
173. LAAKSO, M., SARLUND, H., MYKKANEN, L. (1990) Insulin resistance is associated with lipid and lipoprotein abnormalities in subjects with varying degrees of glucose tolerance. *Arteriosclerosis.* 10: 223-231.
174. LACOUR, B. (1992) Creatinine and renal function. *Nephrologie.* 13(2) : 73-81.
175. LAIGHT, D. W., DESAI, K. M., GOPAUL, N. K., ANGARD, E. E, CARRIER, M. G.(1999) F2-isoprostane evidence of oxidant stress in the insulin resistant, obese Zucker rat : effects of vitamin. *E. Eur. J. Pharmacol.* 377 : 89-92. (a)
176. LAIGHT, D. W., DESAI, K. M., GOPAUL, N. K., ANGARD, E. E, CARRIER, M. G. (1999) Pro-oxidant challenge in vivo provokes the onset of NIDDM in the insulin resistant obese Zucker rat. *Br. J. Pharmacol.* 128 : 269-271. (b)
177. LAKER, M. E., MAYES, P. A. (1984) Investigation into the direct effects of insulin on hepatic ketogenesis, lipoprotein secretion and pyruvate deshydrogenase activity. *Biochem. Biophys. Acta.* 795: 427-430.
178. LANGER, O., BERKUS, M., BRUSTMAN, L., ANYAEGBUNAM, A., MAZZE, R. (1991) Rationale for Insulin Management in Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes.* 40 (2) : 186-190.
179. LARDINOIS, C. K., STARICH, G. H. (1991) Polyunsaturated fats enhance peripheral glucose utilization in rats. *J. Am. Coll. Nutr.* 10: 340-345.
180. LAWRENCE, R. A., BURK, R. F. (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23 ;71(4):952-958.
181. LECERF, J. M. (2000) Acides gras essentiels. *Encyclp. Med. Chir. Edition scientifique et Médicales Elsevier SAS, Paris Endocrinologie, Nutrition.* 10 :542.

182. LEINONEN, J., LEHTIMAKI, T., TOYOKUNI, S. (1997) New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non- insulin-dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett.* 417 : 150-152.
183. LENZEN, S., DRINKGERN, J., TIEDGE, M. (1996) Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic. Biol. Med.* 20 : 463-466.
184. LEVINE, R. L., GARLAND, D., OLIVER, C. N., AMICI, A., CLIMENT, I., LENZ, A. G., AHN, B. W., SHANTI, S., STADTMAN, E. R. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186: 464- 478.
185. LEVINE, S. A., KIDD, P. M. (1996) Antioxidant adaptation. Its role in free radical pathology. San Leandro, California. Eds A. *Biocurrents division, Allergy Research Group.*
186. LEWIS, G. F., UFFELMAN, K. D., SZETO, L. W., STEINER, G. (1993) Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals. *Diabetes.* 42: 833-834.
187. LI, Y., HOU, M. J., MA, J., TANG, Z. H., ZHU, H. L., LING, W. H. (2005) Dietary fatty acids regulate cholesterol induction of liver CYP7alpha1 expression and bile acid production. *Lipids.* 40(5):455-462.
188. LICHTENSTEIN, A. H., KENNEDY, E., BARRIER, P. (1998) Dietary fatty consumption and health. *Nutr. Rev.* 56: 3- 19.
189. LING, P. R., BOYCE, P., BISTRAN, B. R. (1998) Role of arachidonic acid in the regulation of the inflammatory response in TNF- $\alpha$ - treated rats. *J. Parent. Enter. Nutr.* 22: 268-275.
190. LITHELL, H. O. (1996) Relation of size at birth to non-insulin dependent diabetes and insulin concentrations in men aged 50-60 years. *BMJ.* 312 (7028): 406-410.

191. LONG, S. D., O'BRIEN, K., MAC DONALD, K. G. (1995) Weight change in people with NIDDM. The WHO Multinational Study of vascular Disease in Diabetes. *Diabetes Care*. 18 : 766-774.
192. LOVEJOY, J. C. (1999) Dietary fatty acids and insulin resistance. *Current atherosclerosis reports*. 1: 215-220.
193. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. I. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
194. LYONS, T. J. (1993) Glycation and oxidation: a role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 25;71(6):26B-31B.
195. MAECHLER, P., JORNOT, L., WOLLHEIM, C. B. (1999) Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. *J. Biol. Chem.* 274 : 27905-27913.
196. MAECHLER, P., WOLLHEIM, C. B., BENTZEN, C. L., NIESOR, E. (1992) Role of the intestinal acyl CoA: Cholesterol acyltransferase activity in the hyperresponse of diabetic rats to dietary cholesterol. *J. Lipid Res.* 33: 1475- 1484.
197. MALAISSE, W. J., MALAISSE-LAGAE, F., SENER, A., PIPELEERS, D. G. (1982) Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic B-cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79 : 927-930.
198. MALMSTROM, R., PACKARD, C. J., CASLAKE, M., BEDFORD, D., STEWART, P., YKI-JARVINEN, H., SEPHERD, J., TASKINEN, M. R. (1998) Effects of insulin and acipimox on VLDL1 and VLDL2 apolipoprotein B production in normal subjects. *Diabetes*. 47: 779-787.
199. MATSUYAMA, N., KOSAKA, T., FUKUHARA, M., SODA, Y., MIZUNO, K. (1999) Polyunsaturated fatty acid anilides as inhibitors of acyl-coA: cholesterol acyltransferase (ACAT). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19;9 (14): 2039-2042.

200. MAXWELL, S. R., THOMASON, H., SANDLER, D. (1997) Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur. J. Clin. Invest.* 27 : 484-490.
201. MAXWELL, S. R., THOMASON, H., SANDLER, D. (1997) Poor glycaemic control is associated with reduced serum free radical scavenging (antioxidant) activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann. Clin. Biochem.* 34 : 638-644.
202. MAYNE, S. T. (2003) Antioxidant nutrients and chronic disease: Use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J. Nutr.* 133: 933 S- 940S.
203. MAZZA, G., OOMAH, B. D. (2000) Functional Foods, Biochemical and Processing Aspects. *Technomic. Publ. Co. Inc., Lancaster.*
204. MAZZONE, T., FOSTER, D., CHAIT, A. (1984) *In vivo* stimulation of low-density lipoprotein degradation by insulin. *Diabetes.* 33: 333-338.
205. MC GARRY, J. D., DOBBINS, R. L. (1999) Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia.* 42 : 128-138.
206. MC LENNAN, S. V., HEFFERNAN, S., WRIGHT, L., RAE, C., FISHER, E., YUE, D. K. (1991) Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. *Diabetes.* 40: 344-348.
207. MC MANUS, R. M., RYAN, E. A. (1992) Insulin requirements in insulin-dependent and insulin-requiring GDM women during final month of pregnancy. *Diabetes Care.* 15 : 1323-1327.
208. MC NEILLIE, E. M., ZAMMIT, V. A. (1982) Regulation of acetyl-CoA carboxylase in rat mammary gland. *Biochem. J.* 204: 273-280.
209. MCGARRY, J. D., DOBBINS, R. L. (1999) Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia.* 42 : 128-138.

210. MEGHELLI-BOUCHENAK, M., BOQUILLON, M., BELLEVILLE, J. (1989) serum lipoprotein composition and amounts during the consumption of two different low protein diets followed by a balanced diet, *Nutrition Reports International* 39, 323-343.
211. MEHTA, S., NUAMAH, I., KALHAN, S. (1991) Altered diastolic function in asymptomatic infants of mothers with gestational diabetes. *Diabetes*. 40 : 56-60.
212. MERZOUK, H., KHAN, N. A. (2003) Implication of lipids in macrosomia of diabetic pregnancy: Can n-3 polyunsaturated fatty acids exert beneficial effects? *Clin.sci*.105: 519-529.
213. MERZOUK, H., MADANI, S., BOUALGUA, A., PROST, J., BOUCHENAK, M., BELEVILLE, J. (2001) Age- related changes in cholesterol metabolism in macrosomic offspring of rats with streptozotocin- induced diabetes. *J. Lipid Res*. 42: 1152- 1159.
214. MERZOUK, H., MADANI, S., CHABANE SARI, D., PROST, J., BOUCHENAK, M., BELEVILLE, J. (2000) The time course of changes in serum glucose, insulin, lipids and tissue lipase activities in macrosomic offspring of streptozotocin- induced diabetes, *Clin. Sci*. 98: 21- 30.
215. MERZOUK, H., MADANI, S., HICHAMI, A., PROST, J., BELEVILLE, J., KHAN, N. A. (2002). Age- related changes in fatty- acids in obese offspring of streptozotocin- induced diabetic rats. *Obesity Res*. 10: 703- 714. (a)
216. MERZOUK, H., MADANI, S., HICHAMI, A., PROST, J., MONTAIROU, K., BELEVILLE, J., KHAN, N. A. (2002) Impaired lipoprotein metabolism in obese offspring of streptozotocin- induced diabetes rats. *Lipids*. 37: 773- 781. (b)
217. MERZOUK, S., HICHAMI, A., MADANI, S., MERZOUK, H., YAHIA BERROUIGUET, A., PROST, J., MONTAIROU, K., CHABANE SARI, N., KHAN, N. A. (2003) Antioxidant status levels of different vitamins determined by high performance liquid



chromatography in diabetic subjects with multiple complications. *Gen. Physiol. Biophys.* 22: 15-27.

218. MERZOUK, S., HICHAMI, A., SARI, A., MADANI, S., MERZOUK, H., YAHIA BERROUIGUET, A., LENOIR-ROUSSEAU, J. J., CHABANE SARI, N., KHAN, N. A. (2004) Impaired Oxidant/Antioxidant status and LDL-Fatty Acid Composition Are Associated with Increased Susceptibility to Peroxidation of LDL in Diabetic Patients. *Gen. Physiol. Biophys.* 23: 387-399.

219. MILES, E. A., CALDER, P. C. (1998) Modulation of immune functions by dietary fatty acids. *Proc. Nut. Soc.* 57:277-292.

220. NAKAZAKI, M., KAKEI, M., KORIYAMA, N., TANAKA, H. (1995) Involvement of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in free radical-mediated inhibition of insulin secretion in rat pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 44 : 878-883.

221. NAPOLI, C., (1997) Low density lipoprotein oxidation and atherogenesis: From experimental models to clinical studies. *G. Ital. Cardiol.* 27(12): 1302-1314.

222. NASSAR, B. A., HUANG, Y. S., MANKU, M. S., DAS, U. N., MORSE, N., HORROBIN, D. F. (1986) The influence of dietary manipulation with n-3 and n-6 fatty acids on liver and plasma phospholipid fatty acids in rats. *Lipids.* 21,652-656.

223. NESS, G. C., ZHAO, Z., WIGGINS, L. (1994) Insulin and glucagon modulate hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase activity by affecting immunoreactive protein levels. *J. Biol. Chem.* 269: 29168- 29172.

224. NESTEL, P. J., CONNOR, W. E., REARDON, M. E., CONNOR, S., WONG, S., BOSTON, R. (1984) Suppression by diets rich in fish oil of very low density lipoprotein production in man. *J. Clin. Invest.* 74: 82-89.

225. NESTEL, P. J., POYSER, A. (1976) Changes in cholesterol synthesis and excretion when cholesterol intake is increased. *Metabolism.* 25: 1591- 1599.

226. NESTEL, P. J., WONG, S., TOPPING, D. L. (1986) Dietary long chain polyenoic fatty acids: Suppression of triglyceride formation in rat liver. *Acad. press.* 211-218.
227. NIKI, E., NOGUCHI, N. (1997) Dynamics of oxidation of LDL and its inhibition by antioxidants. *BioFactors.* 6: 201-208.
228. NILSSON-EHLE, P., EKMAN, R. (1977) Rapid, simple and specific assay for lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Artery.* 3: 194-209.
229. NORUM, K. R. (1992) Dietary fat and blood lipids. *Nutr. Rev.* 50: 30-37.
230. NOUROOZ-ZADEH, J., TAJADDINI-SARMADI, J., LING, K. L. E., WOLF, P. S. (1996) Low density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in plasma. Relevance to determination of total plasma lipid hydroperoxide concentrations. *Biochem. J.* 313: 781-786.
231. NOUROOZ-ZADEH, J., TAJADDINI-SARMADI, J., MCCARTHY, S. (1995) Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. *Diabetes.* 44 : 1054-1058.
232. OAKES, N. D., COONEY, G. I., CAMILLERI, S. (1997) Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. *Diabetes,* 46: 1768-1774.
233. OBERLEY, L.W. (1988) Free radicals and diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* 5 : 113-124.
234. OH, W., GELARDI, N. L., CHA, C. J. (1988) Maternal hyperglycaemia in pregnant rats: its effects on growth and carbohydrates metabolism in the offspring. *Metab., clin. Exp.* 37: 1146- 1151.
235. OH, W., GELARDI, N. L., CHA, C. J. (1991) The cross-generation effect of neonatal macrosomia in rats pups of streptozotocin-induced diabetes. *Pediatr. Res.* 29: 606-610.
236. OLEFSKY, J. M. (1977) Mechanism of decreased insulin responsiveness of large adipocytes. *Endocrinology.* 100: 1169-1177.

237. OLIVECRONA, T., BENGTSSON-OLIVECRONA, G. (1990) Lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Curr. Opin. Lipidol.* 1: 222-230.
238. OPARA, E. C., ABDEL-RAHMAN, E., SOLIMAN, S. (1999) Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes. *Metabolism.* 48 : 1414-1417.
239. OWUOR, E. D., KONG, A. N. (2002) Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem. Pharmacol.* 64: 765-770.
240. OZANNE, S. E., MARTENSZ, N. D., PETRY, C. J. (1998) Maternal low protein diet in rats programmes fatty acid desaturase activities in the offspring. *Diabetologia.* 41: 1337-1342.
241. PAGLIA, D. E., VALENTINE, W. N. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 158-169.
242. PALLOTTINI, V., MARTINI, C., PASCOLINI, A., CAVALLINI, G., GORI, Z., BERGAMINI, E., INCERPI, S., TRENTALANCE, A. (2005) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase regulation and age-related hypercholesterolemia: a new role for ROS. *Mech. Ageing Dev.* 126(8): 845-851.
243. PAOLISSO G, D'AMORE A, GIUGLIANO, D. (1993) Pharmacologic doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insulindependent diabetic patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 57 : 650-656.
244. PAOLISSO, G., BALBI, V., VOLPE, C. (1995) Metabolic benefits deriving from chronic vitamin C supplementation in aged non-insulin dependent diabetics. *J. Am. Coll. Nutr.* 14 : 387-392.
245. PAOLISSO, G., D'AMORE, A., BALBI, V. (1994) Plasma vitamin C affects glucose homeostasis in healthy subjects and in non-insulin-dependent diabetics [published errata appear in *Am J Physiol* 1994 Oct ; 267 (4 Pt 1) : section E following table of contents and

1994 Dec ; 267 (6 Pt 3) : section E following table of contents]. *Am J Physiol*, 1994, 266 : E261-E268.(b)

246. PAOLISSO, G., D'AMORE, A., VOLPE, C. (1994) Evidence for a relationship between oxidative stress and insulin action in non-insulin-dependent (typeII) diabetic patients. *Metabolism*. 43 : 1426-1429.(a)

247. PAOLISSO, G., TAGLIAMONTE, M. R., RIZZO, M. R., GIUGLIANO, D. (1999) Advancing age and insulin resistance : new facts about an ancient history. *Eur. J. Clin. Invest.* 29 : 758-769.

248. PARKS, J. S., BULLOCK, B. C., RUDEL, L. L. (1989) The reactivity of plasma phospholipids with lecithin: cholesterol acyltransferase is decreased in fish oil fed monkeys. *J. Biol. Chem.* 264: 2545-2551.

249. PARKS, J. S., GEBRE, A. K. (1997) Long-chain polyunsaturated fatty acids in the sn-2 position of phosphatidylcholine decrease the stability of recombinant high density lipoprotein apolipoprotein A-I and the activation energy of the lecithin:cholesterol acyltransferase reaction. *J.Lipid.Res.* 38(2):266-275.

250. PEDERSEN, J., OSLER, M. (1961) Hyperglycemia as the cause of characteristic features on the fetus and newborn of diabetic mothers. *Dan. Med. Bull.* 8: 78-83.

251. PEDERSEN, O., BECK-NIELSEN, H., KLEBE, J. G. (1981) Insulin receptors in the pregnant diabetic and her newborn. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53: 1160-1169.

252. PELIKANOVA, T., KAZDOVA, L., CHVOJKOVA, S., BASE, J. (2001) Serum fatty acid composition and insulin action in type 2 diabetic patients. *Metabolism*. 50: 1472-1478.

253. PETTITT, D., KNOWLER, W. (1998) Long-term effects of the intra-uterine environment, birth weight, and breast-feeding in Pima Indians. *Diabetes Care* 21 (2): B138-B141.

254. PHILLIPS, S., SHAPIRO, R. (1979) Improved methods for the assay and activation of 3-hydroxy-3 methylglutaryl coenzyme A reductase. *J.Lipid. Res.* 20:588-593.
255. PLAGEMANN, A., HARDER, T., KHOLHOFF, R., ROHDE, W., DORNER, G. (1997) Glucose tolerance and insulin secretion in children of mothers with pregestational IDDM or gestational diabetes. *Diabetologia.* 40: 1094- 1100.
256. POISSON, J. P. (1991) Métabolisme des acides gras essentiels. Alimentation et nutrition dans les pays en développement. 4<sup>ème</sup> journée internationale du GERM : 464-476.
257. POISSON, J. P., CUNNANE, S. C. (1991) Long-chain fatty acid metabolism in fasting and diabetes : relation between altered desaturase activity and fatty acid composition. *J. Nutr. Biochem.* 2: 60-70.
258. POUMES -BALLIHAUT, C., LANGELIER, B., HOULIER, F., ALESSANDRI, J. M., DURAND, G., LATGE, C., GUESNET, P. (2001) Comparative bioavailability of dietary alpha-linolenic and docosahexaenoic acids in the growing rats. *Lipids.* 63: 793-800.
259. PRIBYLOVA, H., DVORAKOVA, L. (1996) Long- term prognosis of infants of diabetic mothers. Relationship between metabolic disorders in newborns and adult offspring. *Acta Diabetol.* 33: 30- 34.
260. PRICHARD, B. N., SMITH, C. C., LING, K. L., BETTERIDGE, D. J. (1995) Fish oils and cardiovascular disease. *Bmj.* 310: 819-820.
261. RABINOVITCH, A. (1998) An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Rev.* 14 : 129-151.
262. RAES, M., RENARD, P., REMACLE, J. (1995) Free radicals as second messengers. *C R Seances Soc. Biol. Fil.* 189 : 355-366.
263. RAZ, A., KAMIN-BELSKY, N., PRZEDECKI, F., OBUKOWICZ, M. G. (1997) Fish oil inhibits D6 desaturase activity *in vivo*: utility in a dietary paradigm to obtain mice depleted of arachidonic acid. *J. Nutr. Biochem.* 8: 558-565.

264. REAVEN, G. M. (1988) Role on insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 37: 1595-1607.
265. REDGRAVE, T. G., ROBERT, D. C. K., WEST, C. E. (1975) Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation. *Anal. Biochem.* 65:42-49.
266. REHMAN, A., NOUROOZ-ZADEH, J., MOLLER, W. (1999) Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. *FEBS Lettr.* 448 : 120-122.
267. RICE-EVANS, C., BURDON, R. (1993) Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog. Lipid. Res.* 32(1): 71-110.
268. RICHARDSON, D., CZECH, M. P. (1978) Primary role of decreased fatty acid synthesis in insulin resistance of large rat adipocytes. *Am. J. Physiol.* 234: 182-189.
269. ROBERST, T. L., KATO, H., GORDON, T., KAGAN, A., RHOADS, G., LAND, C. E., WORTH, R. M., BELSKEY, J. L., DOCK, D. S., MYANASHI, M., KAWAMOTO, S. (1998) Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California. Coronary heart disease risk factors in Japan and Hawaii. *Am. J. Cardiol.* 39: 224-250.
270. ROBERTSON, R. P., HARMON, J. S., TANAKA, Y. (2000) Glucose toxicity of the beta-cell : cellular and molecular mechanisms. In : D Le Roith, SI Taylor, JM Olefsky. Diabetes Mellitus. A fundamental and clinical text. 2nd edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins : 125-132.
271. RODWELL, V. W., NORDSTROM, J. L., MITSCHELEN, J. J. (1976) Regulation of HMG-CoA reductase. *Adv. Lipid. Res.* 14: 1-74.
272. ROE, J. H., KUETHER, C. A. (1943) The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives of dehydroascorbic acid. *J. Biol. Chem.* 147: 399-407.

273. ROS, E. (2000) Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 151: 357-379.
274. ROSS, H. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis a perspective for the 1990s. *Nature*. 362: 801-809.
275. RUDICH, A., KOZLOVSKY, N., POTASHNIK, R., BASHAN, N. (1997) Oxidant stress reduces insulin responsiveness in 3T3-L1 adipocytes. *Am. J. Physiol.* 272 : E935-E940.
276. RUDICH, A., TIROSH, A., POTASHNIK, R. (1999) Lipoic acid protects against oxidative stress induced impairment in insulin stimulation of protein kinase B and glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia*. 42 : 949-957.
277. RUOTOLO, G., PARLAVECCHIA, M., TASKINEN, M. R., GALIMBERTI, G., ZOPPO, A. LE, N. A., RAGOGNA, F., MICOSSI, P., POZZA, G. (1994) Normalization of lipoprotein composition by intraperitoneal insulin in IDDM. Role of increased hepatic lipase activity. *Diabetes Care*. 17:6-12.
278. RUSTAN, A. C., DREVON, C. A. (1989) Eicosapentaenoic acid inhibits hepatic production of very low density lipoprotein. *J. Int. Med.* 225: 31-38.
279. SALHANICK, A. I., SCHWARTZ, S. I., AMATRUDA, J. M. (1991) Insulin inhibits apolipoprotein B secretion in isolated human hepatocytes. *Metabolism*. 40: 275-279.
280. SANCHEZ-MUNIZ, F.J., BASTIDA, S., VIEJO, J.M., TERPSTRA, A.H. (1999) Small supplements of n-3 fatty acids change serum low density lipoprotein composition by decreasing phospholipid and apolipoprotein B concentrations in young adult women. *Eur. J. Nutr.* 38: 20-27.
281. SANDERS, T. A. B., SULLIVAN, D. R., REEVE, J., SAMPSON, G. R. (1985) Triglyceride lowering effect of marine polyunsaturates in patient with hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis*. 5: 459-465.

282. SANDERS, T.A.B. (1984) Influence of fish oil supplement in man. *Proc. Nutr. Soc.* 44, 391-392.
283. SANDERS, T.A.B. (1986) Nutritional and physiological implications of fish oils. *J. Nutr. A.* 116: 1857-1859.
284. SANDERS, T.A.B., HINDS, A., PEREIRA, C. C. (1989) Influence of n-3 fatty acids on blood lipids in normal subjects. *J. Int. Med.* 225: 99-104.
285. SANDERS, T.A.B., HOCHLAND, M. C. (1983) A comparison of the influence on plasma lipids and platelet function of supplements of  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acids *Br. J. Nutr. A.* 50, 521-529. (a)
286. SANDERS, T.A.B., MISTRY, M. (1984) Controlled trials of fish oil supplements on plasma lipid concentrations. *Br. J. Clin. Pract.* 38 (31) : 73-78.
287. SANDERS, T.A.B., ROSHANAI, F. (1983) The influence of different types of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids on blood lipids and platelet function in healthy volunteers. *Clin. Sci.* 64: 91-96. (b)
288. SANTINI, S. A., MARRA, G., GIARDINA, B. (1997) Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes.* 46 : 1853-1858.
289. SARSILMAZ, M., SONGUR, A., OZYURT, H., KUS, I., OZEN, O. A., OZYURT, B. (2003) Potential role of dietary omega-3 essential fatty acids on some oxidant/antioxidant parameters in rats' corpus striatum. *Prostaglandines leukot. Essent. Fatty. Acids.* 69: 253-259.
290. SCHAEFFER, E. J., FOSTER, D. M., ZECH, L. A., LINDGREN, F. T., BREWER, H. B., LEVY, R. I. (1983) The effects of estrogen administration on plasma lipoprotein metabolism in premenopausal females. *J. Clin. Endocr. Metab.* 57: 262-267.



291. SCHONFELD, G., FELSKY, C., HOWALD, M. A. (1974) Characterization of the plasma lipoproteins of the genetically obese hyperlipoproteinemic Zucker fatty rat. *J. Lipid res.* 15: 457- 564.
292. SCHWARTZ, R. (1991) Neonatal hypoglycemia : basis in diagnosis and treatment. *Diabetes.* 40 :71-73.
293. SCHWARTZ, R., TERAMO, K. A. (2000) Effect of diabetic pregnancy of the foetus and newborn, *Seminars in perinatology.* 24: 120-135.
- 294. SCOTT, M., GRUNDY, S. M., DENKE, M. A. (1990) Dietary influences on serum lipids and lipoproteins, *J. Lip. Res.* 31: 1149-1172.
295. SHAFRIR, E., KHASIS, S. (1982) Maternal- foetal transport versus new fat synthesis in the pregnant diabetic rat. *Diabetologia.* 22: 111- 117.
296. SHAFRIR, E., BARASH, V. (1987) Placental function in maternal-foetal fat transport in diabetes. *Biol. Neonate.* 51, 102-112.
297. SHERHAN, C. N., ARITA, M., HONG, S., GOTLING, K. (2004) Resolvins, docosatrienes and neuroprotectins, novel omega-3 derived mediators and their endogenous aspirin-tiggered epimers. *Lipids.* 39: 1125-1132.
298. SHIMABUKURO, M., OHNEDA, M., LEE, Y., UNGER, R. H. (1997) Role of nitric oxide in obesity-induced cell disease. *J. Clin. Invest.* 100 : 290-295.
299. SIES, H. (1991) Oxidative stress : introduction. In : Oxidative stress, oxidants and antioxidants. H. Sies Ed. London : London Academic Press :15-22.
300. SILVERMAN, B. L, RIZZO, T. E., CHO, N. H., METZGER, B. E. (1998) Long-term effects of the intra-uterine environment. The Northwestern University Diabetes in Pregnancy Center. *Diabetes Care.* 21(2):142-149.

301. SIMMONS, R. A., TEMPLETON, L. J., GERTZ, S. J. (2001) Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes*. 50(10): 2279-2286.
302. SINGER, P., JAEGER, W., BERGER, I., BARLEBEN, H., WIRTH, M., RICHTER-HEINRICH, E., VOIGT, S., GODICKE, W. (1990) Effects of dietary oleic, linoleic and alpha-linolenic acids on blood pressure, serum lipids, lipoproteins and the formation of eicosanoid precursors in patients with mild essential hypertension. *J. Hum. Hypertens.* 4(3): 227-233.
303. SIRTORI, C. R., GALLI, C. (2002) N-3 fatty acids and diabetes. *Biomed. Pharmacothr.* 56: 397-406.
304. SLOVER, H. T., LANZA, E. (1979) Quantitative analysis of food fatty acids by capillary gas chromatography. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 56:933-943.
305. SMIT, M. J., TEMMERMAN, A. M., WOLTERS, H., KUIPERS, F., BEYNEN, A. C., VONK, R. J. (1991) Dietary fish oil-induced changes in intrahepatic cholesterol transport and bile acid synthesis in rats. *J. Clin. Invest.* 88: 943-951.
306. SOBNGWI, E., BOUDOU, P., MAUVAIS-JARVIS, F., LEBLANC, H., VELHO, G., VEXIAU, P., PORCHER, R., HADJADJ, S., PRATLEY, R., TATARANNI, P. A., CALVO, F., GAUTIER, J. F. (2003) Effect of a diabetic environment in utero on predisposition to type 2 diabetes. *Lancet*. 361(9372): 1861-1865.
307. SOULIMANE-MOKHTARI, N., GUERMOUCHE, B., YESSOUFOU, A., SAKER, M., MOUTAIROU, K., HICHAMI, A., MERZOUK, H. AND KHAN, N.A. (2005) Modulation of lipid metabolism by (N-3) PUFA in gestational diabetic rats and their macrosomic offspring. *Clin. Sci.* 109: 287-295.

308. SREENAN, S., STURIS, J., PUGH, W. (1996) Prevention of hyperglycemia in the Zucker diabetic fatty rat by treatment with metformin or troglitazone. *Am. J. Physiol.* 271 : E742-E747.
309. STEINBERG, D. (1991) Antioxidants and atherosclerosis. *Circulation.* 84(3): 1420-1425.
310. STEINER, G., HAYNES, F. J., YOSHINO, G., VRANIC, M. (1984) Hyperinsulinemia and in vivo very low density lipoprotein triglyceride kinetics. *J. Am. Phys. Soc.* 18: 187-192.
311. STEVENSON, D. K., HOPPER, A. D., COHEN, R. S., BUCALO, L. R., KRENER, J. A. (1982) Macrosomia: Causes and consequences. *J. Pediat.* 100: 515-520.
312. STORLIEN, L. H., JENKINS, A. B., CHRISHOLM, D. J., PASCOE, W. S., JHOURI, S., KRAEGEN, E. W. (1991) Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. *Diabetes.* 40:280-289.
313. STORLIEN, L. H., KRAEGEN, E. W., CHISHOLM, D. J., FORD, G. L., BRUCE, D. G., PASCOE, W. S. (1987) Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats. *Science.* 237:885-888.
314. STREICHER, R., KOTZKA, J., MULLER-WIELAND, D., SIEMEISTER, G., MUNCK, M., AVCI, H., KRONE, W. I. (1996) SREBP mediates activation of Low-density lipoprotein receptor promoter by insulin and insulin-like growth factor-I. *J. Biol. Chem.* 271: 7128-7133.
315. SUBBIAH, P. V., SUBRAMANIAN, V. S., LIU, M. (1998) Trans unsaturated fatty acids inhibit lecithin: cholesterol acyltransferase and alter its positional specificity. *J. Lipid. Res.* 39 (7):1438-1447.
316. SUCKLING, K. E., JACKSON, B. (1993) Animal models of human lipid metabolism. *Prog. Lipid. Res.* 32: 1-24.

317. SUCKLING, K. E., STANGE, E. F. (1985) Role of acyl CoA: cholesterol acyltransferase in cellular cholesterol metabolism. *J. Lipid. Res.* 26: 647-671.
318. SUNDARAM, R. K., BHASKAR, A., VIJAYALINGAM, S. (1996) Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin. Sci.* 90: 255-260.
319. SURESH, Y., DAS, U. N., FAMS, M. D. (2003) Long-chain polyunsaturated fatty acids and chemically induced diabetes mellitus: Effect of  $\omega$ -6 fatty acids. *Nutrition* 19: 93-114.
320. SUSA, J. B., SCHWARTZ, R. (1985) Effects of hyperinsulinemia in the primate fetus. *Diabetes.* 34: 36-41.
321. TANAKA, Y., GLEASON, C. E., TRAN, P.O.T. (1999) Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 10857-10862.
322. TASKINEN, M. R. (1990) Hyperlipidaemia in diabetes. *Clin. Endocrinol. Metab.* 4: 743-775.
323. TASKINEN, M. R. (1997) Triglyceride is the major atherogenic lipid in NIDDM. *Diabetes. Metab. Rev.* 13: 93-98.
- 324. TASKINEN, M. R., KAHRI, J., KOIVISTO, V., SEPHERD, J., PACKARD, C. J. (1992) Metabolism of HDL apolipoprotein A-I and A-II in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia.* 35: 347-356.
325. TASKINEN, M. R., NIKKILA, E. A. (1977) Lipoprotein lipase activity in adipose tissue and in postheparin plasma in human obesity. *Acta Med. Scand.* 202: 399-408.
326. TAVANGAR, K., MURATA, Y., PATEL, S., KALINYAK, J. E., PEDERSEN, M. E., GOERS, J. F., HOFFMAN, A., KRAEMER, F. B. (1992) Developmental regulation of lipoprotein lipase in rats. *Am. J. Physiol.* 262:330-337.

327. THOMPSON, G. R., NAOUMOVA, R. P., WATTS, G. F. (1996) Role of cholesterol in regulating apolipoprotein B secretion by the liver. *J. Lipid. Res.* 37: 439-447.
328. THORNALLEY, P. J., MC LELLAN, A. C., LO, T. W. (1996) Negative association between erythrocyte reduced glutathione concentration and diabetic complications. *Clin. Sci.* 91 : 575-582.
329. TIEDGE, M., LORTZ, S., MUNDAY, R., LENZEN, S. (1999) Protection against the co-operative toxicity of nitric oxide and oxygen free radicals by overexpression of antioxidant enzymes in bioengineered insulin- producing RINm5F cells. *Diabetologia.* 42 : 849-855.
330. TIROSH, A., POTASHNIK, R., BASHAN, N., RUDICH, A. (1999) Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3- L1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT4 translocation. *J. Biol. Chem.* 274 : 10595-10602.
331. TOMKIN, G. H., OWENS, D. (1994) Insulin and lipoprotein metabolism with special reference to the diabetic state. *Diabetes Metab. Rev.* 10: 225-252.
332. TSUKAMOTO, Y., OKUBO, M., YONEDA, T., MARUMO, F., NAKAMURA, H. (1982) Effects of a polyunsaturated fatty acid-rich diet on serum lipids in patients with chronic renal failure. *Nephron.* 31(3):236-241.
333. TYCKO, B., MORISON, I. M. (2002) Physiological functions of imprinted genes. *J Cell Physiol.* 192(3): 245-258.
334. VAAG, A. (1999) On the pathophysiology of late onset non-insulin dependent diabetes mellitus. Current controversies and new insights. *Dan. Med. Bull.* 46 : 197-234.
335. VELUSSI, M., CERNIGOI, A. M., DE MONTE, A. (1997) Long-term (12 months) treatment with an anti- oxidant drug (silymarin) is effective on hyperinsulinemia, exogenous

- insulin need and malondialdehyde levels in cirrhotic diabetic patients. *J. Hepatol.* 26 : 871-879.
336. VENKATRAMAN, J. T., CHANDRASEKAR, B., KIM, J. D., FRNANDES, G. (1994) Effects of n-3 and n-6 fatty acids on the activities and expression on hepatic antioxydant enzymes in autoimmune-prone NZBxNZWf1 mice. *Lipids.* 29: 561-568.
337. VERGES, B. (1999) Dyslipidemia in diabetes mellitus. Review of the main lipoprotein abnormalities and their consequences on the development of atherogenesis. *Diabetes Metab.* 25 (3): 32-40.
- 338. VERGES, B. (2001) Insulinosensibilité et lipides. *Diabetes Metab.* 27 :223-227.
339. VERGES, B., DUVILLARD, L., PONT, F., FLORENTIN, E., GAMBERT, P. (2000) Respective effects of insulin resistance and "relative" insulin deficiency on apo B and apo A1 metabolism in NIDDM. *Diabetologia.* 43 (1): 38.
340. VIJAYALINGAM, S., PARTHIBAN, A., SHANMUGASUNDARAM, K. R., MOHAN, V. (1996) Abnormal antioxidant status in impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 13 : 715-719.
341. VILEISIS, R. A., OH, W. (1983) Enhanced fatty acid synthesis in hyperinsulinemic rat fetuses. *J. Nutr.* 113, 246-252.
342. VOSS, A., REINHART, M., SANKARAPPA, S., SPRECHER, H. (1991) The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. *J. Biol. Chem.* 266 (30): 19995-20000.
343. WANDER, R. C., SHI-HUA, D. U. (2000) Oxidation of plasma proteins is not increased after supplementation with eicosapentaenoic acids. *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 731-737.
344. WASIKOWA, R., SUCHANSKA, D., BASIAK, A., NOCZYNSKA, A., STASINSKA, T. (2005) The child from families with type 1 diabetes. *Endokrynol. Diabetol. Chor. Przemiany Materii Wieku Rozw.* 11(4):245-248.

345. WEINSTEIN, I., SOLER-ARGILAGA, C., WERNER, H. V., HEIMBERG, M. (1979) Effects of ethynylloestradiol on metabolism of ( $^{14}$ C)-oleate by perfused livers and hepatocytes from female rats. *Biochem. J.* 180: 265-266.
346. WESLEY, A. (1998) Immunonutrition: The role of n-3 fatty acid. *Science (Washington D.C.)*. 14: 627-633.
347. WESTERVELD, H. T., DE GRAAF, J. C., VAN BREUGEL, H. H. (1993) Effect of low dose EPA on glycemic control, lipid profile, lipoproteine (a), platelet aggregation, viscosity and vessel wall interaction in NIDDM. *Diabetes Care*. 16 :683-688
348. WILL, J. C., BYERS, T. (1996) Does diabetes mellitus increase the requirement for vitamin C ? *Nutr. Rev.* 54 : 193-202.
349. WINOCOUR, P. H., KALUVYA, S., RAMAIKA, K., BROWN, L., MILLAR, J. P., FARRER, M., NEIL, H. A. W, LAKER, M. F. ALBERTI, K. M. (1992) Relation between insulinemia, body mass index, and lipoprotein composition in healthy, non diabetic men and women. *Arterioscl. Thromb.* 12: 393- 402.
350. WOLF, R., GRUNDY, S. M. (1983) Influence of weight reduction on plasma lipoproteins in obese patients. *Arteriosclerosis*. 3: 160-169.
351. WONG, S. H., MARSH, J. B. (1988) Differential effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on triacylglycerol and apolipoprotein B production in HEP G2 cells. *Atherosclerosis*. 8: 63.
352. WONG, S., REARDON, M., NESTEL, P. (1985) Reduced triglyceride formation from long-chain polyenoic fatty acids in rat hepatocytes. *Metabolism*. 34 :900-905
353. XU, B., MORITZ, J. T., EPSTEIN, P. N. (1999). Overexpression of catalase provides partial protection to transgenic mouse beta cells. *Free Radic. Biol. Med.* 27 : 830-837.

354. YAZU, K., YAMAMOTO, Y., NIKI, E., MIKI, K., UKEGAWA, K. (1998) Mechanisms of lower oxidizability of eicosapentaenoate than linoleate in aqueous micelles. II. Effect of antioxidants. *Lipids*. **33**: 597-600.
355. YESSOUFOU, A., SOULIMANE, N., MERZOUK, S. A., MOUTAIROU, K., AHISSOU, H., PROST, J., SIMONIN, A. M., MERZOUK, H., HICHAMI, A., KHAN, N. A. (2006) N-3 fatty acids modulate antioxidant status in diabetic rats and their macrosomic offspring. *International Journal of Obesity*. 1-12.
356. YILMAZ, O., OZKAN, Y., YILDIRIM, M., OZTURK, A. I., ERSAN, Y. (2002) Effects of alpha lipoic acid, ascorbic acid-6-palmitate, and fish oil on glutathione, malonaldehyde and fatty acid levels in erythrocytes of streptozotocin induced diabetic male rats. *J. Cell. Biochem*. **86**: 530- 539.
357. YKI-JARVINEN, H., TASKINEN, M. R. (1988) Interrelationships among insulin's antilipolytic and glucoregulatory effects and plasma triglycerides in nondiabetic and diabetic patients with endogenous hypertriglyceridemia. *Diabetes*. **37**: 1271-1278.
358. YOSHIDA, K., HIROKAWA, J., TAGAMI, S. (1995) Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus : regulation of glutathione synthesis and efflux *Diabetologia*. **38** : 201-210.
359. YOUNG, I. S., TORNEY, J. J., TRIMBLE, E. R. (1992) The effects of ascorbate supplementation on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. *Free. Rad. Biol. Med*. **8**: 752-758.
360. YUAN, Y. V., KITTS, D. D. (2002) Dietary fat source and cholesterol interactions alter plasma lipids and tissue susceptibility to oxidation in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive Wistar Kyoto (WKY) rats. *Mol. Cell. Biochem*. **232**: 33-47.



361. YU-POTH, S., YIN, D., KRIS-ETHERTON, P. M., ZHAO, G., ETHERTON, T. D. (2005) Long-chain polyunsaturated fatty acids upregulate LDL receptor protein expression in fibroblasts and HepG2 cells. *J. Nutr.* 135(11): 2541-2545.
362. ZAMAN, Z., FIELDEN, P., FROST, P. G. (1993) Simultaneous determination of vitamin A and E and carotenoids in plasma by reverse phase HPLC in elderly and younger subjects. *Clin.Chem.* 39: 2229-2234.
363. ZANETTI, M., ZWACKA, R. M., ENGELHARDT, J. F., KATUSIC, Z. S., BRIEN, T.O. (2001) Superoxide anions and endothelial cell proliferation in normoglycemia. *Arteriosclr. Thromb. Vasc. Biol.* 21: 195-200.

# ANNEXES

### Dosage ELISA de l'insuline :

1. Revêtement des puits : Dans les puits d'une plaque de microtitration (Immuno 96 F-Type i- NUNC, Kamstrup, Danemark) sont placés 100µl d'insuline à 1mg/ml, préparée dans un tampon carbonate 0,1 M pH 9,6. La plaque est incubée 1 nuit à 4 °C.
2. Les sérums contenant l'insuline à doser et l'antisérum (anti-insuline bovine de cobaye diluée dans le tampon de saturation (TS) 1/5000) sont mélangés (v/v = 1/1, 200µl/200µl) et incubés une nuit à 4°C.
3. A la fin de l'incubation, la plaque est retirée du réfrigérateur. Des lavages par le Tween 20 (0,1% dans le PBS) sont effectués de 3 à 5 min.
4. Les sites sont saturés par 200 µl de TS, et la plaque est incubée 1h à 37 °C.
5. Ensuite les puits sont lavés par le Tween 20, 2 fois de 3 à 5 min.
6. Dans les puits ; sont déposés :  
100 µl de TS dans la colonne 1 (= Blanc)  
100µl d'anticorps dilué 1/5000 dans la colonne 2 (= 0 insuline)  
100 µl du mélange antigène-anticorps en concentrations croissantes dans les colonnes 3 à 12 en utilisant le schéma suivant :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TS	α Ins	0.0001	0.0001	0.0005	0.0005	0.001	0.001	0.05	0.05	0.01	0.01
B	TS	α Ins	0.05	0.05	0.1	0.1	0.5	0.5	1	1	5	5
C	TS	α Ins	10	10	50	50	100	100	pl 1/10	pl 1/10	pl	pl
D												
E	TS	α Ins	0	0	10	10	20	20	30	30	40	40
F	TS	α Ins	50	50	60	60	70	70	80	80	90	90
G	TS	α Ins	100	100	200	200	300	300	400	400	500	500
H												

Les lignes A, B, C servent au dosage de l'insuline dans les culots et le plasma, les lignes E, F et G pour la gamme d'insuline.

La plaque est incubée 1h à 37 °C.

7. Les puits sont lavés 3 fois de 3 à 5 min.
8. la plaque est incubée 45 min à 37°C à l'abri de la lumière après l'addition de 100 µl du second anticorps (anti IgG de cobaye marqué à la peroxidase) dilué 1/2000 dans le TS, dans tous les puits, sauf lignes D et H.
9. Les puits sont lavés 3 fois de 3 à 5 min.
10. La révélation enzymatique se fait par l'addition de 100 µl d'orthophénylène-diamine (OPD) dans tous les puits, sauf lignes D et H (attendre 15 min à l'obscurité).
11. La réaction est arrêtée par l'addition de 50 µl d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 M/l.
12. La lecture de la plaque au spectrophotomètre à 492 nm, se fait après le transfert de 100 µl de chaque puit dans une microcuve auxquels sont ajoutés 900 µl d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,6 M/l. La colonne 1 est utilisée pour faire le 0 de lecture.

#### Tampon de saturation (TS)

Tween 20 0,1%

BSA 1% dans PBS

PBS= NaCl 0,15 M (8,77 g/l) dans tampon phosphate 0,01M pH 7,4

Tampon phosphate 0,1 M = PO<sub>4</sub>K<sub>2</sub>H 17,4 g/l (4 volumes) et PO<sub>4</sub>KH<sub>2</sub> 13,6 g/l (1 volume).

## RESUME

Le but de cette étude est de tester l'effet bénéfique des acides gras polyinsaturés de la famille n-3 (AGPI n-3) sur les dyslipidémies et les troubles du statut oxydant/antioxydant induits par le diabète et la macrosomie.

Des rates sont nourries par un régime témoin (Isio), et d'autres par le régime test enrichi en acides gras polyinsaturés n-3 (Epax), et sont étudiées pendant la gestation (à j12 et j21) et 1 mois après (j51). Au sevrage, les nouveau-nés de ces rates suivent le même régime que leurs mères et sont étudiés à j0, j30, j60 et j90 (âge adulte). Les nouveau-nés macrosomiques sont hyperglycémiques et hyperinsuliniques, et présentent une croissance accélérée.

Les sacrifices sont effectués sur les mères et sur les nouveau-nés aux différents temps cités, pour des prélèvements sanguins et d'organes (foie, tissu adipeux, tissu musculaire) afin de déterminer les modifications du métabolisme des lipoprotéines et du statut antioxydant.

Pour cela les paramètres lipidiques (cholestérol total, triglycérides et phospholipides), et protéiques (protéines totales, apoprotéines A1 et B100) sont dosés au niveau du sérum, et au niveau des lipoprotéines après leur séparation par ultracentrifugation.

Au niveau des organes les paramètres lipidiques et les protéines sont dosés.

Les activités enzymatiques sont également déterminées, sur le sérum (LCAT), le foie (HTGL, HMGC<sub>o</sub>A et la 7<sup>e</sup> hydroxylase), le tissu adipeux (LPL adipocytaire) et le muscle (LPL musculaire). La composition en acides gras du sérum et du foie est analysée par une chromatographie en phase gazeuse. Les paramètres du statut antioxydant étudiés sont l'ORAC, les vitamines A, C et E, les hydroperoxydes, les protéines carbonyles et les activités des enzymes antioxydantes (SOD, catalase, glutathion oxydase et réductase).

Les résultats obtenus montrent que le diabète (chez les mères) et la macrosomie (chez les nouveau-nés) induisent des dyslipidémies caractérisées par l'élévation des paramètres lipidiques au niveau du sérum (cholestérol total, triglycérides et phospholipides), et des lipoprotéines (C-VLDL, C-LDL, TG-VLDL, TG-LDL et TG-HDL) avec une baisse du C-HDL. Les mères diabétiques et leurs nouveau-nés montrent aussi une élévation des lipides hépatiques et de l'activité HTGL. Le tissu adipeux, dont le poids relatif augmente chez les nouveau-nés macrosomiques, montre une élévation des lipides, et de la LPL. Au contraire, la LPL et les lipides adipocytaires sont diminués chez les mères diabétiques.

Les activités de la HMGC<sub>o</sub>A, de la 7<sup>e</sup> hydroxylase et de l'ACAT augmentent chez les mères diabétiques et leur progéniture. La composition en acides gras du sérum et du foie, chez les mères diabétiques et leur progéniture, montre une augmentation des acides gras saturés, de l'acide arachidonique et une diminution de l'EPA et du DHA.

Le diabète et la macrosomie modifient le statut antioxydant en diminuant l'ORAC, la vitamine A, et les activités des enzymes antioxydantes, et en augmentant les hydroperoxydes et les protéines carbonylées.

Les résultats concernant les effets bénéfiques des (AGPI n-3) indiquent clairement que l'Epax corrige les dyslipidémies chez les diabétiques et les macrosomiques en modulant les activités enzymatiques intervenant dans le métabolisme des lipides avec diminution du C-VLDL, C-LDL, des TG au niveau des lipoprotéines et donc diminution du cholestérol et des triglycérides au niveau du sérum. Il en est de même pour le foie et le tissu adipeux. La composition en acides gras au niveau du foie et du sérum est également corrigée.

Le statut antioxydant montre une amélioration caractérisée par une augmentation des activités des enzymes antioxydantes et de l'ORAC, et une diminution des taux des hydroperoxydes et des protéines carbonylées.

En conclusion, les AGPI n-3 améliorent les troubles lipidiques et ceux du statut antioxydant, dus au diabète et à la macrosomie, et améliorent le pronostic de la macrosomie à long terme, ce qui peut limiter le développement des maladies chroniques à l'âge adulte.

**Mots clés :** Diabète, gestation, macrosomie, lipides, statut oxydant/antioxydant, AGPI n-3.