

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche scientifique

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID
TLEMCCEN

Faculté des Sciences
Département de Biologie

Thèse en vue de l'obtention
du diplôme de doctorat
en

Biologie Moléculaire Et Cellulaire

Inscrit sous le	B./M.57
Date le	2007 05 12
Cote	

THEME

Etude Du Profil Lipidique, Protéique Et Lipoprotéique
Ainsi Que L'Effet Des Acides Gras Polyinsaturés Sur La
Lymphoprolifération Et La Production D'Interleukine 2
Chez Les Diabétiques De Type I Et II
* Cas D'Une Population Jordanienne

Présentée par M^{elle} Alnajjar Asma Radwan Mohammad

Devant le Jury Composé de

Présidente
Examineurs

Dr. MERZOUK H., Professeur, Université de Tlemcen
Dr. SAIDI Dj., Professeur, Université d'Oran.
Dr. AOUES A., Professeur, Université d'Oran.
Dr. SAHRAOUI T., Maître de conférence, Université d'Oran
Dr. DJAZIRI R., Maître de conférence, Université de Tlemcen
Dr. CHABANE SARI D., Professeur, Université de Tlemcen

Promoteur

Année Universitaire 2005 / 2006

Dédicaces

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie

A mes chers parents avec tous mes respects et ma tendresse et avec tout l'amour que je leur porte, en signe d'affection, de gratitude et de reconnaissance pour tous leurs encouragements et leurs sacrifices tout au long de mes études.

A mes frères, mes soeurs, spécialement Fatma.

A toute ma famille.

A mes amies.

A tous ceux que j'estime.

Enfin, a tous ceux qui oeuvrent pour la science.

REMERCIEMENTS

J'adresse mes sincères remerciements et mon profond respect à mon encadreur, Mr. Chabane Sari Daoudi, Professeur au Département de Biologie à l'Université de Tlemcen, qui m'encadrée, conseillée et soutenue tout le long de ce travail et qui a généreusement trouvé le temps et la patience de lire ce manuscrit et d'y apporter les corrections nécessaires. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde et respectueuse gratitude.

Je remercie vivement M^{me} Merzouk Hafida, Professeur au Département de Biologie à l'Université de Tlemcen, de l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider mon jury ainsi de son aide et ses précieux conseils pour déclancher ce travail. Qu'elle soit assuré de mes sincères respects et reconnaissances .

Je tiens à remercier également Mr. Saidi Djamel, Professeur à l'Université d'Oran, d'avoir accepté généreusement d'examiner ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à Mr. Aoues Abdelkader Professeur à l'Université d'Oran , de m'avoir fait l'honneur de participer a mon jury.

Je remercie également Mr. Sahraoui Toufik, Maître de conférence à l'Université d'Oran, d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

Je remercie sincèrement Mr. Djaziri Rabeh , Maître de conférence au Département de Biologie à l'Université de Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce travail. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

J'adresse aussi mes vifs et respectueuses remerciements à tous mes docteurs en Jordanie où est réalisé ce travail ainsi à tous les personnes qui ont participé en ma formation et m'ont aidée pendant la réalisation de ce modeste travail.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the effects of diabetes mellitus on lipides, carbohydrates and proteins metabolim in Jordan people with insulin-dependant (IDDDM) and non insulin-dependant diabetics (NIDDM) and control subjects.

Our results showed a significatif increase in serum concentrations of glucose and HbA_{1c} in both type of diabetes. Also, insulin concentration showed a significatif increase in NIDDM subjects but it decreased significantly in IDDM subjects.

Moreover, serum levels of insulin, cholesterol (CT) and triglycerides (TG) were increased in NIDDM patients while there are a significatif decrease in serum proteins in IDDM patients.

The alterations of lipoprotéins composition in diabetes were characterised by a raise in TG-PT-mass of VLDL, CT-TG of LDL, TG of HDL₂ and HDL₃, with a reduction in CT-PL-PT- mass of HDL₂ and PT of HDL₃ in NIDDM subjects.

Concerning IDDM subjects, there are an increase in CT-PL-mass of LDL, TG of HDL₃ while a decrease in PT of LDL, PL-PT-mass of HDL₂ and PT of HDL₃ as compared with control subjects.

On other hand, in order to appreciate our knowledges about cellular alterations associated with diabetes and to determine the effects of polyunsaturated fatty acids (DHA, EPA, AA) on lymphocyte proliferation, interbenkin-2 production and phospholipids, triglycerides and esteryl cholesterol fatty acids composition in lymphocyte membrane. For this, the lymphocytes were incubated, in vitro, with and without mitogen (Con A), insulin, PUFA n-3 (DHA and EPA) and/or PUFA n-6 (AA).

Our results found that the concanavalin A and insulin increase significantly the proliferative response of lymphocytes while PUFA as eicosapentaenoic, arachidonic and docosahexaenoic acids inhibited that by different degrees: 47%, 37% and 19% respectively for healthy subjects and 39%, 29% and 13% for NIDDM and 26%, 18% and 9% for IDDM. However, the concentration of IL-2 produced in presence of either docosahexaenoic, eicosapentaenoic or arachidonic acid was significantly reduced by 36%, 32% and 39% respectively in controls while 16%, 15% and 23% respectively in NIDDM subjects and 21%, 18% and 26% for IDDM patients.

Moreover, the used fatty acids demonstrated a major impact on the fatty acid composition of different fractions of lymphocyte T membrane but these fractions were different in their response to each fatty acid examined. Also, we observed that con A increase significantly the rate of PUFA in all fractions stimulated in diabetics and control membrane compared as basal culture. However, the addition of a fatty acid to culture media was accompanied with a predominant composition of this fatty acid in different fractions. Also, our results showed that the addition of EPA to culture media decrease the rate of AA in cellular membrane for showing the competition between the two groups of n-3 et n-6.

In addition, the analysis of phospholipids fatty acids composition of red cell membrane showed no significant differences in the sum of saturated fatty acids between diabetics and control groups.

In contrast, the oleic acid was significantly increased in NIDDM patients as compared with controls. Also, we noted that EPA and DHA were significantly decreased in diabetic groups whereas AA was decreased in NIDDM group as compared with control subjects.

Finally, our results presented the effects of diabetes mellitus (type 1 and type 2) on different organism levels and the possibilities of their treatments by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids.

Key words: Diabetes Mellitus- IDDM- NIDDM- Lipoproteins- Lymphocyte T-PUFA- Lymphoproliferation- IL-2- Membrane fatty acids composition- Red Cells- Jordan.

RESUME

Le but de ce travail reste d'étudier les effets du diabète sucré sur le métabolisme des lipides, glucides et protéines chez une population jordanienne de diabétiques insulino-dépendants (DID), non insulino-dépendants (DNID) aussi témoins.

Notre résultats ont montré une augmentation significative des teneurs sériques en glucose et HbA_{1c} chez les diabétiques de type 1 et type 2. De plus, les concentrations sériques en insuline, cholestérol (CT), triglycérides (TG) sont augmentés chez les DNID tandis que les protéines sériques totales (PT) et l'insuline montrent une diminution significative chez les DID.

Les altérations de la composition des lipoprotéines chez les diabétiques sont caractérisés par une augmentation des TG- PT- masse des VLDL, CT- TG des LDL, TG des HDL₂ et HDL₃, avec une diminution des CT- PL- PT -masse des HDL₂ et PT des HDL₃ chez les DNID. Concernant les DID, il y a une augmentation en CT- PL- masse des LDL, TG- HDL₃ et une diminution en PT des LDL, PL- PT- masse-HDL₂ et PT des HDL₃ en comparant aux témoins.

D'autre part, pour approfondir nos connaissances sur les altérations cellulaires associés au diabète et de déterminer les effet des acides gras polyinsaturés (DHA, EPA, AA) sur la lymphoprolifération, la sécrétion d'IL2 et la composition en acides gras des phospholipides, triglycérides et esters de cholestérol membranaires des lymphocytes T; les lymphocytes sont incubés in vitro avec et sans mitogène (con A), insuline et AGPI n-3 (DHA et EPA) et/ou AGPI n-6 (AA).

Les résultats obtenus montre que con A et l'insuline augmentent significativement la prolifération des lymphocytes T tandis que les acides gras polyinsaturés tel EPA, AA, DHA ; inhibent la réponse proliférative à des degrés différents : 47%, 37% et 19%, chez les témoins, 39%, 29% et 13% pour les DNID et 26%, 18% et 9% chez les DID. Cependant, la concentration d'IL-2 produite en présence des DHA, EPA or AA est significativement réduite par 36%, 32% et 39% chez les témoins tandis que 16%, 15% et 23%, respectivement chez les diabétiques de type 2 et 21%, 18% et 26% chez les diabétiques de type 1.

De plus, les acides gras utilisé montre un impact majeur sur la composition des différents fractions lipidiques de la membrane des lymphocytes T. mais ces fractions donnent un comportement différente pour chaque acides gras testé. Aussi, on observe que la Con A augmente le taux des AGPI au niveau des différentes fractions membranaires des lymphocytes stimulés chez les diabétiques et les témoins par rapport aux cultures initiales. De plus, l'addition d'un acide gras au milieu de culture enrichit les différentes factions lipidiques de PL, TG et EC à cet acide. On note aussi que l'addition d'EPA au milieu de culture diminue la proportion d'acide arachidonique dans la membrane plasmique montrant une compétition entre les deux séries de n-3 et n-6.

En plus, l'analyse de la composition en acides gras des phospholipides membranaires d'érythrocytes ne montre aucune différence significative en somme des acides gras saturés chez tous les groupes. Par contre, une augmentation significative d'acide oléique a été noté chez les DNID comparé aux témoins. Ainsi, une diminution significative des EPA et DHA a été observés chez les diabétiques comparé aux témoins avec une diminution d'AA chez les DNID.

Enfin, nos résultats mettent en évidence les effets du diabète de type 1 et type 2 à différentes niveau de l'organisme et les possibilités de les traité par l'ensemble des acides gras polyinsaturés de série n-3 et n-6.

Mots clés: Diabète sucré – DID- DNID- Lipoprotéines- Lymphocyte T- AGPI- Lymphoprolifération- IL-2 – composition en acides gras membranaires – Erythrocyte- Jordanie.

SOMMAIRE

Introduction générale	14
Chapitre I	
Etude du profil lipidiques, glucidiques, protéiques et des lipoprotéines chez les témoins et les diabétiques	19
Introduction	20
Matériel et méthodes	25
I- POPULATION ETUDIEE	26
II- PRELEVEMENTS ET TRAITEMENT DES ECHANTILLONS	28
III- ANALYSES BIOCHIMIQUES	28
1- Dosage des paramètres glucidiques sériques	28
1.1- <i>Dosage du glucose</i>	28
1.2- <i>Dosage du hémoglobine glycosylé</i>	29
2- Dosage des paramètres en protéines sériques	29
2.1- <i>Dosage de l'insuline</i>	29
2.2- <i>Dosage des protéines totales</i>	30
3- Dosage des paramètres lipidiques sériques	31
3.1- <i>Dosage de cholestérol total</i>	31
3.2- <i>Dosage de triglycérides</i>	31
3.3- <i>Dosage des phospholipides</i>	31
IV- Séparation des lipoprotéines sériques par précipitation	31
1-Détermination des teneurs en lipides de VLDL, LDL et HDL _{2,3}	33
2-Détermination des apoprotéines totales des VLDL, LDL et HDL _{2,3}	33
V- ANALYSE STATISTIQUE	34
Résultats et interprétation	35
I- Analyse des paramètres biochimiques chez la population étudiée	36
1- Dosage de glycémie et hémoglobine glycosylé	36
2- Dosage des protéines sériques	36
3- Dosage des lipides sériques	39
II- Détermination des teneurs en lipides et en protéines des différentes fractions de lipoprotéines sériques chez les témoins et les diabétiques	42
1- Concentrations et composition des VLDL sériques	42
2- Concentrations et composition des LDL sériques	44
3- Concentrations et composition des HDL ₂ sériques	44
4- Concentrations et composition des HDL ₃ sériques	47
Discussion	49
Chapitre II	
Effets des acides gras polyinsaturés N-3 et N-6 sur la lymphoprolifération, la sécrétion d'IL-2 et la composition en acides gras des membranes des lymphocytes T	65
Introduction	66

Matériel et méthodes	71
I- Prélèvement sanguins	72
II- Isolation et viabilité des lymphocytes	72
III- Culture in vitro des lymphocytes	73
IV- Détermination de la prolifération lymphocytaire par la méthode de MTT	73
V- Détermination des paramètres nécessaires à la prolifération lymphocytaire	74
1-Evaluation de la concentration du Concanavaline A	74
2-Évaluation de la concentration d'insuline	74
3-Evaluation de la concentration de DHA	75
VI- Détermination l'influence de différents acides gras polyinsaturés sur la prolifération du lymphocyte T	75
1- Dosage d'interleukine 2 (IL-2) dans le milieu du culture	76
2-Composition en acides gras des phospholipides, triglycérides et esters de cholestérol membranaires	78
VI- ANALYSE STATISTIQUE	79
Résultats et interprétation	80
I- Détermination de quelques paramètres de culture des lymphocytes	81
1- Optimisation de la concentration en con A	81
2- Optimisation de la concentration en insuline	81
3- Optimisation de la concentration en acide docosahexaénoïque	83
II-Détermination de l'indice de prolifération lymphocytaire par la méthode colorimétrique MTT	85
1- Evaluation de la prolifération basale des lymphocytes T	85
2- Effet de la con A sur la lymphoprolifération	85
3- Effet d'insuline sur l'indice de prolifération	88
4- Effet du AGPI n-3 sur la prolifération lymphocytaire	88
5- Effet du AGPI n-6 sur la prolifération lymphocytaire	92
6-Effet du AGPI n-3 combiné et du AGPI n-3 et n-6 combiné sur l'indice de prolifération	92
7- Effet d'insuline sur le PI des AGPI combiné	95
III-Détermination de la concentration en IL-2 synthétisée par les lymphocytes T à différentes incubations	97
1-Evaluation de la concentration en IL-2 produite par la culture initiale	97
2-Effet du Con A sur la production d'IL-2	100
3-Effet d'insuline sur la production d'IL-2	100
4-Effet du DHA sur la production d'IL-2	103
5-Effet du EPA sur la production d'IL-2	103
6-Effet d'AA sur la production d'IL 2	106
7-Effet du AGPI n-3 et/ou AGPI n-6 combiné sur la sécrétion d'IL 2	106
8-Effet d'insuline avec les AGPI sur la production d'IL 2	
IV-Détermination de la composition en acides gras des membranes des lymphocytes	109
1-Au niveau du phospholipides (PL) membranaire	109
1.1- Effet du Con A	109
1.2- Effett du DHA	109

1.3 Effet du EPA	112
1.4 Effet d'AA	112
2-Au niveau du triglycérides (TG) membranaire	115
1.1- Effet du Con A	115
1.2- Effett du DHA	115
1.3- Effet du EPA	118
1.4- Effet d'AA	118
3- Au niveau des esters de cholestérol (EC) membranaire	121
3.1- Effet du Con A	121
3.2- Effet de DHA	121
3.3- Effet du EPA	124
3.4- Effet du AA	126
Discussion	128
Chapitre III	
Détermination de la composition en acides gras des phospholipides au niveau des membranes érythrocytaires chez les diabétiques de type 1 et type 2	157
Introduction	158
Matériel et méthodes	162
I- Prélèvements et traitements des échantillons	163
II- Détermination des la composition en acides gras des phospholipides des membranes	163
III- Analyse statistique	164
Résultats et interprétation	165
I- Composition en acides gras des phospholipides des membranes des globules rouges	166
1-Teneurs en acides gras saturé	166
2-Teneurs en acides gras monounsaturés	166
3-Teneurs en acides gras polyinsaturés n-6	169
4-Teneurs en acides gras polyinsaturés n-3	169
Discussion	172
conclusion générale	177
références bibliographiques	183
ARTICLE	214

Liste des Abréviation

AA	acide arachidonique
AGPI	acides gras polyinsaturés
Apo	apolipoprotéine
CETP	Cholesterol ester transfer protein
CL	cholestérol
Con A	concanavaline A
DHA	acide docosahexaénoïque
DID	Diabète insulino-dépendant
DNID	Diabète non insulino-dépendant
EC	ester de cholestérol
EPA	acide eicosapentaénoïque
HDL	high density lipoprotéine
IL-2	interleukin – 2
IMC	indice de masse corporelle
LCAT	Lecithin cholesterol acyl transférase
LDL	low density lipoprotéine
PI	indice de prolifération
PL	phospholipide
PLTP	Phospholipids transfer protein
PT	protéine total
TG	triglycéride
VLDL	very low density lipoprotéine

Liste des Tableaux

Tableau I.1 : les caractéristiques générales de notre population étudiée

Tableau II.1: Effet de la con A sur la lymphoprolifération

Tableau II.2: Effet d'insuline sur la lymphoprolifération

Tableau II.3: Effet du AGPI n-3 sur la lymphoprolifération

Tableau II.4: Effet du AGPI n-6 sur la lymphoprolifération

Tableau II.5: Effet du AGPI n-3 combiné et AGPI n-3 et n-6 combinés sur la prolifération des lymphocytes T

Tableau II.6: Effet d'insuline avec AGPI n-3 combiné ou AGPI n-3 et n-6 combinés sur la prolifération des lymphocytes T

Tableau II.7: Effet de la con A sur la production d'IL-2

Tableau II.8: Effet d'insuline sur la production d'IL-2

Tableau II.9: Effet du DHA sur la production d'IL-2

Tableau II.10: Effet d' EPA sur la production d'IL-2

Tableau II.11: Effet d' AA sur la production d'IL-2

Tableau II.12: Effet du AGPI n-3 combiné et AGPI n-3 et n-6 combinés sur la production d'IL-2

Tableau II.13: Effet d'insuline avec AGPI n-3 combiné ou AGPI n-3 et n-6 combinés sur la production d'IL-2

Liste des Figures

- Figure I.1:** Concentrations moyennes de la glycémie chez les Témoins, DID et DNID. Les valeurs sont exprimés en g/l
- Figure I.2:** Pourcentages moyennes d'hémoglobine glycosylé chez les Témoins, DID et DNID. Les valeurs sont exprimés en %
- Figure I.3:** Concentrations moyennes de l'insulinémie chez les Témoins, DID et DNID. Les valeurs sont exprimées en μ UI/ml
- Figure I.4:** Concentrations moyennes des protéines totales chez les Témoins, DID et DNID. Les valeurs sont exprimées en g/l
- Figure I.5:** Concentrations moyennes du cholestérol total chez les Témoins, DID et DNID. Les valeurs sont exprimées en g/l
- Figure I.6:** Concentrations moyennes du triglycéride chez les Témoins, DID et DNID. Les valeurs sont exprimées en g/l
- Figure I.7:** Concentrations moyennes du phospholipide chez les Témoins, DID et DNID. Les valeurs sont exprimées en g/l
- Figure I.8:** Concentrations moyennes en lipides (CT, PL,TG) et apoprotéines (PT) des VLDL chez les Témoins, DID et DNID. Les valeurs sont exprimées en g/l
- Figure I.9:** Concentrations moyennes en lipides (CT, PL,TG) et apoprotéines (PT) des LDL chez les Témoins, DID et DNID. Les valeurs sont exprimées en g/l
- Figure I.10:** Concentrations moyennes en lipides (CT, PL,TG) et apoprotéines (PT) des HDL₂ chez les Témoins, DID et DNID. Les valeurs sont exprimées en g/l
- Figure I.11:** Concentrations moyennes en lipides (CT,PL,TG) et apoprotéines (PT) des HDL₃ chez les Témoins, DID et DNID. Les valeurs sont exprimées en g/l
- Figure II.1:** Effet de la concentration en con A sur l'indice de la prolifération (PI) des lymphocytes
- Figure II.2:** Effet de la concentration en insuline sur l'indice de la prolifération (PI) des lymphocytes T
- Figure II.3:** Effet de la concentration en acide docosahexaénoïque sur l'indice de la prolifération (PI) des lymphocytes T
- Figure II.4:** Valeurs moyennes de l'indice de la prolifération (PI) des lymphocytes T dans la culture initiale chez les témoins, DID et DNID
- Figure II.5:** Effet de la con A sur les valeurs moyennes de l'indice de prolifération (PI) des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID
- Figure II.6:** Effet de l'insuline sur l'indice de prolifération (PI) des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID
- Figure II.7:** Effet du DHA et EPA sur l'indice de prolifération (PI) des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID
- Figure II.8:** Effet du AA sur l'indice de prolifération (PI) des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID
- Figure II.9:** Effet du AGPI n-3 combiné et AGPI n-3 et n-6 combinés sur l'indice de prolifération (PI) des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID
- Figure II.10:** Effet d'insuline avec AGPI n-3 combiné ou AGPI n-3 et n-6 combinés sur l'indice de prolifération (PI) des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID
- Figure II.11:** Concentrations moyennes d'IL-2 produite par les lymphocytes T dans la culture initiale chez les témoins, DID et DNID

Figure II.12: Effet de la con A sur l'IL-2 produite par les lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Figure II.13: Effet de l'insuline sur l'IL-2 produite par les lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Figure II.14: Effet du DHA sur l'IL-2 produite par les lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Figure II.15: Effet du EPA sur l'IL-2 produite par les lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Figure II.16: Effet d' AA sur l'IL-2 produite par les lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Figure II.17: Effet du AGPI n-3 combiné et AGPI n-3 et n-6 combinés sur l'IL-2 produite par les lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Figure II.18: Effet d'insuline avec AGPI n-3 combiné ou AGPI n-3 et n-6 combinés sur l'IL-2 produite par les lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Figure II.19: Effet du con A sur les concentrations en acides gras des phospholipides membranaires des lymphocytes T chez les témoins (T), DID(d) et DNID (ND).

Figure II.20 : Effet du con A sur les concentrations en acides gras des phospholipides membranaires des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID.

Figure II.21: Effet du DHA sur les concentrations en acides gras des phospholipides membranaires des lymphocytes T chez les témoins (T), DID(d) et DNID (ND).

Figure II.22 : Effet du DHA sur les concentrations en acides gras des phospholipides membranaires des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Figure II.23: Effet du EPA sur les concentrations en acides gras des phospholipides membranaires des lymphocytes T chez les témoins (T), DID(d) et DNID (ND).

Figure II.24: Effet du EPA sur les concentrations en acides gras des phospholipides membranaires des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Figure II.25: Effet du AA sur les concentrations en acides gras des phospholipides membranaires des lymphocytes T chez les témoins (T), DID(d) et DNID (ND).

Figure II.26 : Effet du AA sur les concentrations en acides gras des phospholipides membranaires des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Figure II.27: Effet du con A sur les concentrations en acides gras des triglycerides membranaires des lymphocytes T chez les témoins (T), DID (d) et DNID (ND).

Figure II. 28: Effet du con A sur les concentrations en acides gras des triglycerides membranaires des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID.

Figure II.29: Effet du DHA sur les concentrations en acides gras des triglycerides membranaires des lymphocytes T chez les témoins (T), DID (d) et DNID (ND).

Figure II.30: Effet du DHA sur les concentrations en acides gras des triglycerides membranaires des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID.

Figure II.31: Effet du EPA sur les concentrations en acides gras des triglycerides membranaires des lymphocytes T chez les témoins (T), DID (d) et DNID (ND).

Figure II.32: Effet du EPA sur les concentrations en acides gras des triglycerides membranaires des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID.

Figure II.33: Effet du AA sur les concentrations en acides gras des triglycerides membranaires des lymphocytes T chez les témoins (T), DID (d) et DNID (ND).

Figure II.34: Effet du AA sur les concentrations en acides gras des triglycerides membranaires des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID.

INTRODUCTION GENERALE

L'incidence des maladies telles les maladies cardiovasculaires, le diabète, le cancer et les maladies génétiques et respiratoires, est significativement élevée dans la région de l'est méditerranéen qui représente actuellement 47 % de l'ensemble des maladies.(94)

Ce pourcentage tend à augmenter pour atteindre 60 % en l'année 2020 où les majeurs facteurs de risque potentiel sont le régime alimentaire et l'inactivation physique sachant que le changement du mode de vie et la civilisation rapide conduit à une faible activité physique ce qui contribue à augmenter la prévalence régionale d'obésité et du diabète sucré (94).

La prévalence du diabète dans la région méditerranéenne a doublée depuis 1980 (15). Sa prévalence se situe entre 4 et 14 % (3). Environ, un douzième des personnes dans cette région développent une diabète de type 2 (94). Par ailleurs, le diabète est une maladie mondiale qui touche aussi bien les pays développés et ceux en voie de développement (3).

En Jordanie, la prévalence du diabète était de 11 % en 1995 (95). Il a été observé que le taux de diabète dans ce pays augmente et s'accroît avec l'âge des individus. Le diabète touche environ 1 % des personnes âgées de 25 à 29 ans, 15 % de celles entre 40 et 50 ans et 24 % après l'âge de 50 ans (3).

La prévalence du diabète de type 1 est de 3,6 % pour les gens âgés entre 0 et 14 ans tandis que celle des type 2 est 13,1 % pour les gens plus de 25 ans (15).

Il est intéressant de noter que le diabète sucré est à un fort prédicateur du dyslipidémie qui est un facteur important contribuant aux

maladies cardio-vasculaires et accélère l'artérosclérose chez les DNID (11).

Par ailleurs, la dyslipidémie est une problème importante de santé publique en Jordanie en comparant au pays européen et USA, sachant que la prévalence du hypercholestérolémie est 23 % et celle de l'hypertriglyceridémie est 23.8 % (11). Ainsi, l'obésité conduise aux changements métaboliques très importants et augmente le risque du maladie cardio-vasculaire et le diabète de type 2, sachant que la prévalence d'obésité en Jordanie est 46 % chez les hommes et 43,7 % chez les femmes (94).

Cependant le diabète entraîne aussi des perturbations du métabolisme de lipides et des lipoprotéines, d'un autre côté, le diabète s'accompagne d'un dysfonctionnement du système immunitaire (84).

Une meilleurs compréhension des anomalies lipidiques et de dysfonctionnement du système immunitaire, associe au diabète est nécessaire à une approche thérapeutique, appropriée et efficace.

Par ailleurs, la nutrition joue un rôle important dans le développant le diabète sucré. (84). Il existe un grand intérêt sur le métabolisme des acides gras à cause l'appréciation du rôle potentiel de ces derniers dans la pathogenèse du diabète ainsi, il a rapporté qu'il existe une interaction entre les lipides et la fonction immunitaire. (124).

Cependant, il existe plusieurs voies qui permettent à la nutrition d'affecter la réponse des cytokines et leurs production (par exemple), la synthèse des enzymes pro inflammatoires par les monocytes est supressé

par la supplémentation d'huile de poisson chez les individus normale. De plus, il est supposé que la supplémentation avec un régime riche en acides gras n-6 et pauvre en acides gras n-3 est un facteur de risque majeur pour le diabète et l'artériosclérose. (138a).

En outre, la composition en acides gras des membranes cellulaires est un facteur important qui influence la réponse cellulaire aux hormones (40). sachant qu'un taux élevé en AGPI n-3 peut être bénéfique tandis que un taux élevé des lipides trans ou saturé peut affecter inversement le métabolisme du glucose et la résistance à l'insuline. (84).

En Jordanie, il n'y a pas des travaux sur les effets du AGPI n-3 et n-6 sur le système immunitaire. Pour cela, ce travail a été réalisé.

Notre travail consiste à déterminer les différents désordre touchant le métabolisme humain en présence et en absence du diabète sucré.

Les différentes étapes de notre travail ont été les suivantes :

1. déterminer les paramètres biochimiques (la glycémie, HbA₁C , insuline, protéines, cholestérol, triglycérides et phospholipides) au niveau sérique chez les diabétiques de type 1 et type 2 ainsi les témoins.
2. Déterminer les modifications biochimiques affectant les différentes fractions des lipoprotéines (VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃) en analysant leur contenu (composition) en cholestérol, triglycérides, phospholipide et apolipoprotéines totale chez les DID, DNID et témoins.
3. Déterminer les changements structurelles et fonctionnelles apportés au système immunitaire représentée par les

lymphocytes T chez les sujets sains et diabétiques en analysant d'abord l'effet du diabète de type 1 et type 2 sur la culture initiale des lymphocytes comparés aux témoins, ensuite on détermine l'effet du Con A comme un mitogène sur l'indice de prolifération des différents groupes. De plus, l'effet d'insuline, du AGPI n-3 représentée par DHA et EPA , du AGPI n-6 représentée par l'AA sont évalués sur l'indice de prolifération des lymphocytes T chez tous les groupes. En outre, les effets du AGPI n-3 et /ou AGPI n-6 sur la réponse prolifératives sont déterminée d'une façon individuelle ou combiné.

4. Déterminer la concentration d'IL-2 produites par les lymphocytes T chez tout le groupes diabétiques et témoins dans les différentes incubations réalisées.
5. Tester l'influence d'addition des différents acides gras polyinsaturés DHA, EPA et AA sur la membrane plasmique du lymphocyte en présence d'un mitogène (Con A) chez tous les groupes diabétiques et témoins en analysant les compositions en acides gras des phospholipides, des triglycérides et esters de cholestérol du membrane lymphocytaire.
6. Enfin, déterminer la composition en acides gras des phospholipides membranaires des érythrocytes chez les témoins et les diabétiques de type 1 et type 2.

CHAPITRE I

Etude du profil lipidique, glucidique, protéique et lipoprotéique chez les témoins et les diabétiques

INTRODUCTION

Le diabète sucré est une pathologie endocrinienne et métabolique qui se caractérise par une hyperglycémie, résultant d'un déficit de la sécrétion de l'insuline, par les cellules du pancréas ou une insensibilité des tissus vis à vis de cette hormone.(4)

Le diabète se manifeste sous deux formes; insulino-dépendant (type 1, DID) et non insulino-dépendant (type 2, DIND) (114). L'étiologie du diabète de type 1 est d'origine multifactoriel regroupant des interactions complexes entre la prédisposition génétique, (15,157,114) des déterminants immunologiques et des agents environnementaux, ce qui conduit à une destruction des cellules B du pancréas par l'intermédiaire des lymphocytes (T) autoréactive stimulant ainsi les réactions autoimmunes. (15)

Les individus qui sont touché par ce type d'impact sont absolument dépendant de l'insuline exogène pour survivre (114). Tandis que le diabète de type 2, est caractérisé par une hyperglycémie à la suite d'un dysfonctionnement de la sécrétion d'insuline et/ou de l'action de l'insuline (172) est parfois associé à une élévation des teneurs en triglycéride et en acides gras non estérifié (126). Le diabète non insulino-dépendant est une maladie polygénique qui est associé à la fois à des facteurs génétiques et environnementaux (23) (102). En outre des facteurs génétiques et les stimulants environnementaux, il y a la malnutrition au cours du développement fœtale qui peut fournir une

programmation métabolique pour un retard diabète de type 2 entraînant une réduction du système de l'immunité inné en générale (138a).

L'organisation mondiale de la santé révèle que le nombre des diabétiques pourrait être de 143 millions de l'année 1997 à 300 millions en 2025 (175), (87), (57). La prévalence mondiale arrivera à 4,4% (216) où le diabète type 2 affecte au moins 100 millions de personnes dans le monde (138a).

Au cours du diabète sucré, les anomalies lipidiques sont fréquentes, prononcées et représentent un facteur de risque important dont l'augmentation des maladies cardio-vasculaires, en particulier chez les diabétiques de types 2 (18), (209).

Le diabète sucré entraîne aussi des perturbations du métabolisme de lipides et des lipoprotéines très importantes. La dyslipidémie est caractérisé par un taux élevé des triglycéridémie, les TG des VLDL et une baisse en cholestérol d'HDL₂ (138a) (19).

Pailleurs, la dyslipédémie chez les diabétiques est caractérisé par des nombreuses anomalies métaboliques du lipoprotéines (33), (65).

Les majorité des lipoprotéines (VLDL, LDL, HDL) sont constituées de plusieurs sous groupes et leurs classification peut être réalisé selon leurs densités, leurs tailles ou leurs contenus en apolipoprotéines et/ou la combinaison entre eux (160).

La concentration en lipoprotéines ou apolipoprotéines est très variable et elle est totalement différente dans les 2 formes majeurs du diabète (18), (197), (214). Cependant, plusieurs études indiquent la

présence possible des anomalies structurales et fonctionnelles touchant le métabolisme du système transporteur des lipides. (33), (68).

Les altérations en les concentrations lipidiques et des lipoprotéines athérogéniques (VLDL, IDL, LDL) et antiathérogéniques (HDL) sont bien caractérisés dans les deux types de diabètes. En générale, les lipoprotéines sont antiathérogénique chez les DID bien traité ayant une concentration du glucose optimale. Par contre, les DNID ont des changements athérogéniques quelque soit le mode de traitement (197).

Les anomalies quantitatives comportent principalement une hypertriglycémie liées à une augmentation des lipoprotéines riches en triglycérides (VLDL, IDL), ainsi qu'une baisse du HDL-cholestérol, par diminution des particules HDL₂.

Parmi les anomalies qualitatives, on retient essentiellement : une modification de taille des lipoprotéines (VLDL de grande taille, petite et dense LDL), un enrichissement en triglycérides des LDL et HDL, une glycation des apolipoprotéines, une oxydabilité accrue des lipoprotéines et plus particulièrement chez les LDL (206), (207), (209).

Par ailleurs, le métabolisme des lipoprotéines est interrelié, et que n'importe quel changement d'un ou deux composés peut provoquer la dyslipidémie. (9). Sachant que la sécrétion et la clearance des VLDL est un facteur important de la concentration des lipides plasmatiques. Il peut être influencer par les hormones tel que l'insuline et les hormones de croissance (34), qui sont des forts agents lipolytiques (124).

Des études ont suggéré que l'insuline diminue la sécrétion des VLDL apo B hépatique tandis que dans les conditions associées avec résistance à l'insuline tel que le diabète sucré (type 2), il y a une

augmentation en sécrétion des VLDL-apo B. La déficience d'insuline chez les diabétiques de type 1 non contrôlé résulte d'une augmentation de la lipolyse avec mobilisation des acides gras libres des tissus adipeux conduisant à élever la sécrétion des VLDL par le foie (34). Lors du diabète sucré, la production des VLDL de grande taille, enrichis en triglycérides, conduit à l'accumulation de petites lipoprotéines de basse densité (LDL) athérogènes, riches en triglycérides et relativement pauvres en apo B. Cette accumulation des lipoprotéines athérogènes (LDL, IDL) et l'augmentation de leur durée de vie dans la circulation engendre la surcharge en cholestérol à la suite de leur peroxydation dans le micro-environnement. Les macrophages jouent aussi un rôle clé dans le développement de la plaque laquelle en se surchargeant en lipoprotéines contenant de l'apo B par le biais d'un récepteur différent du récepteur conventionnel des LDL. Un déficit en lipoprotéines de haute densité, accompagne certaines hypertriglycéridémies, est susceptible de contribuer au développement de l'athérosclérose par le biais d'une réduction de l'activité de la voie de retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie qui reste le seul site d'élimination du cholestérol (128).

Enfin, dans ce partie on va étudier l'impacte du diabète sucré sur les concentrations plasmatiques en glucides, lipides et protéines. Ainsi, on a essayé de voir s'il y a des changements touchant la concentration et la composition des lipoprotéines plasmatiques chez nos populations diabétique et témoins, ainsi, chez les diabétiques de types 1 comparé au diabétique de type 2.

MATERIELS ET METHODES

I- POPULATION ETUDIEE

Notre étude a été réalisée sur une population âgée entre (20 et 45 ans), recrutée au centre clinique de l'université jordanienne des sciences et technologie en Irbid - Jordanie.

La population étudiée est constituée de 60 individus dont :

- Vingt (N=20) patients atteints de diabète insulino-dépendant (DID). Ces patients comportent 10 femmes et 10 hommes souffrant du diabète seulement sans aucune pathologie.
- Vingt (N=20) patients de diabète non insulino-dépendant (DNID). Ces patients comportent 10 femmes et 10 hommes souffrant du diabète et exempts de toute autre pathologie.
- Vingt (N=20) sujets sains, dix femmes et dix hommes sont dépourvus de toute maladie.

Les caractéristiques de cette population sont regroupées dans le (tableau I.1).

Tableau I.1 : les caractéristiques générales de notre population étudiée.

	Témoins	Diabète de type 1	Diabète de type 2
Nombre du sujet	20	20	20
Age (ans)	33.65 ± 2.09	30.20 ± 1.77	38.72 ± 1.56
IMC (Kg/m ²)	25.05 ± 0.91	26.13 ± 0.56	27.80 ± 0.99
Durée du diabète (ans)	/	4.92 ± 0.58	4.25 ± 0.51
Type de traitement	/	Insuline	Hypoglycémiants
Systolique pression artérielle (mmHg)	117.25 ± 1.33	117.50 ± 1.72	115 ± 3.44
Diastolique pression artérielle (mmHg)	77 ± 1.59	78.25 ± 1.71	79.25 ± 1.41
Hb (g/dl)	13.38 ± 0.39	12.96 ± 0.35	13.56 ± 0.25

II- PRELEVEMENTS ET TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

Les prélèvements sanguins se font au niveau de la veine du pli du coude, après 12 heures de jeûne. Le volume de sang est de 17-20 ml. 10.1ml de sang prélevé est récupérée dans des tubes à héparine de sodium (40µl de heparinate de sodium/10ml de sang comme un anticoagulant). L'autre partie est recueillie dans des tubes secs. Les échantillons prélevés sur tube hépariné sont destinées au dosage de HbA₁C et récupération des lymphocytes et les érythrocytes (voir chapitre 2 et 3).

Après coagulation du sang prélevé sur tube sec, les échantillons de sang sont centrifugés à 3000 tours par minutes (tr/min) pendant 15 min. une partie de sérum est récupéré en vue de différentes dosages biochimiques et l'autre partie est conservé avec une solution de NaN₃ à 0.2% et de Na₂EDTA à 10%, à raison de 10 µl/ml pour la séparation des lipoprotéines.

III- ANALYSES BIOCHIMIQUES

1- Dosage des paramètres glucidiques sériques

1.1- Dosage du glucose

Le dosage de la glycémie est effectué sur du sérum par une méthode enzymatique à l'aide de la glucose oxydase (Kit ARCOMEX, Jordan),(Barham and Trinder (1972) ; Massod (1976)).

Les valeurs moyennes sont exprimées en g/l .

1.2- Dosage du hémoglobine glyqué

Le dosage se fait par une méthode colorimétrique par Kit (Stanbio, USA). Les valeurs moyennes du HbA_{1c} sont exprimées en pourcentage de taux du Hb totale.

Cette méthode consiste à lyser 100 µl du sang en ajoutant 500 µl du réactif de lyse.

L'hémolysât a été obtenu après l'incubation à température ambiante pendant 5 min . 100 µl d'hémolysât préparé est mélangé à une 3 ml de résine échangeuse de cations tamponné à pH 6.9. l'hémoglobine non glyqué (HbAc) se lie à la résine par des faibles liaisons. Par contre, le glycohémoglobine (HbA₁) reste libre dans le surnageant.

Le pourcentage de HbA₁ est déterminé en mesurant la densité optique à 415 nm. Le pourcentage de HbA_{1c} a été calculé à partir de HbA₁ et le facteur de conversion. (Trivelli,et al., 1971; Gonen and Rubenstein, 1978; Gabbay et al., 1977; Abraham et al., 1978; Stanbio Laboratory data).

2- Dosage des paramètres en protéines sériques

2.1- Dosage de l'insuline

Le dosage d'insuline se fait à l'aide d'un Kit d'ELISA (DSL – 10 – 1600 Active ® Elisa, USA).

Cette méthode est un immunodosage de type sandwich d'une seule étape avec enrichissement enzymatique.

Pour le dosage, les standards, les contrôles et les échantillons de sérum à doser sont incubés avec des anticorps anti-insuline dans des puits de microtitrage enduits d'un autre anticorps anti-insuline. Après

incubation et lavage, les puits sont incubés avec le substrat de tétraméthylbenzidine (TMB). On ajoute ensuite une solution d'acide pour arrêter la réaction. L'absorbance mesurée à 450 nm est directement proportionnelle à la concentration d'insuline présente. Un ensemble de standards d'insuline est utilisé pour tracer une courbe d'étalonnage afin de calculer les concentrations en insuline des inconnus.

Pour la procédure de dosage de routine, pipeter 25 µl des standards avec différentes concentrations d'insuline (0 – 3 – 10 – 50 – 100 µUI/ml), des contrôles et des échantillons dans les puits appropriés de plaque de microtitrage. Ensuite ajouter 100 µl de la solution de conjugué anticorps-enzyme à chaque puit. Incuber les puits à température ambiante pendant une heure après l'aspiration et lavage de chaque puits 5 fois avec la solution de lavage.

Ajouter 100 µl de solution chromogène TMB à chaque puits et incuber les puits à température ambiante pendant 20 min.

En fin, ajouter 100 µl de solution d'arrêt (acide-sulfurique 0.2 M) à chaque puit et lire l'absorbance de la solution pendant 30 min en utilisant un lecteur de microplaque Elisa réglé à 450 nm.

Les valeurs moyennes sont exprimées en µUI/ml.

2.2- Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales dans le sérum est effectué selon la méthode colorimétrique de Biuret.

Les valeurs moyennes sont exprimées en g/l .

3- Dosage des paramètres lipidiques sériques

3.1- Dosage de cholestérol total

La concentration plasmatique du cholestérol est déterminée par la méthode enzymatique (Kit Syrbio, France).

Les valeurs moyennes sont exprimées en g/l. (Richmond, 1973; Roeschlau et al., 1974; Trinder, 1969) .

3.2- Dosage de triglycérides

Le dosage de triglycérides est réalisé par une méthode colorimétrique enzymatique (Kit Biolabo, France). Les valeurs moyennes sont exprimées en g/l. (Esders and Michrina, 1979).

3.3- Dosage des phospholipides

C'est une méthode colorimétrique enzymatique (Kit de Bio Mérieux, France).

Les valeurs moyennes sont exprimées en g/l .

IV- Séparation des lipoprotéines sériques par précipitation

La séparation des différentes fractions de lipoprotéines est réalisée par la méthode de précipitation selon Burstein et al (1970, 1989). Cette méthode permet d'isoler les fractions lipoprotéiques (VLDL, LDL et HDL) en fonction de leur capacité de précipitation par des polyanions, tel le dextrane de sulfate et l'acide phosphotungstique en présence des cations divalents, tel que Mg^{2+} , en utilisant du même réactif de précipitation à différentes concentrations; cette séparation sélective

permet de séparer à partir du sérum, d'abord les VLDL ensuite les LDL et enfin les HDL dont les lipoprotéines de faible densité (VLDL et LDL) sont précipitées par du phosphotungstate plus $MgCl_2$ et celles de haute densité (HDL2 et HDL3) par du sulfate de dextrane plus $MgCl_2$.

Cette technique consiste à ajouter 37.5 μ l d'une solution de phosphotungstate (pH 7.6) et 150 μ l d'une solution de $MgCl_2$ 2M au 3 ml

de sérum. Après 30 min d'incubation à température ambiante, le mélange est centrifugé à 4500 tr/min pendant 30 min à 20 C°.

Le surnageant est séparé du précipité qui contient les VLDL. Cette fraction de lipoprotéine peut apparaître ainsi sous forme d'un anneau à la surface du tube. On ajoute ensuite 150 μ l de chacune des deux solutions précédentes au surnageant séparé. Après incubation et centrifugation aux mêmes conditions précédentes, le précipité obtenu contient les LDL.

120 μ l de sulfate de dextrane à 5% et 150 μ l de $MgCl_2$ sont ajoutés au surnageant. Après une nuit d'incubation, le précipité obtenu par centrifugation correspond à la fraction HDL₂. Le pH du surnageant voisin de 7.6 est ajusté à 5.4 par du HCl 1N, une précipitation immédiate a lieu.

Après centrifugation, le précipité contenant les HDL₃ est séparé du surnageant qui correspond aux protéines plasmatiques solubles.

Pour minimiser la contamination des lipoprotéines par les protéines plasmatiques, les 4 précipités sont purifiés. Les précipités contenant des VLDL et les LDL sont solubilisés dans 1500 μ l de tampon tris salin (pH 7.6) et précipité ensuite avec 60 μ l de sulfate de dextrane 0.05% et 75 μ l de $MgCl_2$ (0.05 M).

Après une centrifugation, les précipités sont dissous dans 100 μ l d'une solution de potassium 0.5 M puis centrifugés. Les surnageants obtenus correspondant aux fractions VLDL et LDL.

Le précipité qui contient les HDL₂ est dissout dans 980 μ l de tampon tris salin et reprécipité par addition de 98 μ l de MgCl₂ 2M.

Après centrifugation, le précipité est solubilisé dans 30 μ l d'oxalate de potassium 0.5 M et le surnageant contenant les HDL₂ est obtenue par centrifugation.

Le précipité qui correspond au HDL₃ est solubilisé dans 98 μ l d'oxalate de potassium 1 M et le pH est ajusté au pH 9.5 par NaOH 1N. le surnageant obtenu après centrifugation correspond à la fraction HDL₃.

1-Détermination des teneurs en lipides de VLDL, LDL et HDL₂₋₃

Les concentrations des cholestérol, triglycéride et phospholipide sur les différentes fractions des lipoprotéines sont déterminés par des Kits enzymatiques décrite dans ce chapitre.

Les valeurs moyennes sont exprimées en g/l .

2-Détermination des apoprotéines totales des VLDL, LDL et HDL₂₋₃

Le dosage de protéines sur les différentes fractions de lipoprotéines est réalisée par la méthode de lowry et al (1951).

Les valeurs moyennes sont exprimées en g/l .

V- ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats obtenus sont exprimés sous forme de moyenne \pm ES (standard erreur). Après analyse de variance, la comparaison des moyennes entre les diabétiques et les témoins est réalisée par le test « t » de student. On utilise le test « t » indépendant pour comparer entre les diabétiques et témoins d'une part et entre les diabétiques de type 1 et type 2 d'autre part.

La valeur P est significativement différentes quand $P < 0.05$ et hautement significative quand $P < 0.001$.

Tous les analyses sont réalisés à l'aide d'un programme statistique informatisé SPSS (chicago, 2001, USA).

RESULTATS ET INTERPRETATION

I- Analyse des paramètres biochimiques chez la population étudiée

1- Dosage de glycémie et hémoglobine glycosylé

Les valeurs moyennes de glycémie (est de 0.78 ± 0.03 chez les témoins, 1.34 ± 0.07 chez les DID et 1.51 ± 0.13 chez les DNID) et d'hémoglobine glycosylé (est de 5.38 ± 0.15 chez les témoins, 7.45 ± 0.26 chez les DID et 8.06 ± 0.34 chez les DNID) sont représentés sur la figure I.1 et la figure I.2 respectivement.

Une augmentation très significative de la glycémie a été observée chez les patients diabétiques de type 1 et 2 par rapport au témoins. Les mêmes résultats ont été obtenus concernant l'HbA_{1C}.

2- Dosage des protéines sériques

Les concentrations d'insuline obtenue sont regroupées sur la figure I.3. Une diminution très significative a été observée chez les diabétiques de type 1 comparé aux témoins. Par contre, une augmentation hautement significative a été notée chez les DNID.

Par ailleurs, les concentrations d'insuline sont significativement augmentées chez les DNID par rapport au DID.

Concernant les concentrations des protéines totales (PT), Figure I.4 montre que les DID ont une diminution significative par rapport au témoin. En revanche, les teneurs des protéines sont significativement élevés chez les DNID que les DID.

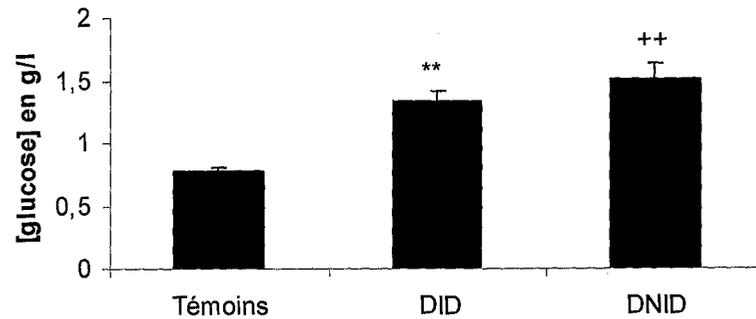


Figure I.1: Concentrations moyennes de la glycémie chez les différents groupes étudiés. Les valeurs sont exprimées en g/l.

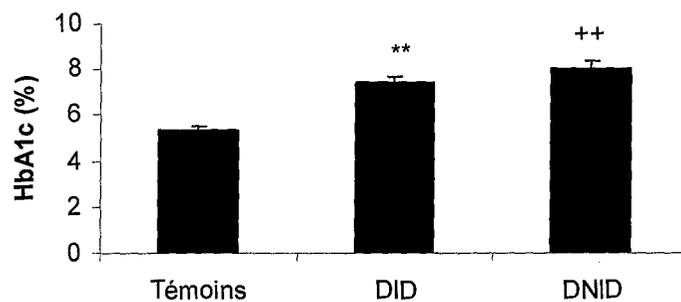


Figure I.2: Pourcentages moyennes d'hémoglobine glycosylé chez les Témoins, DID et DNID. Les valeurs sont exprimées en %

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison significative entre :

- témoins et DID: *p < 0.05; **p < 0.001
- témoins et DNID: +p < 0.05; ++p < 0.001
- DID et DNID: # P < 0.05; ## p < 0.001

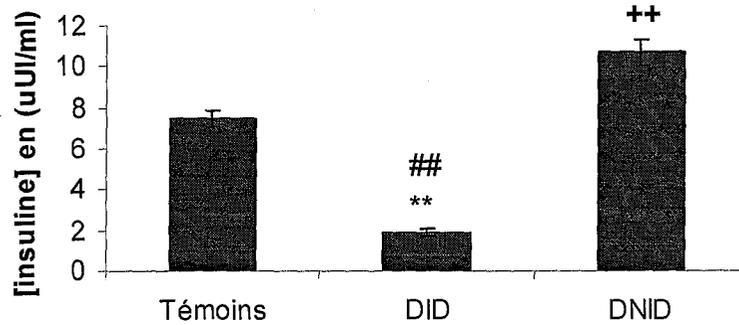


Figure I.3: Concentrations moyennes de l'insulinémie chez les Témoins, DID et DNID. Les valeurs sont exprimées en µUI/ml

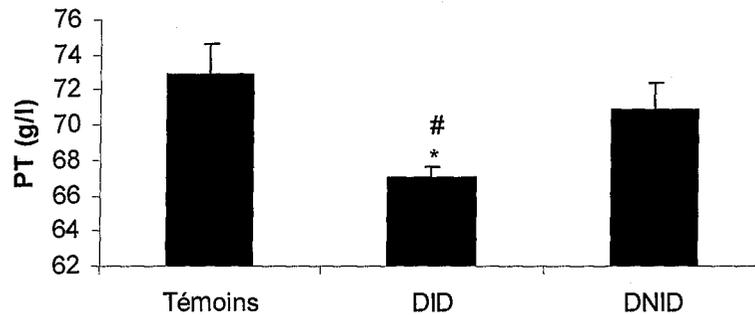


Figure I.4: Concentrations moyennes des protéines totales chez les Témoins, DID et DNID. Les valeurs sont exprimées en g/l

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison significative entre :
 témoins et DID: *p < 0.05; **p < 0.001

témoins et DNID: +p < 0.05; ++p < 0.001

DID et DNID: # P < 0.05; ## p < 0.001

3- Dosage des lipides sériques

Le profil lipidique en sérum est déterminé en mesurant les concentrations du cholestérol total (CT), triglycéride (TG) et phospholipide (PL).

La Figure I.5 a indiqué qu'il y a une augmentation significative de cholestérol total chez les DNID par rapport au témoins.

En parallèle, les mêmes résultats sont obtenus concernant la concentration en TG. Ainsi, une augmentation significative chez les DNID par rapport au DID. (Figure I.6).

Par ailleurs, pour le taux circulant des phospholipides aucune différence n'a été observée entre les différents groupes étudiés (Figure I.7).

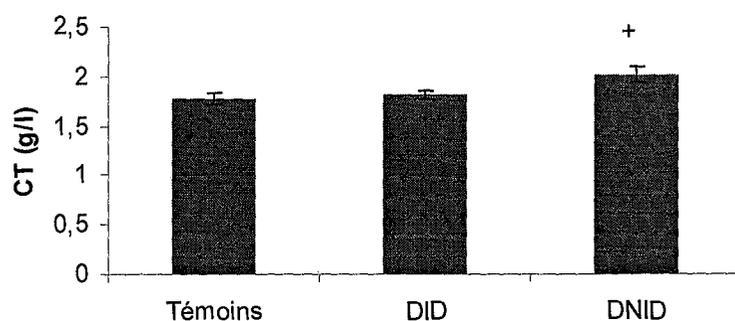


Figure I.5: Concentrations moyennes du cholestérol total chez les Témoins, DID et DNID. Les valeurs sont exprimées en g/l

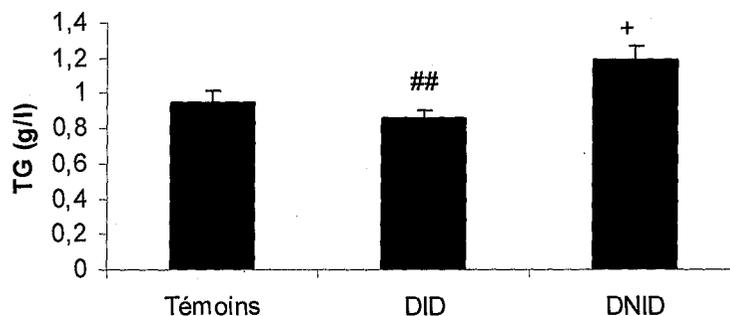


Figure I.6: Concentrations moyennes du triglycéride chez les Témoins, DID et DNID. Les valeurs sont exprimées en g/l

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison significative entre :
 témoins et DID: *p < 0.05; **p < 0.001

témoins et DNID: +p < 0.05; ++p < 0.001

DID et DNID: # P < 0.05; ## p < 0.001

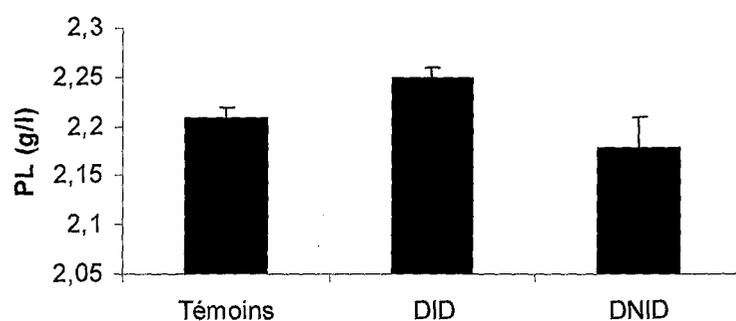


Figure I.7: Concentrations moyennes du phospholipide chez les Témoins, DID et DNID. Les valeurs sont exprimées en g/l

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison significative entre :
 témoins et DID: *p < 0.05; **p < 0.001

témoins et DNID: +p < 0.05; ++p < 0.001

DID et DNID: # P < 0.05; ## p < 0.001

II- Détermination des teneurs en lipides et en protéines des différentes fractions de lipoprotéines sériques chez les témoins et les diabétiques

1- Concentrations et composition des VLDL sériques

Aucune différence n'a été observée entre les DID et les témoins concernant (CT, TG, PL) pour les fractions du VLDL.

Par contre, on observe une augmentation significative des teneurs en TG et apoprotéines totales chez DNID par rapport aux témoins respectivement ($p < 0,05$; $p < 0,05$).

Par ailleurs, les masses des VLDL augmente chez les diabétiques mais cette augmentation reste significative chez les patients de type 2.

Les résultats obtenus sont regroupés sur la figure I.8.

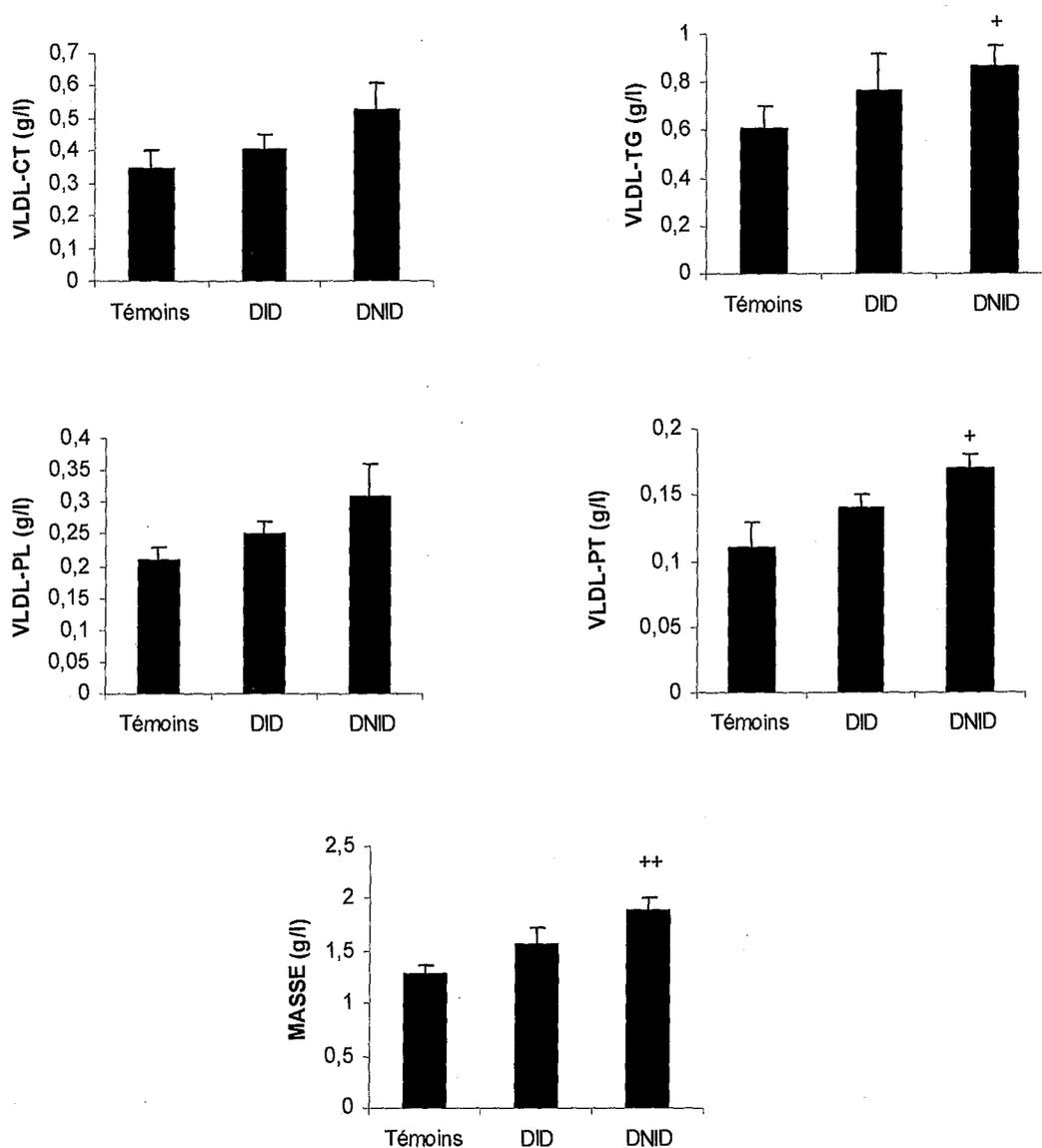


Figure I.8: Concentrations moyennes en lipides (CT, PL,TG) et apoprotéines (PT) des VLDL chez les Témoins, DID et DNID sont exprimées en g/l.

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison significative entre :
 témoins et DID: * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$, témoins et DNID: + $p < 0.05$; ++ $p < 0.001$
 DID et DNID: # $P < 0.05$; ## $p < 0.001$.

2- Concentrations et composition des LDL sériques

Les valeurs en lipides et en protéines totales des LDL sont représentées sur la figure I.9.

Une augmentation significative des CT, et PL a été observée chez les DID par rapport aux témoins. Par contre, une diminution significative concernant les protéines totales.

Par contre, une augmentation significative des CT et TG a été observée chez les DNID comparé aux témoins. De plus, une augmentation significative du masse des LDL a été observée chez les DID comparés aux témoins.

3- Concentrations et composition des HDL₂ sériques

Une diminution significative de CT, TG, PL, PT et la masse du HDL₂ a été observée chez les DNID comparés aux témoins. Les mêmes résultats concernant le (PL, PT et les masses) sont obtenus chez les DID.

Ainsi, la figure I.10 représente qu'une augmentation significative chez les DID par rapport aux DIND concernant les CT et les PL.

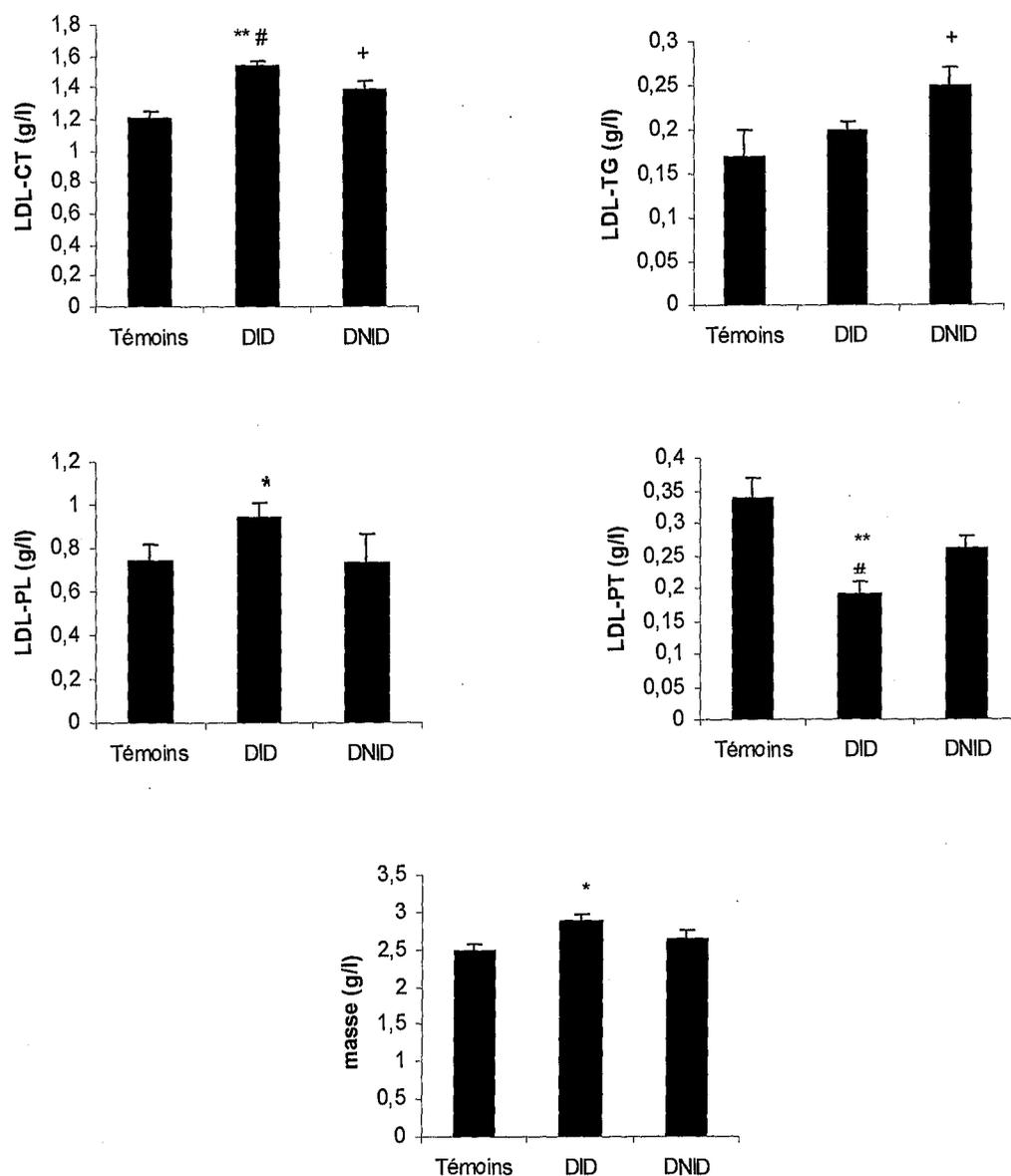


Figure I.9: Concentrations moyennes en lipides (CT, PL, TG) et apoprotéines (PT) des LDL chez les Témoins, DID et DNID sont exprimées en g/l.

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison significative entre :
 témoins et DID: *p < 0.05; **p < 0.001, témoins et DNID: +p < 0.05; ++p < 0.001
 DID et DNID: # P < 0.05; ## p < 0.001.

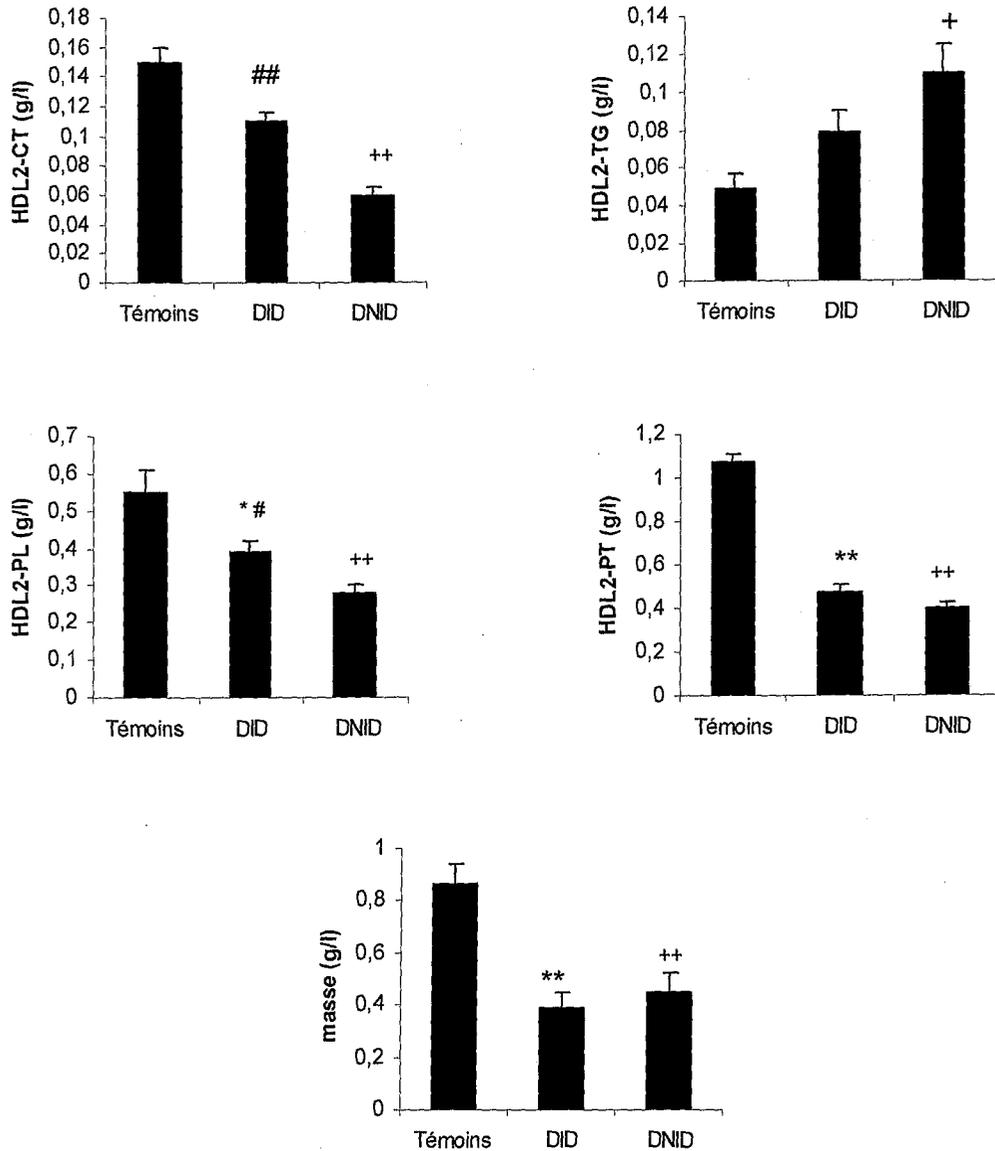


Figure I.10: Concentrations moyennes en lipides (CT, PL, TG) et apoprotéines (PT) des HDL₂ chez les Témoins, DID et DNID sont exprimées en g/l.

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison significative entre :
 témoins et DID: *p < 0.05; **p < 0.001, témoins et DNID: +p < 0.05; ++p < 0.001
 DID et DNID: # P < 0.05; ## p < 0.001.

4 – Concentrations et composition des HDL₃ sériques

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure I.11 une augmentation significative de TG a été observée chez les diabétiques par rapport à leurs témoins tandis que les PT sont significativement faibles chez les diabétiques.

Aucune différence significative en masses des HDL₃ entre les témoins et les diabétiques.

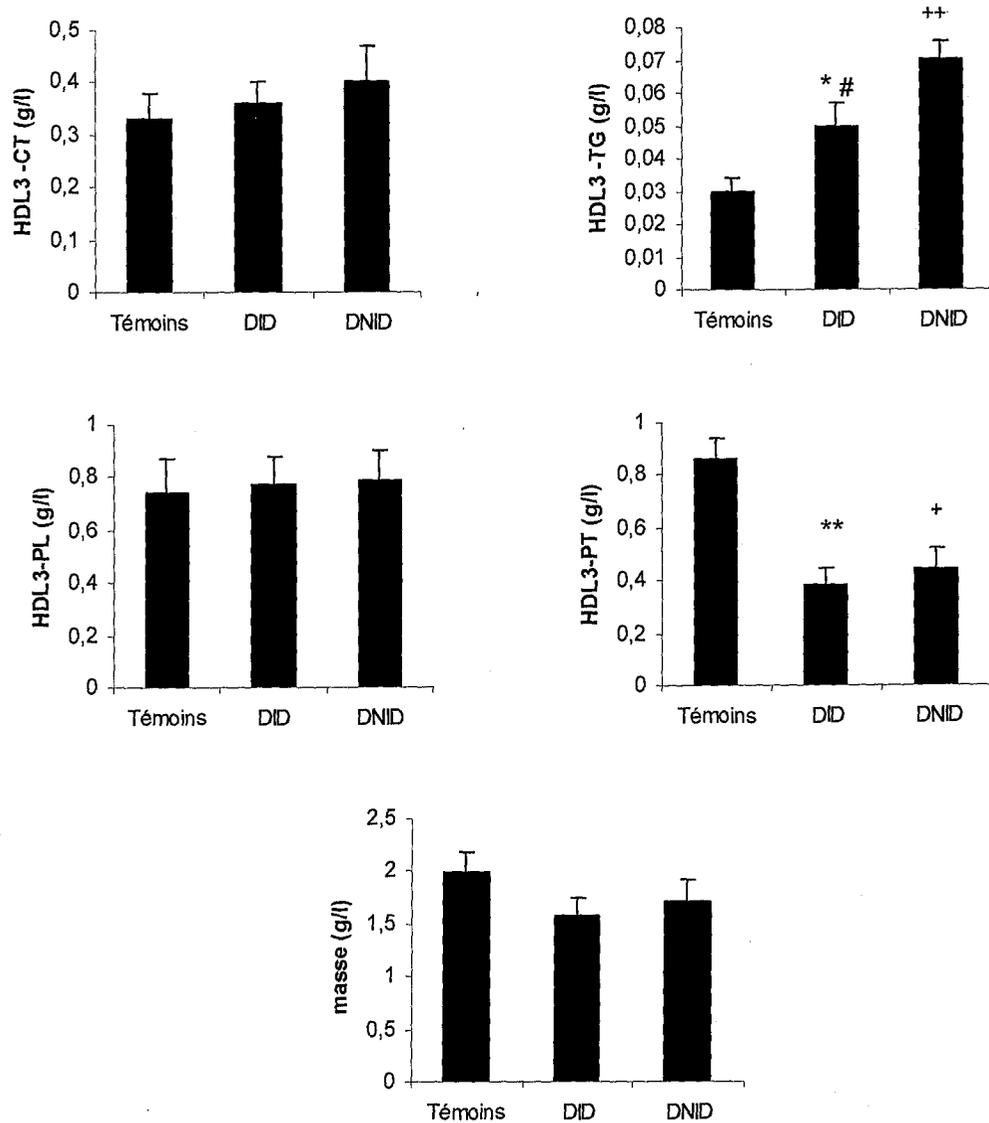


Figure I.11: Concentrations moyennes en lipides (CT, PL,TG) et apoprotéines (PT) des HDL₃ chez les Témoins, DID et DNID sont exprimées en g/l.

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison significative entre : témoins et DID: *p < 0.05; **p < 0.001, témoins et DNID: +p < 0.05; ++p < 0.001, DID et DNID: # P < 0.05; ## p < 0.001.

DISCUSSION

Dans cette partie, on a déterminé les caractéristiques principales de notre population saine et diabétiques de type 1 et type 2. Ainsi, on a recherché les modifications biochimiques qui touchent les compositions des transporteurs lipidiques sanguines.

Les résultats obtenus montrent que les teneurs sériques en glucose et en hémoglobine glycosylée sont élevées d'une façon très significative chez les diabétiques insulino et non insulino-dépendants. Tandis que la concentration d'insuline est significativement diminuée chez les DID comparés aux témoins.

Les résultats obtenus sont en accord avec d'autres études dont les DNID ont des teneurs élevées en glucose, HbA_{1c} et la concentration basale d'insuline comparées aux témoins ; avec un indice de masse corporelle supérieur que 27 Kg/m². de plus, la pression artérielle diastolique et systolique ne montrent pas aucune modification entre DNID et témoins. (154). Il est noté aussi que le risque cardio-vasculaire du diabète de type 2 augmente à partir d'une HbA_{1c} de 6.2%, dont une augmentation de 1% de HbA_{1c} s'accompagne d'une augmentation sur 10 ans de 10 – 11% de la mortalité cardiovasculaire (32,62).

L'élévation de la glycémie et HbA_{1c} chez nos diabétiques de type 1 et type 2 montre un dysfonctionnement métabolique. Ainsi l'indice de masse corporelle est significativement élevée chez les DNID comparée aux témoins. Ces données sont identiques à celle de l'étude de Leonhardt et al (104). Ainsi, il est trouvé que l'élévation en glucose et en HbA_{1c} est plus prononcée chez les DID que les DNID. (104), (174).

L'indice de masse corporelle de notre DNID patients est plus grande que celle de notre DID et normal individus. Il est reconnu que

l'obésité et le diabète sont strictement associés où l'incidence de diabète est généralement élevée chez la population obèse.

En plus, les diabétiques non insulino-dépendants présentent généralement des concentrations d'insuline plasmatique normales ou même élevées. Plusieurs études ont proposé que l'hyperinsulinémie responsable de l'association entre l'obésité et l'hypertriglycéridémie ; ce qui explique l'augmentation significative du TG plasmatique chez les DNID en comparaison aux témoins. Où De plus, il existe une corrélation modérée entre la glycémie à jeun et la concentration en TG, ainsi, il y a une corrélation significative entre les teneurs en glucose et l'hémoglobine glycosylée chez les deux groupes de diabètes, DID et DNID. (18).

Les teneurs sériques en TG et en cholestérol total sont significativement élevées ($P < 0.05$) chez les diabétiques de type 2 en comparaison aux témoins. Cependant, les TG chez DNID restent significativement élevés ($P < 0.001$) par rapport aux DID. Par contre, les concentrations sériques en phospholipides ne montrent aucun changement chez les diabétiques par rapport à leurs témoins.

Les résultats obtenus concernant les concentrations des triglycérides et cholestérol sont en accord avec plusieurs travaux dont les concentrations des TG et CT sériques sont significativement élevées chez les diabétiques non insulino-dépendants comparés aux témoins. (27,134,198).

D'autre étude présente une concentration des TG élevés chez les DNID comparés aux témoins avec une concentration normale du CT. (186).

De plus, les résultats trouvés chez les diabétiques insulino-dépendants restent similaires aux diabétiques de (Verroti et al.) dont il n'y a pas de changement significatif entre les DID et les témoins (210). Ce cas existe chez les diabétiques de type 1 bien contrôlé et dépourvu des maladies cardiovasculaires et néphropathie. (9, 49).

Les modifications du métabolisme lipidique sont largement discutées lors du diabète sucré. Ils sont supposés à participer dans la pathologie liée aux athéroscléroses (149), sachant que le risque des maladies coronaires s'augmente de 2 à 4 fois chez les diabétiques (27, 146). Ainsi, la dyslipidémie qui accompagne le diabète contribue en excès à ce risque où plusieurs études ont montré que le teneur en TG est un facteur de risque des maladies cardiovasculaires plus puissant que le cholestérol (146).

Le mécanisme d'augmentation du TG peut être due à l'élévation de la production de VLDL-TG qui est due à plusieurs facteurs tels que l'obésité (1).

Néanmoins, nos malades ne présentent pas une surcharge pondérale importante mais l'association entre l'obésité et le diabète peut intervenir dans ce mécanisme. Ainsi, l'hyperglycémie du diabétique peut augmenter la production hépatique des VLDL-TG (1).

De plus, on note que les IMC de nos diabétiques non insulino-dépendants sont plus grands que ceux des DID et des normales individus.

Il y a donc une corrélation positive entre la teneur en TG sériques et l'obésité (198) dont l'augmentation d'une unité d'indice de masse corporelle s'oppose par une élévation de 5% de la prévalence

d'obésité (175). Ainsi, il y a une relation étroite entre le diabète et l'obésité, dont l'incidence du diabète est généralement élevée chez les peuples obèses (18).

Concernant le teneur en phospholipides, il n'y a pas de changement entre nos diabétiques et les témoins. Ces résultats ont été obtenus lors de l'étude de McEneny et al (115) tandis que d'autres études montrent un taux de PL est significativement élevé chez les DID avec $HbA_{1c} \leq 8\%$ (9).

Dans notre étude, on a mesuré, aussi, les composés des différentes fractions lipoprotéiques chez nos diabétiques et leurs témoins pour assurer nos connaissances sur les variations dues au diabète de type 1 et de type 2 sur le métabolisme des lipoprotéines.

Plusieurs études ont montré que le métabolisme des lipoprotéines a été altéré en diabète sucré et cette altération est plus ou moins prononcée avec des variations qualitatives et/ou quantitatives (18, 206, 210).

Par ailleurs, nos résultats montrent une augmentation des teneurs en cholestérols, TG, pL et apolipoprotéines, au niveau de la fraction du VLDL ; mais cette différence n'est pas significative que pour les TG et PT des diabétiques non insulinodépendants respectivement ($P < 0.05$, $P < 0.05$) comparés aux témoins.

Cependant, il y a une augmentation au niveau des masses des VLDL et cette augmentation hautement significative seulement chez le DNID ($P < 0.001$).

De plus, les VLDL diabétique insulinodépendant avec un $HbA_{1c} \leq 8.8$, ne présentent pas de changements significatifs en teneurs des TG et cholestérol comparés aux témoins (9, 34).

(Jeffrey et al (86a) rapporte que la surproduction de VLDL est commun chez les diabétiques mêmes s'il n'y a pas élévation de TG plasmatique (86a).

L'un des déterminant d'hypertriglyceridémie est la surproduction des TG-VLDL qui attribue à élever le flux des substrats, glucose et acides gras libres au foie, ainsi à la résistance hépatique des effets inhibitrices d'insuline sur la sécrétion des VLDL qui est réduit significativement chez les obèses et les DNID patients (207). Cette augmentation en VLDL-TG peut être accompagnée avec une surproduction des VLDL-apo B chez les DNID. (207), (186) et chez les DID (40). Par contre, d'autres études montrent que les diabétiques ont une faible concentration d'apo B-VLDL. (9).

Certains études suggèrent que la surproduction des VLDL-TG peut être accompagné par surproduction des VLDL-apro-B en DNID (115) avec et sans hypertriglyceridémie. (86a) malgré qu'augmentation 70% des lipoprotéine riches en TG est due à l'augmentation de leurs nombres. (207).

En plus, les VLDL représentent des altérations au niveau de la distribution des apolipoprotéines dont l'association entre les modifications chimiques et les altérations fonctionnelles des apolipoprotéines à été démontré. (86). Cependant, il y a une augmentation relative de apo E comparé au apo C. (207, 197). D'autre changement en VLDL (composition) inclus la glycation des apo C et apo E, ce dernier peut inhiber l'attachement au récepteur B/E résultant l'altération du VLDL catabolisme. Ainsi, il est suggéré que la glycation de apo CII cofacteur de LpL, peut contribuer à réduire l'activation de la lipoprotéine lipase (LpL). (207). Le peptide apo C inhibe aussi

l'assimilation hépatique de VLDL s'il est présente en large quantité. (18).

De plus, les diabétiques de type 2 montrent une réduction en clearance de VLDL lorsque le degré de glycémie est élevé (9, 207). Cette déficience en catabolisme des VLDL reflète la réduction de l'activité lipolytique sur ces lipoprotéines en particulier le LpL. Finalement, les VLDL de DNID patients ont des propriétés métaboliques altérés avec augmentation l'accumulation cellulaire des lipides dans les macrophages, ce qui contribue à former les cellules spumeuses. (207).

De plus les lipoprotéines riches en TG peut réduire la fixation d'insuline sur ses récepteurs et augmenter les corps cellulaires des acides gras qui sont dérivés de la lipolyse des lipoprotéines riches en TG ; ce qui aggrave l'insulino-résistance et conduit aux hyperinsulinémie.(186).

Concernant les fractions des LDL, les teneurs en cholestérol et pL sont significativement augmentés chez les DID respectivement ($P < 0.001$, $P < 0.05$) tandis que les DNID comparés aux témoins montrent des teneurs élevés en cholestérol et triglycérides respectivement ($P < 0.05$, $P < 0.05$). ainsi, il y a une différence significative entre les deux types de diabète au niveau de chol-LDL ($P < 0.05$).

En parallèle, Les diabétiques de type 1 montre une réduction significatif des apolipoprotéine des LDL comparés aux témoins ($P < 0.001$). De plus, cette réduction en PT-LDL des DID est presque significative en comparant avec DNID ($P = 0.05$). Ainsi, au niveau de la masse-LDL, on trouve que les diabétiques ont des masses plus élevés en comparant aux témoins avec un élévations significatif de masse LDL chez les DID ($P < 0.05$).

Les diabétiques étudiés par (Abrams et al) (1) ne présentent pas un taux élevé en LDL-cholestérol et ces résultats sont confirmés par d'autres études chez les DID (149, 153, 170) et les DNID (12, 149, 170) tandis que d'autres études ont montré qu'il y a une augmentation significative des LDL-cholestérol chez les DNID (154) et chez les DID (146, 173) comparés aux témoins.

En effet, l'augmentation du LDL-cholestérol est très corrélée avec la pourcentage de HbA_{1c} et principalement chez les diabétiques mal contrôlés. (9, 146, 153) ainsi, il est associé avec un risque élevé des maladies cardiovasculaires (30a).

Chez les DID, L'enrichissement de la classe des lipoprotéines de type LDL en phospholipides et en triglycérides est associée avec une diminution significative en apolipoprotéines. Ces données sont en accord avec nos propres résultats.

Cependant, l'élévation en masses des LDL est due à l'augmentation de leur contenues en cholestérol, TG et PL. (135).

Néanmoins, les LDL de DNID sont enrichis en triglycérides avec une augmentation du rapport cholestérol libre/lécithine comme aussi chez les DID.(197, 207).

Les patients diabétiques présentent une altération en clearance des LDL ainsi, il y a une manque d'affinité de LDL aux leurs récepteurs apo B/E. ce réduction de la clearance est due au insulino-résistance et/ou à une déficience en insuline provoquant une diminution du catabolisme des LDL a pour conséquence une augmentation significative de la durée de vie des VLDL, des IDL et des LDL et entraînant une augmentation du LDL-cholestérol. Cette augmentation en durée de vie des lipoprotéines accroît leur risque d'oxydation et de glycation (207, 208).

En effet, il existe au moins trois changements au niveau du LDL des diabétiques de type 1 et type 2, le premier est la glycation non enzymatique qui peut affecter plusieurs protéines quant exposent au concentration élevée du glucose.

En plus, elle affecte les apolipoprotéines trouvés en les 3 majeurs classes dont chaque glycation peut altérer le comportement métabolique. Dans le cas des VLDL, il y a une augmentation de sa durée de vie. Concernant les LDL, en plus au élévation de sa durée de vie; l'élimination des LDL se fait d'une façon pathologique par des récepteurs entraînant la formation du cellules spumeuses (186).

Par ailleurs, la glycation de apo B a un effet significatif sur le métabolisme de LDL dont la glycation de 2 à 5% de apo B peut réduire le catabolisme du LDL de 5 à 25%. (207). Sachant que l'apolipoprotéine B est un médiateur du récepteur de captation des LDL. La glycosylation des apo B rend les particules des LDL plus athérogénique en augmentant la formation des cellules spumeuses, l'agrégation des plaquettes sanguines et l'adhésion des molécules aux endothéliums. (184, 207).

Le deuxième changement est l'oxydation des LDL dont l'oxydabilité des LDL s'augmentent chez les DID et NDID à cause des compositions lipidiques de LDL ou des quantités des antioxydants présentes en LDL tel que le vitamine E, les caroténoïdes et les rétinoïdes (149).

L'oxydation qui augmente en diabète ne modifie seulement le contenu du phospholipides en LDL mais aussi la chaîne latérale des acides aminés en apoprotéines B. ces modifications produisent des LDL oxydés qui ne sont pas reconnaissable par les récepteurs classique des LDL mais reconnu par ce qui on appelle macrophage scavenger

récepteurs résultant la formation des cellules spumeuses. La dégradation des LDL oxydés a été altérée conduisant à leur accumulation dans ces cellules. Cette accumulation reste toxique chez cellules endothéliales résultant des altérations en leur structures et fonctions. Ainsi, le LDL oxydé augmente l'adhésion des monocytes circulés en l'endothélium augmentant aussi leurs migrations à l'intérieure d'intima vasculaire. (184).

Ainsi, la LDL glycé-oxydé reste immunogénique car elle stimule le système immunitaire provoquant la formation du complexe anticorps-lipoprotéine. Ce complexe est capté par les macrophages ce qui stimule la formation des cellules spumeuses et la libération des cytokines (TNF α , Il - 1) qui affecte l'endothélium et amplifier les processus athérogéniques (184, 207).

Les teneurs en lipides et en protéines mesurés chez les deux fractions de HDL montrent une diminution significative du HDL₂-chol chez les DNID (P<0.001), en plus une diminution en pL (P<0.001) et en protéines totales (P<0.001). par contre, la sous fraction HDL₃ présente du concentrations élevés en TG chez les DID (P<0.05) et DNID (P<0.001), tandis que les apolipoprotéines totales sont diminués chez les diabétiques comparés aux témoins.

On observe ainsi, une diminution significative du masse-HDL₂ des diabétiques de type 1 et type 2 comparant aux témoins (P<0.001).

Il y a des études montrant des normales HDL-colestérol chez les DID (118, 149, 173 , 90) ou DNID (12, 27, 90, 149) tandis que d'autres mentionnent des taux diminués en HDL-C chez les DID ou les DNID (18,45,146,154, 118,207, 198, 186).

Le particule du HDL est composé des sous fractions HDL₂ et HDL₃ (198). Le particule de HDL₂ est le sous fraction dominante de HDL et elle considère le responsable de réduction du HDL-C. (38), (146). Les diabétiques de type 2 ont une concentration réduit du HDL₂ et une concentration élevée du HDL₃ dont l'activité de lipase hépatique diminue la concentration en pL et TG en HDL₂ et augmente la [PL] in HDL₃. (78). De plus, l'altération du clearance du VLDL et la faible activité du LpL ont participé en diminuant la transformation du HDL₃ en HDL₂, ainsi le transfert du cholestérol est altéré en DNID ; ce qui inhibe la production du EC par LCAT (207).

Chez les DNID, HDL-cholestérol est significativement diminué que celle du DID et HDL-C du DNID est diminué en comparant aux témoins (186). Le diabète de type 2 est associé avec une diminution en [HDL-cholestérol] reliant au diminution en fraction de HDL₂ (207). La réduction en HDL₂ est liée au obésité et aux hypertriglyceridemie (207, 198) dont HDL-C est inversement corrélé avec la [TG]. (133), (205) ; ainsi à résistance à insuline qui a une rôle important en [HDL] chez les DNID. La faible concentration de HDL₂ est due aussi à l'augmentation du catabolisme du HDL avec augmentation de l'activité du triglycéride lipase hépatique (207).

Par contre, d'autre étude trouve que le HDL₃-C diminue significativement chez les DNID comparés aux témoins tandis que HDL₂-C augmente significativement et leurs somme n'est pas différente (27).

Donc les possibles mécanismes de réduction le HDL chez les insulino-résistants incluent :

1- Altération la lipolyse des VLDL, qui réduit le HDL pouvant entraver le transfert des apoprotéines et les phospholipides des lipoprotéines riches en TG au comportement du HDL.

2- L'échange entre EC-en HDL et TG en VLDL s'augmente par le CETP.

3- Echange l'activité de lipase hépatique, qui inhibe la production des apo AI (le majeur apoprotéine de HDL) et/ou la sécrétion hépatique des HDL naissant (9) qui sont éliminés rapidement de la circulation conduisant au faible concentration des HDL.(205), (38), (146).

Les différences trouvés au niveau du sous fractions du HDL chez les précédentes études sont due aux nombreux facteurs tel que l'âge, poids, sexe, degré de contrôle glycémique et la du ration du diabète des participants (146), ainsi aux régime alimentaire suivi (les habitudes alimentaire), la consommation d'alcool, l'activité physique, aux facteurs génétiques (46), (174) et les médicaments utilisés dans le traitement du diabète qu'ont un effet sur le teneur du HDL-C (par exemple, le traitement avec sulphonylureas est associé avec la réduction du HDL-C dans le sérum). (198)

Il est montré que le HDL₂ est le sous fraction qui protège contre le développement des athéroscléroses (198), (69) dont la concentration du HDL-cholesterol est un prédicateur important des maladies vasculaire dans les générale population (118). Elle est cardioprotectrice (133), HDL peut protéger contre l'athérosclérose grâce ses propriétés anti-inflammatoires et antioxydants (10), en empêchant l'oxydation des LDL dans le paroi artérielle ou par l'inactivation des LDL oxydé par l'action de son enzyme, paraoxonase, en inhibant le cuivre qui induit les peroxydes des lipides en LDL.(78).

Le risque des maladies cardiovasculaires s'augmente quand le rapport de $\frac{LDL}{HDL - C}$ est supérieur de 5 (205).

De plus, HDL₂ a un rapport élevée du cholestérol/total apo A que HDL₃ dont la moyenne des rapport $\frac{HDL - C}{apo AI}$ est diminué significativement chez les DNID comparés aux témoins. Ce qui explique le taux réduit du sous fraction HDL₂ protective chez les diabétiques. (198).

Il est noté que apo A diminue chez les diabétiques DID et DNID; cette diminution est significatif seulement chez les DID de 13 à 15% (65).

La conformation du Apo AI peut jouer un rôle fondamental.

Chez les diabétiques en cas d'hyperglycémie, le processus du transport reverse du cholestérol a été altéré in vitro par la glycosylation du HDL surtout la glycosylation du HDL₃ ce qui affecte l'abilité fonctionnel de son site à fixer sur les cellules en induisant l'efflux intracellulaire du cholestérol.

En plus, chez les diabétiques de type 1, il y a un transfert accéléré du EC de HDL aux lipoprotéines contenant apo B. cette accélération peut être due à l'augmentation en activité du CETP et/ou sa masse. Ainsi la réduction de l'activité du lipase hépatique est rapportée in diabète type 1 dont l'enzyme a une affinité altéré pour la sous fraction glycosylée. Cela conduit aux des changements dans la composition des lipoprotéines. Ces modification chimiques résultent an altération en la fonctionnement des apolipoprotéines ce qui touche l'activité

fonctionnelle des HDL au niveau des reconnaissances des récepteurs, l'activation des enzymes et l'attachement des lipides (86).

En effet, la structure du HDL peut déterminer par sa composition et sa taille sachant que n'importe quel changement dans la structure du HDL a des effets majeurs sur son métabolisme. Dans ce sens, la composition du HDL peut affecter directement le transfert du cholestérol estérifiée aux lipoprotéines riches en apo B ou peut influencer aussi le sens du cholestérol entre les cellules et les lipoprotéines. Ainsi, altération des activités des lipases, protéines affecte fortement la maturation et la transformation du HDL et anormalité en régulation le métabolisme du TG par LpL et HL peut réduire le teneur en HDL et élevant le risque des maladies cardiovasculaire. (86,133).

Par ailleurs, les protéines de transfert l'ester du cholestérol (CETP) et les protéines de transfert le phospholipides (PLTP) jouent des rôles importants dans le métabolisme du HDL (133, 154).

CETP catalyse le transfert de EC, TG et PL entre HDL et les lipoprotéines riches en apo B (VLDL, IDL, LDL) et ces processus induit un échange hétérogène avec TG. (33), (154).

L'activité de CETP est réduit chez les DNID comparés aux témoins (212).

Cependant, PLTP facilite le transfert de PL entre les lipoprotéines. Ainsi, il est capable de convertir HDL₃ aux petite et large HDL₂ (154) ; sachant que HDL₂ se forme pendant la lipolyse du VLDL par LpL et en présence de HDL₃ (21) dont le LCAT reste le principal enzyme qui convertie HDL₃ au HDL₂ (50). HDL peut réagir comme an initial accepteur de cholestérol libre de les cellules et fournit le substrat

primaire de LCAT. PLTP est capable aussi à augmenter le transport de CE par CETP entre les HDL reconstitué et les VLDL. (69).

Il est trouvé une augmentation significative de l'activité plasmatique du PLTP chez les diabétiques de type 2 qui est en relation à l'augmentation du taux plasmatique en TG (96), (154). Ainsi, il est trouvé que le teneur du PLTP est corrélé positivement avec la glycémie et le pourcentage de HbA_{1c} (45).

Enfin, pour augmenter la concentration du HDL-cholestérol, il faut changer le style de vie en améliorant le contrôle glycémique, en augmentant les activités physiques, cesser de fumer les cigarettes et réduire le poids du corps (205).

A la fin, la dyslipidémie chez les diabétique est caractérisé par des anomalies affectant la structure, le métabolisme et l'activités biologiques de tous les lipoprotéines athérogénique contenant apo B 100 (VLDL, IDL, et LDL) et les lipoprotéines antiathérogénique contenant apo AI et/ou apo AII (HDL). Ces anomalies incluent la dysfonctionnement du HDL et LDL en plus à la glycosylation des apo B et AI (33).

En effet, l'insuline joue un rôle essentiel dans le métabolisme des lipides, en intervenant à plusieurs niveau. Dans le tissu adipeux, elle inhibe l'action de la lipase hormono-sensible favorisant le stockage des graisses dans les adipocytes et réduisant le déversement d'acides gras libres dans la circulation. Elle freine, par un effet direct la production hépatique de VLDL. Par ailleurs, l'insuline est un puissant activateur de la lipoprotéines lipase, favorisant ainsi le catabolisme des lipoprotéines riche en triglycérides (chylomicrons et VLDL).

L'insuline facilite aussi le catabolisme des LDL par une action directe sur les récepteurs des LDL. De plus, l'insuline intervient dans le

métabolisme des HDL en activant le LCAT, en réduisant l'activité de la PLTP et en modulant l'action de la lipase hépatique. (208), (146), (18).

CHAPITRE II

Effets des acides gras polyinsaturés N-3 et N-6 sur la lymphoprolifération, la sécrétion d'IL-2 et la composition en acides gras des membranes des lymphocytes T

INTRODUCTION

Les affections du système immunitaire sont les facteurs majeurs contribuant aux infections qui restent des complications fréquentes chez les diabétiques. (32), (107), (89.) (132).

Généralement, les infections humains les plus importantes sont associés à une déficience nutritionnelle (42) car les nutriments peuvent moduler les actions du système immunitaire et affectent les résultats cliniques, et ceci constitue un issue très important de la pratique clinique et la santé publique (64)., En plus, les lipides jouent un rôle important dans le fonctionnement physiologiques et pathologiques des cellules du système immunitaire.(63),(75) dont les acides gras peuvent moduler le système immunitaire par plusieurs mécanismes en réduisant la lymphoprolifération, la synthèse des cytokines et l'expression des récepteurs sur les lymphocytes. (42), (218),(169).

Dans les dernières années, il y a une grande importance aux effets des différentes types des acides gras sur le système immunitaire principalement les acides gras polyinsaturés (AGPI) (137) (168) dont l'intérêt en acides gras n-3 a été commencé depuis 1970 avec des études en Eskimeux. Ces études ont montré que ce peuple nourrit d'un régime riche en lipides, cholestérol et acides gras polyinsaturés de type ω -3, ont une petite incidence des maladies cardiovasculaires. (147), (76),(88). De plus, selon ces études chez les Danois, AGPI ω -3 ont montré aussi un effet antiathérogène en diminuant les concentrations du cholestérol, LDL-cholestérol, triglycérides, et chylomicrons (66).

De ce fait, AGPI ω -3 ont un potentiel effet thérapeutique pour les maladies inflammatoires (26) (179), et pour réduire les maladies cardiovasculaires. (108) ainsi, augmentent l'absorption du Ca^{+2} au niveau du moelle osseuse (97).

L'huile de poisson riche en AGPI ω -3 (DHA et EPA) diminue le taux des TG, tandis que son impact sur le taux du cholestérol est variable. En plus,

EPA spécialement est corrélé positivement avec les changements au niveau du HDL- cholestérol et négativement avec l'hypertension (176).

D'autre part, la quantité et le type des lipides ont une influence importante sur les lipides plasmatiques et les lipoprotéines d'où les lipides sont des facteurs de risques associés avec la plupart des maladies. (176),(212).

En effet, AGPI n-3 ont des actions cytoprotectives et cythérapeutiques (166) et jouent un rôle bénéfique dans la prévention et le traitements de certaines maladies tel, arthrite, maladies auto-immunes, diabètes (13),(181),(134),(141), hypertension (121,72,176), désordres dermatologiques (28,91) et cancers (13), (79).

En plus, AGPI n-3 ont des propriétés hypolipidémique(91, 28), anti-inflammatoires (64), (72), (176), anti-thrombotiques et anti-rhumatoidiques (85), (213), (148), vasodilatateurs et anti-agrégateurs des plaquettes sanguins (72),(176),(201), ainsi, améliore la neuropathie périphérique et la néphropathie en diabète, (72), (194), (201).

Par ailleurs, AGPI n-3 en particulier DHA, sont des composés essentielles pour la croissance et le développement fonctionnel du cerveau chez l'enfant et aussi, chez l'adulte il améliore le capacité d'apprendre (148), (72), (83), (147), (30), (142), (50). Pour cela, le FAO a recommandé que l'acide arachidonique (AA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) doivent être présentes dans la formule de lait d'enfance d'une quantité équivalente à celle trouvée chez le lait maternel (164). Dans l'organisme, le transport des AA se fait par l'albumine sérique ou les lipoprotéines (200).

Par contre la supplémentation d'une concentration élevée d'AA est indésirable car il est responsable d'une groupe de maladies appelés les maladies d'ouest tel les maladies cardiovasculaires, les maladies inflammatoires, cancer et certains maladies psychiques (dépression) (79), (82), (99).

Par ailleurs, les AGPI tel AA, DHA, EPA sont très importants pour plusieurs fonctions biochimiques et physiologiques, dont la synthèse d'AA et EPA avec DHA se fait in vivo par de saturation et élongation de l'acide linoléique et l'acide α - linoléique respectivement (144).

Les acides AA et EPA sont les précurseurs des produits métaboliques connu par des eicosanoides (prostaglandines, thromboxanes et leukotriènes). L' AA est le précurseur de série 2 de prostanoides (prostaglandines et thromboxanes), et le leukotrienes de série 4. Par contre EPA est le précurseurs des prostanoides de sèrie 3 et les leukotrienes de sèrie 5. (179), (196), (64).

En général, les eicosanoides formés par AGPI n-3 sont biologiquement moins active que celles formés par AGPI n-6. (5), (64), (73).

En effet, les prostaglandines (PG) exercent une grande action sur les fonctions des cellules comme des hormones locales, ainsi ils peuvent présenter simultanément des actions cytoprotectives et genoprotectives (162).

Pour cela, l'équilibre entre AGPI n-6 et AGPI n-3 et la régulation de la production des eicosanoides par l'alimentation des acides gras reste le domaine de recherche la plus important pour la future. (176).

Les mécanismes impliqués dans la développement du diabète sucré par les acides gras n'est pas complètement claire. (151). Il est suggère que le diabète sucré résulte des altérations significatives dans la composition en acides gras membranaire des lymphocytes T, qui jouent un rôle central dans l'initiation, et la régulation des réponses immunitaires, ce changement peut altérer la fluidité membranaire, la distribution des récepteurs, et les fonctions de ces cellules. (180).

En effet, la composition en acides gras du membrane cellulaire reste un facteur important qui peut influencer l'action d'insuline sachant que les propriétés physicochimique de cette membrane sont largement déterminés par la nature des acides gras dans les phospholipides qui peuvent influencer la

réponse des cellules aux hormones, par exemple, il est démontré que l'augmentation du contenu membranaire en AGPI peut augmenter la fluidité membranaire et le nombre des récepteurs d'insulines ainsi que l'action d'insuline (125), (40).

Les altérations fonctionnelles et membranaires des lymphocyte T au cours du diabète, nous nous sommes proposé d'essayer à évaluer l'effet de chaque acides gras polyinsaturés seul ou combinés (DHA, EPA, AA) sur la lymphoprolifération des cellules T, la production d'IL-2 et sur la composition en acides gras au niveau des différentes fractions membranaires (PL, TG, EC) chez les témoins et les diabétiques de type 1 et type 2.

MATERIELS ET METHODES

I- prélèvement sanguins

Les prélèvement du sang se font à jeune et ceci au niveau de la veine du pli du coude de notre population précisément décrit en chapitre I.

Un volume de 10 ml du sang est recueilli dans un tube hépariné (héparinate de sodium 40 μ l / 10 ml du sang). (les expériences se déroulent dans des conditions strictement stériles) .

II- Isolation et viabilité des lymphocytes

La méthode d'isolement des lymphocytes est une adaptation de la méthode décrit par Hay et Westwood (2002). Cette méthode consiste à mettre dans un tube stérile, 20 ml du sang dilué au moitié par une solution saline équilibré de Hank sur 10 ml d'isolymp (Norway); qui a une densité élevée que celle de lymphocyte ; et sans mélanger les 2 phases.

Après une centrifugation à 800g pour 20min, la couche supérieure correspondant au plasma à été éliminé par une pipette de pasteur stérile ensuite les lymphocytes sont récupérés sous forme d'un anneau à l'interface d'isolymp dans un autre tube. Le lavage des lymphocytes se fait 3 fois en ajoutant 10 ml du solution de Hank et centrifuger à 250 g pendant 15 min.

Le culot obtenu du dernière lavage est dissout dans 1 ml du milieu du culture RPMI (1640) contenant (2mM de L-glutamine, 20mM Hepes, 10% fetal calf serum, 200 μ g/ml de gentamicine comme un antibiotique et 25 μ g/ml d'amphotericine B comme un antifongique).

Pour tester la viabilité des cellules isolés, on procède comme suit:

Un volume de 25ml du suspension cellulaire est mélangé avec 100 μ l d'une solution de bleu trypane 0.4 %; colorant permettant de distinguer les cellules vivantes et la numération cellulaire est effectuée

sur le chambre de cunningham (witeg co., Allemagne) ensuite, la concentration des lymphocytes a été ajustée à 2×10^6 cellule/ml. (2).

III- culture in vitro des lymphocytes

La prolifération des lymphocytes est un technique in vitro généralement utilisé pour évaluer l'immunité cellulaire où nombreuses substances sont utilisés pour estimer l'activation et la prolifération des lymphocytes. (167)

La culture est réalisé sur une plaque Elisa de 96 puits à fond plat en ajoutant 150 μ l d'une suspension cellulaire ajustée aux 2×10^6 cellules/ml et 30 μ l de chaque substance a tester et le volume est complété à 300 μ l (volume final/puit) par le milieu du culture RPMI 1640 (Applichem GmbH, Darmstadt).

La plaque est incubé à 37°C dans un atmosphère d'humidité de 95% et 5% CO₂ pour (72 heures) .

IV- détermination de la prolifération lymphocytaire par la méthode de MTT

Cette méthode colorimétrique est basé sur la capacité des enzymes mitochondriales dans les cellules vivantes de transformer les sels de tetrazoluim (couleur jaune) en produits de formazan (couleur bleu)

La solution de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol -2-yl)-2,5 diphenyle tetrazoluim bromide) (sigma , USA) est préparé en dissolvant 5 mg de MTT en 1 ml de tampon phosphate saline (pH 7.2) puis filtrée et stérilisée dans un filtre à membrane de 0.20 μ m. (cette solution se gardé en 4°C à l'obscurité).

A la fin de l'incubation des lymphocytes, 10 μ l d'une solution de MTT sont ajoutés à 100 μ l du milieu pour chaque puit ; ensuite incuber la plaque à 37°C, 5% CO₂ pendant 4 heures .

A la fin de la période d'incubation, on centrifuge la plaque à 90g pendant 10 min et puis on élimine le milieu en inversant rapidement la plaque, après ça, on ajoute 100µl d'isopropanol acide (0.04N Hcl/isopropanol) pour dissoudre le produit de formazan bleu. La lecture de densité optique se fait par lecteur Elisa à 580 nm (130), (167).

L'indice de prolifération est calculé comme suit :

$$PI = \frac{\text{Densité optique du cellules stimulés}}{\text{Densité optique du cellules non stimulés}}$$

V- Détermination des paramètres nécessaires à la prolifération lymphocytaire

1-Evaluation de la concentration du Concanavaline A

Afin d'optimiser la prolifération des lymphocytes dans une culture in vitro, on a testé des différentes concentrations de con A (0-10-20-30-40-50-60 µg/ml).

Le même protocole de prolifération des lymphocytes est utilisé.

La méthode de MTT est utilisée pour déterminer l'indice de prolifération.

2-Évaluation de la concentration d'insuline

la concentration optimale d'insuline (Monotard[®]HM, Novo Nordisk, Denamark) a été déterminé en mesurant l'indice de prolifération aux différentes concentrations d'insuline (0-5-10-20-30-40-50 µg/ml) et 30 µg/ml de con A.

3-Evaluation de la concentration de DHA

Afin de déterminer l'effet de la concentration de l'acide docosahexaénoïque sur la prolifération cellulaire, on fait réagir des différentes concentrations du DHA (0-5-10-20-30-40-50-60 μM) avec 150 μl d'une suspension cellulaire et 30 μl de con A.

A la fin de l'incubation des lymphocytes (72 heures), 10 μl d'une solution de MTT sont ajoutés à 100 μl du milieu pour chaque puit ; ensuite incuber la plaque à 37°C, 5% CO_2 pendant 4 heures .

A la fin de la période d'incubation, on centrifuge la plaque à 90g pendant 10 min et puis on élimine le milieu en inversant rapidement la plaque, après ça, on ajoute 100 μl d'isopropanol acide (0.04N Hcl/isopropanol) pour dissoudre le produit de formazan bleu.

La lecture de densité optique se fait par lecteur Elisa à 580 nm
L'indice de prolifération est calculé comme il est décrit précédemment.

VI- Détermination l'influence de différentes acides gras polyinsaturés sur la prolifération du lymphocyte T

Les lymphocytes T sont incubés en présence ou non de 30 μl con A (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 30 μl d'insuline (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et/ou des acides gras polyinsaturés de la série n-3; l'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et de la série n-6 ; l'acide arachidonique (AA) ; à des concentration finales de 40 μM afin d'évaluer leurs effets sur la prolifération des lymphocytes

Les acide gras sont additionnés aux milieux de culture d'une façon individuel ou combinée comme suit :

- Puit 1 : 150 µl lymphocyte + 150 µl RPMI 1640
puit 2 : 150 µl lymphocyte + 30µl con A + 120 µl RPMI
Puit 3 : 150 µl lymphocyte+ 30 µl con A +30 µl insuline + 90 µl RPMI
Puit 4 : 150 µl lymphocyte + 30 µl con A + 30 µl DHA + 90 µl RPMI
Puit 5 : 150 µl lymphocyte + 30 µl conA +30 µl EPA + 90 µl RPMI
Puit 6 : 150 µl lymphocyte + 30 µl con A + 30 µl AA + 90 µl RPMI
Puit 7 : 150 µl lymphocyte +30 µl con A + 30 ul (40 µM DHA + 40 µM EPA)+ 90 µl RPMI
Puit 8 : 150 µl lymphocyte + 30µl con A + 30 µl (40 µM DHA + 40 µM EPA)+30 µl insuline +60 µl RPMI
Puit 9 : 150 µl lymphocyte + 30 µl con A + 30µl (40 µM DHA + 40 µM EPA+ 40µM AA) + 90 µl RPMI
Puit 10 : 150 µl lymphocyte + 30 µl con A + 30 µl (40 µM DHA + 40 µM EPA+ 40 µM AA)+ 30 µl insuline + 60 µl RPMI

La plaque est incubé à 37 ° C , 5% CO₂ pendant 72 heures.

A la fin du période d'incubation, 100µl de chaque puit se transfert à une autre plaque pour testé l'indice de prolifération par la méthode de MTT

Le reste des cellules de la première plaque à été collecté après le lavage du plaque 3 fois en milieu de culture RPMI (1640) .

Ensuite, on centrifuge à 1000 g pendant 10 min pour séparer le culot qui contient les lymphocyte du surnageant qui contient l'IL-2 .

Remarque : chaque essai a été répété 3 fois.

VI.1- Dosage d'interleukine 2 (IL-2) dans le milieu du culture :

Ce dosage se fait selon le protocole du Kit ELISA (euroclone LTD, UK).

Le principe consiste à adsorber les anticorps polyclonal spécifique au IL-2 sur les puits du plaque et puis les blancs , les étalons et les échantillons sont additionnés à leurs puits appropriés

Au cours de la 1^{ère} incubation, l'IL-2 sont et les anticorps monoclonals conjugués à la biotine spécifique au IL-2 simultanément incubés. Après le lavage, on ajoute l'enzyme de streptavidin – peroxydase.

Après l'incubation et le lavage, qui élimine tout les enzymes non liées, une solution de substrat est ajoutée pour réagir avec les enzymes liés, ce qui donne un produit coloré où son intensité est proportionnelle à la concentration d'interleukine-2 présente dans l'échantillon .

Le protocole de travail est réalisé comme suit :

- 1- ajouter 100µl de la solution du blanc; étalons, échantillons (surnageant du milieu de culture) dans leurs puits appropriés .
- 2- ajouter 50µl de la solution du anticorps conjugué aux biotines dans chaque puit; ensuite recouvrir et incuber la plaque pendant une heure à température ambiante .
- 3- le lavage du plaque se fait 3 fois par une solution de lavage .
- 4- mettre 100µl de la solution du streptavidine-HRP à chaque puit
- 5- recouvrir et incuber pendant 30 min à température ambiante .
- 6- faire le lavage pour 3 fois
- 7- ajouter 100 µl d'une solution de substrat (TMB) dans chaque puit et incuber dans l'obscurité pour 15 min à température ambiante .
- 8- à la fin d'incubation, ajouter 100µl de H₂SO₄ (6 N) pour arrêter la réaction enzyme – substrat .
- 9- la lecture de DO se fait dans le lecteur d'Elisa à 450 nm.
- 10- la concentration d'IL-2 est déterminé à l'aide du courbe d'étalonnage.

VI.2-Composition en acides gras des phospholipides, triglycérides et esters de cholestérol membranaires

Les lymphocytes T obtenus de la centrifugation servent à déterminer la composition en acides gras des PL, TG et EC membranaires, l'extraction des lipides se fait selon la méthode du Bligh et deyer (1959) dont les débris membranaires sont homogénéiser avec une solution de chloroforme / méthanol / NaCl 2 M (1/1/0.9,V/V/V) avec 0.01 % (P/V) BHT comme un antioxydant.

La phase de chloroforme qui contient les lipides est aspiré.

La séparation des lipides totaux se fait par chromatographie sur couche mince (CCM) unidimensionnel.

Cependant, l'extrait lipidique est déposé sur la plaque du gel de silice (G 60, Merck, Allemagne) et la migration se fait grâce à un mélange d'hexane, éther diéthylique et acide acétique (90/30/1,V/V/V).

Après la migration, la révélation se fait grâce aux vapeurs d'iode. Chaque fraction a été gratté et récupères dans un tube en verre.

La détermination du composition en acide gras de chaque fraction se fait par la chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Pour cela, on ajoute à chaque fraction 50µl d'étalon (acide heptadécaénoïque C17:0 dilué dans le benzène à 2 mg /ml).

les acides gras sont saponifiés grâce l'addition de 1 ml du NaOH méthanolique 0.5 N et les incuber à 80 °c pendant 15 min.

Après refroidissement; les acides gras sont méthylés par 2 ml de bromotrifluoromethanol (BF3) et les incuber à 80°c pendant 15 min.

Après refroidissement; on ajoute 2ml de NaCl saturé (35g/100ml H₂O). L'extraction des différentes acides gras se fait par 2 ml d'hexane.

L'extrait d'hexane est concentré par un courant d'azote puis injecter dans l'appareil du chromatographie en phase gazeuse qui est équipée avec un colonne capillaire de 30m de longueur et 0.25 mm de diamètre interne, rempli du omegawax 250 (supelco, PA)

L'identification des acides gras est réalisée par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux de standard (supelco, PA).

La surface de pic d'acide gras est proportionnelle à sa quantité.

VI- ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats obtenus sont exprimés sous forme de moyenne \pm ES (standard erreur). Après analyse de variance, la comparaison des moyennes en intra et intergroupe chez les diabétiques et les témoins est réalisée par le test « t » de student. On utilise le test « t » indépendant pour comparer entre les diabétiques et les témoins d'une part et entre les diabétiques de type 1 et de type 2 d'autre part.

La comparaison des différentes incubations dans la même groupe avec leur témoin (intragroupe) se fait avec paired « t » test .

La valeur P est significativement différentes quand $P < 0.05$.

Tous les analyses sont réalisés à l'aide d'un programme statistique informatisé SPSS (Chicago, 2001, USA).

RESULTATS ET INTERPRETATION

I- Détermination de quelques paramètres de culture des lymphocytes

1- Optimisation de la concentration en con A

Pour évaluer l'effet de la con A sur la prolifération des lymphocytes T, nous avons fait incuber ces lymphocytes à différentes concentrations de con A (0-10-20-30-40-50-60 $\mu\text{g/ml}$).

L'évolution de l'indice de prolifération (PI) en fonction de la concentration de con A a été représentée sur la figure II.1.

Cette figure indique que PI augmente proportionnellement avec la concentration en mitogène jusqu'à atteindre un maximum pour une concentration en con A de 30 $\mu\text{g/ml}$; au-delà de cette concentration la PI diminue.

2- Optimisation de la concentration en insuline

Nous avons étudié ainsi l'influence des différentes concentrations en insuline sur la prolifération cellulaire des lymphocytes T (0-5-10-20-30-40-50 $\mu\text{g/ml}$).

les résultats obtenus sont représenté sur la figure II.2. Ces résultats ont montré que l'indice de la transformation lymphocytaire augmente au maximum avec une concentration d'insuline d'environ de 20 $\mu\text{g/ml}$ puis il commence à se stabiliser.

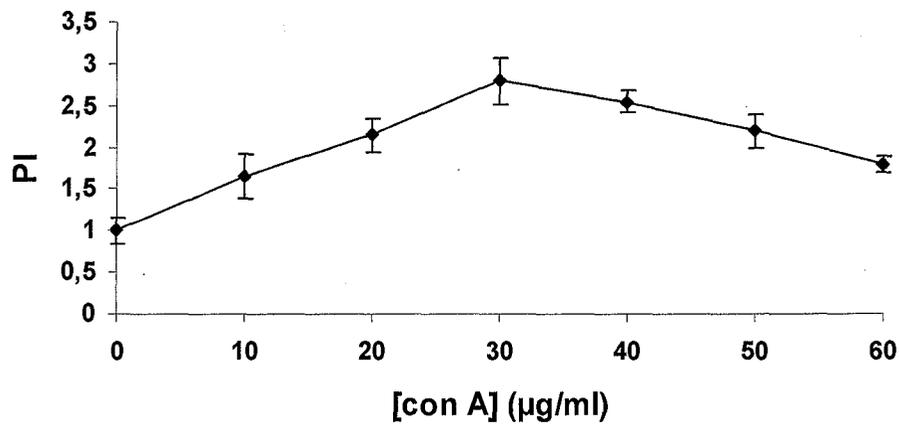


Figure II.1: Effet de la concentration en con A sur l'indice de la prolifération (PI) des lymphocytes T

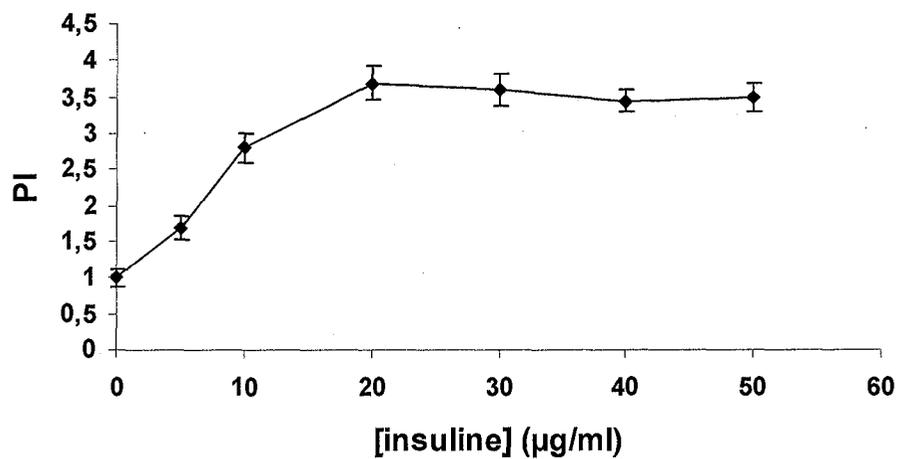


Figure II.2: Effet de la concentration en insuline sur l'indice de la prolifération (PI) des lymphocytes T

3- Optimisation de la concentration en acide docosahexaénoïque

L'effet de la concentration en acide docosahexaénoïque (DHA) sur l'indice de prolifération du lymphocyte T est étudié en effectuant des essais à diverses concentrations en DHA (0-5-10-20-30-40-50-60 μM).

La figure II.3 montre que l'acide docosahexaénoïque diminue le PI et cette diminution est plus marquée quand la concentration de DHA s'élève jusqu'à arriver à l'inhibition maximale avec 60 μM .

On a choisi une concentration en DHA de 40 μM , qui nous permet d'observer l'influence des acides gras polyinsaturés sur le PI et en même temps nous permet d'obtenir un amas cellulaire considérable pour les ultérieures expériences.

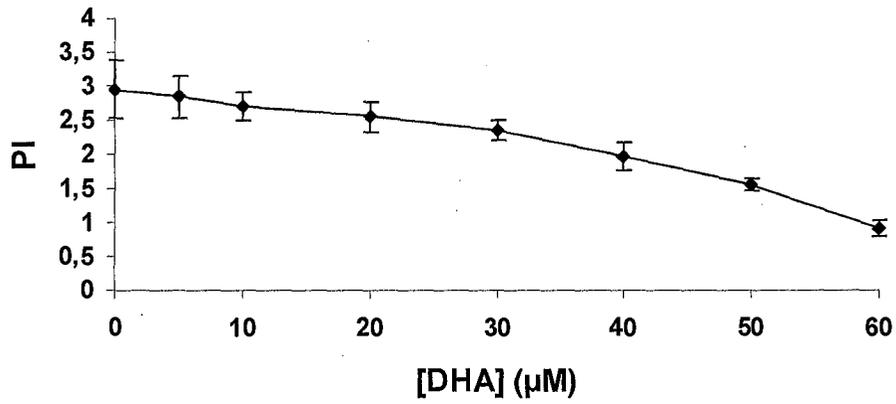


Figure II.3: Effet de la concentration en acide docosahexaénoïque sur l'indice de la prolifération (PI) des lymphocytes T

II-Détermination de l'indice de prolifération lymphocytaire par la méthode colorimétrique MTT

Dans cette partie, l'activité proliférative des lymphocytes (T) des témoins et diabétiques (type 1 et 2) a été déterminé en présence ou absence du con A, insuline, acide docosahexaénoïque (DHA), acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide arachidonique sous forme individuel ou combiné.

1- Evaluation de la prolifération basale des lymphocytes T

La figure II.4 montre qu'il n'y a pas une différence significative entre les PI des témoins et diabétiques de type 1 et 2 dans la culture initiale des lymphocytes T (en absence d'agent mitogène).

2- Effet de la con A sur la lymphoprolifération

L'addition du con A au milieu de culture permet d'augmenter significativement les indices de prolifération chez les témoins et les deux types de diabètes ($P < 0.05$) comparés aux ceux en absence de con A (tableau II.1).

La comparaison entre différents groupes montre que le con A augmente le PI des témoins à 29 fois puis les DNID à 22 fois et les DID à 14 fois que celle de culture basale.

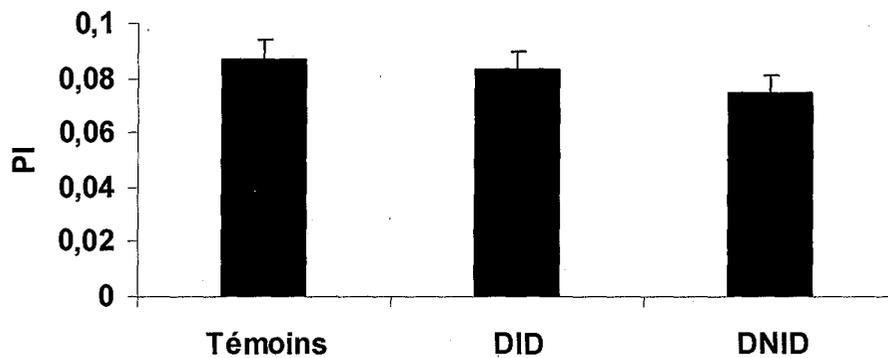


Figure II.4: Valeurs moyennes de l'indice de la prolifération (PI) des lymphocytes T dans la culture initiale chez les témoins, DID et DNID

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ $p < 0.05$: différence significatif entre les témoins et diabétiques.

$p < 0.05$: différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

Tableau II.1: Effet de la con A sur la lymphoprolifération

	Sans con A	Avec con A
Témoins	0.087±0.007	2.53±0.21 *
DID	0.083±0.007	1.3±0.04 *
DNID	0.075±0.006	1.66±0.12 *

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

*p < 0.05 : différence significatif entre les incubations de même groupe (intragroupe).

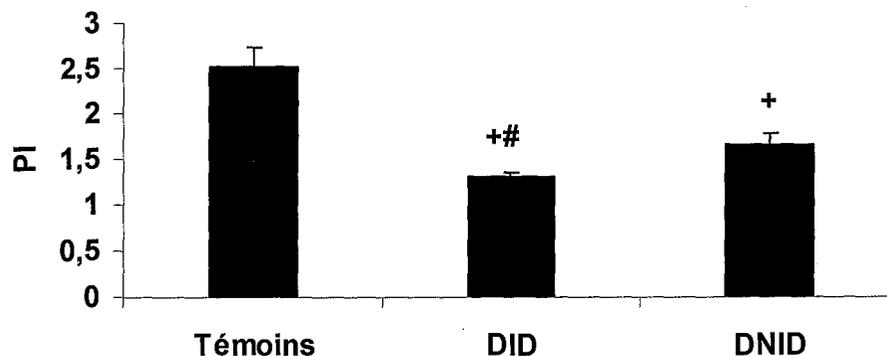


Figure II.5: Effet de la con A sur l'indice de prolifération (PI) des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ p < 0.05 : différence significatif entre les témoins et diabétiques.

p < 0.05 : différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

3- Effet d'insuline sur l'indice de prolifération

Une augmentation significative du PI a été observé chez les DNID et les témoins lors l'addition d'insuline en milieu de culture comparé à puit 2 (avec con A).

Les résultats obtenus sont représentés sur le tableau II.2.

La figure II.6 montre une différence significative entre les diabétiques et les témoins dont l'insuline stimule la lymphoprolifération à 26 % chez les témoins, 22 % chez les DID et 19 % chez les DNID.

4- Effet du AGPI n-3 sur la prolifération lymphocytaire

L'incubation des lymphocytes T avec les acides gras polyinsaturés de série n-3 inhibe l'indice de prolifération à des degrés différents, dont la grande inhibition est observée avec EPA (47 %) et DHA (19 %) chez les témoins tandis que chez les DID, l'inhibition avec EPA est 26 % et avec DHA est 9 %, ainsi, les DNID montrent une grande inhibition avec EPA (39 %) puis DHA (13%) comparé aux cultures sans acides gras (puit 2).

Le tableau II.3 montre que l'addition d'EPA au milieu de culture inhibe significativement l'indice de prolifération chez tous les groupes des témoins, DID et DNID en comparant à leurs correspondances dépourvue du EPA (puit 2) tandis que l'addition du DHA inhibe significativement le PI chez les témoins. De plus, une différence significative a été observée chez les témoins et les diabétiques ainsi que entre les DID et les DNID avec l'incubation du DHA. Par contre, avec

EPA une diminution significative de PI a été observé chez les diabétiques comparés aux témoins. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure II.7.

Tableau II.2: Effet de l'insuline sur la lymphoprolifération

	+ con A	+ Insuline	Degré de stimulation (+)
Témoins	2.53±0.21	3.2±0.25 *	+26%
DID	1.3±0.04	1.59±0.59	+22%
DNID	1.66±0.12	1.98±0.11 *	+19%

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

*p < 0.05 : différence significatif entre les incubations de même groupe (intragroupe).

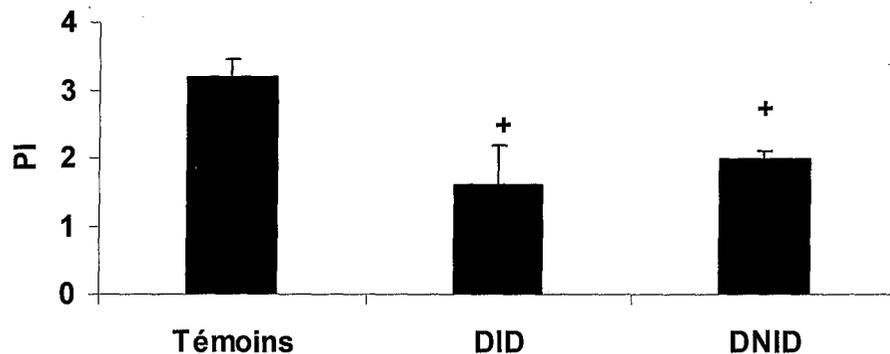


Figure II.6: Effet de l'insuline sur l'indice de prolifération (PI) des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ p < 0.05 : différence significatif entre les témoins et diabétiques.

p < 0.05 : différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

Tableau II.3: Effet du AGPI n-3 sur la lymphoprolifération

	+ con A	+DHA	+EPA	Degré d'inhibition (-) par DHA	Degré d'inhibition (-) par EPA
Témoins	2.53±0.21	2.05±0.15*	1.33±0.08*	-19%	-47%
DID	1.3±0.04	1.18±0.05	0.95±0.04*	-9%	-26%
DNID	1.66±0.12	1.45±0.07	1.01±0.06*	-13%	-39%

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

*p < 0.05 : différence significatif entre les incubations de même groupe (intragroupe).

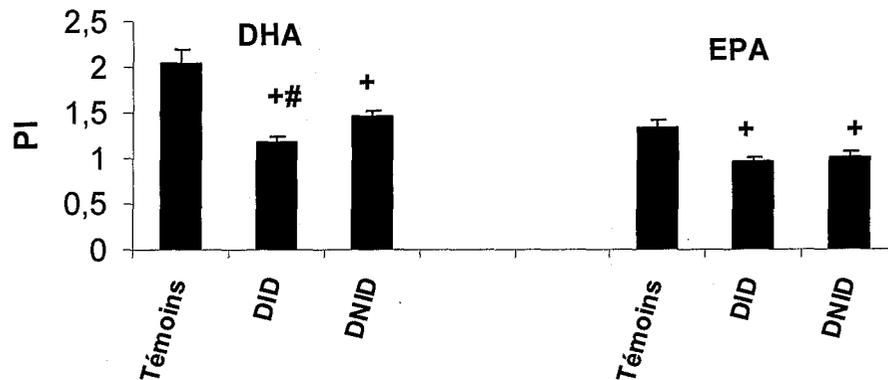


Figure II.7: Effet du DHA et EPA sur l'indice de prolifération (PI) des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ p < 0.05 : différence significatif entre les témoins et diabétiques.

p < 0.05 : différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

5- Effet du AGPI n-6 sur la prolifération lymphocytaire

l'addition d'acide arachidonique (AA) au milieu de culture inhibe significativement la réponse proliférative chez tous les groupes de témoins et des deux types de diabète comparé à ceux sans acides gras (puit 2). Les résultats obtenus sont représentés sur le tableau II.4.

La figure II.8 montre que la réponse de prolifération cellulaire est significativement différente entre les témoins et les diabétiques de type 1 et de type 2 dont cette différence n'apparaît pas entre les deux types de diabète.

Il est noté que l'AA inhibe le PI du témoins à 37 %, du DNID à 29 % et du DID à 18%.

6- Effet du AGPI n-3 combiné et du AGPI n-3 et n-6 combiné sur l'indice de prolifération

la combinaison entre EPA et DHA inhibe significativement le PI chez tous les groupes étudiés comparés au celle en absence d'acides gras (puit 2). Le même effet a été observé avec la combinaison entre AGPI n-3 et AGPI n-6.

Les résultats obtenus sont représentés sur le tableau II.5.

De plus, une diminution significative du PI a été observé chez les diabétiques de type 1 et 2 par rapport aux témoins. (Figure II.9).

Tableau II.4: Effet du AGPI n-6 sur la lymphoprolifération

	+ con A	+ AA	Degré d'inhibition (-)
Témoins	2.53±0.21	1.6±0.05*	-37%
DID	1.3±0.04	1.06±0.04*	-18%
DNID	1.66±0.12	1.17±0.07*	-29%

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

*p < 0.05 : différence significatif entre les incubations de même groupe (intragroupe).

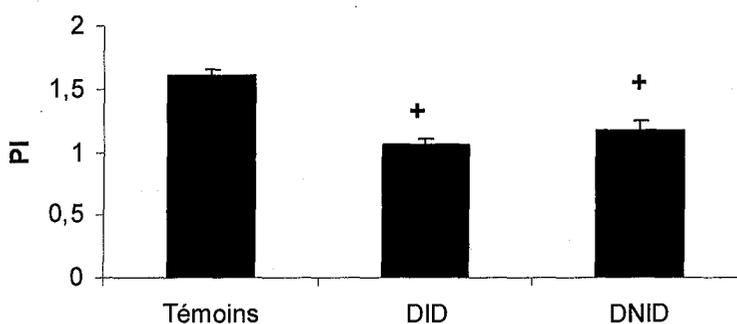


Figure II.8: Effet du AA sur l'indice de prolifération (PI) des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ p < 0.05 : différence significatif entre les témoins et diabétiques.

p < 0.05 : différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

Tableau II.5: Effet du AGPI n-3 combiné et AGPI n-3 et n-6 combinés sur la prolifération des lymphocytes T

	+ con A	+AGPI n-3 (DHA+EPA)	+AGPI n-3 et n-6 (DHA+EPA+AA)	Degré d'inhibition (-) par AGPI n-3	Degré d'inhibition (-) par AGPI n-3 et n-6
Témoins	2.53±0.21	1.56±0.08*	1.63±0.09*	-38%	-35%
DID	1.3±0.04	1.12±0.05*	1.14±0.08*	-13%	-12%
DNID	1.66±0.12	1.14±0.05*	1.18±0.06*	-31%	-28%

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

*p < 0.05 : différence significatif entre les incubations de même groupe (intragroupe).

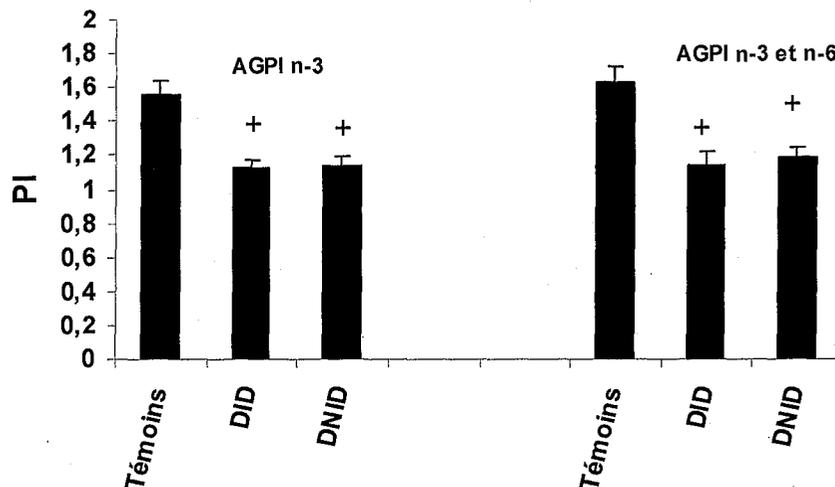


Figure II.9: Effet du AGPI n-3 combiné et AGPI n-3 et n-6 combinés sur l'indice de prolifération (PI) des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ p < 0.05 : différence significatif entre les témoins et diabétiques.

p < 0.05 : différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

7- Effet d'insuline sur le PI des AGPI combiné

L'addition d'insuline au milieu de culture altère l'effet inhibiteur du AGPI n-3 et/ou AGPI n-6 combiné sur le PI des différents groupes étudiés. Les résultats sont regroupés sur le tableau II.6.

Malgré ça, une diminution significative du PI a été observée entre les diabétiques (de type 1 et de type 2) et les témoins ainsi que entre les diabétiques eux-mêmes dont la diminution du PI est plus prononcée chez les DID par rapport aux DNID. (Figure II.10).

Tableau II.6: Effet d'insuline avec AGPI n-3 combiné ou AGPI n-3 et n-6 combinés sur la prolifération des lymphocytes T

	+ con A	+AGPI n-3 +Insuline	+AGPI n-3 et n-6 + Insuline	Degré d'inhibition (-) par AGPI n- 3+insuline	Degré d'inhibition (-) par AGPI n-3 et n- 6+insuline
Témoins	2.53±0.21	2.27±0.13	2.41±0.13	-10%	-4%
DID	1.3±0.04	1.19±0.07	1.23±0.09	-8%	-5%
DNID	1.66±0.12	1.53±0.06	1.59±0.05	-7%	-4%

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

*p < 0.05 : différence significatif entre les incubations de même groupe (intragroupe).

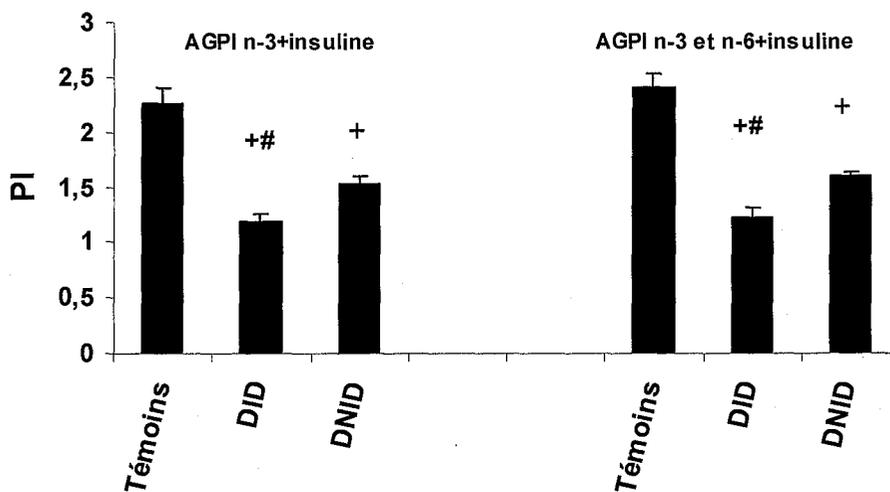


Figure II.10: Effet d'insuline avec AGPI n-3 combiné ou AGPI n-3 et n-6 combinés sur l'indice de prolifération (PI) des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ p < 0.05 : différence significatif entre les témoins et diabétiques.

p < 0.05 : différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

III- Détermination de la concentration en IL-2 synthétisée par les lymphocytes T à différentes incubations

1-Evaluation de la concentration en IL-2 produite par la culture initiale

Aucune différence significative n'a été observé entre les concentrations d'IL-2 produites chez les témoins et les diabétiques de deux types dans la culture initiale des lymphocytes par contre, une diminution significative du IL-2 produite chez les DID comparé au DNID (figure II.11).

2-Effet du Con A sur la production d'IL-2

le Con A augmentent significativement la concentration d'IL-2 chez tous les groupes témoins et diabétiques comparés à ceux en culture initiale; sachant que la production d'IL-2 s'augmente à 4,5 fois chez les témoins; 3,4 fois chez les DID et 3,6 fois chez les DNID (tableau II.7).

Une diminution significative du d'IL-2 produite a été observé chez les DID comparés aux témoins et aux DNID . (Figure II.12).

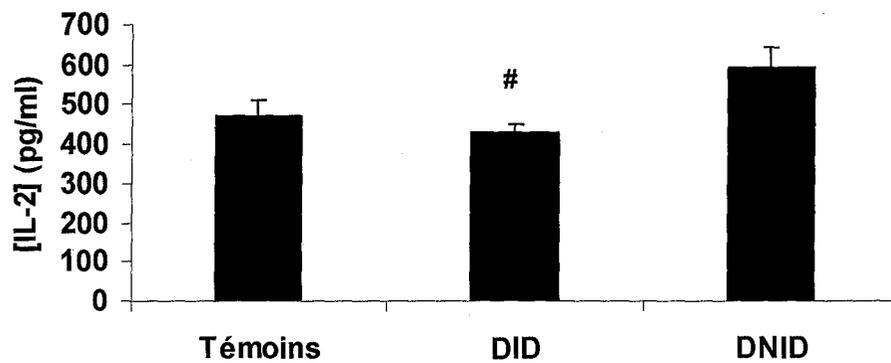


Figure II.11: Concentrations moyennes d'IL-2 produite par les lymphocytes T dans la culture initiale chez les témoins, DID et DNID

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ $p < 0.05$: différence significatif entre les témoins et diabétiques.

$p < 0.05$: différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

Tableau II.1: Effet de la con A sur la production d'IL-2

	Sans con A	Avec con A
Témoins	472±40.86	2150±178.25 *
DID	430.43±20.8	1488.64±86.26 *
DNID	595.54±50.15	2193.75±166.23*

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

*p < 0.05 : différence significatif entre les incubations de même groupe (intragroupe).

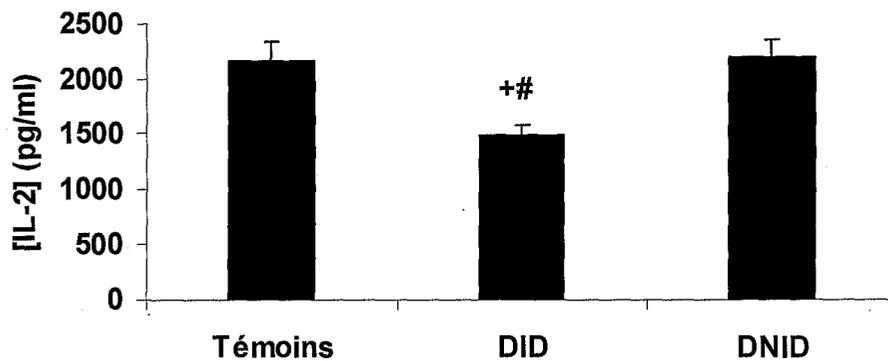


Figure II.12: Effet de la con A sur l'IL-2 produite par les lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ p < 0.05 : différence significatif entre les témoins et diabétiques.

p < 0.05 : différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

3-Effet d'insuline sur la production d'IL-2

une diminution significative du taux d'IL-2 produite en présence d'insuline a été observée chez les témoins. Les résultats obtenus sont présentés sur le tableau II.8.

Par contre, une augmentation significative du concentration d'IL-2 a été observé chez les DNID comparés aux témoins (figure II.13).

4-Effet du DHA sur la production d'IL-2

une diminution significative du concentration d'IL-2 produite en présence de DHA a été observé chez tous les groupes étudiés. Ces résultats sont représentés sur le tableau II.9.

De plus, une augmentation significative a été noté chez les DNID comparés au témoins et aux DID . (figure II.14).

Tableau II.8: Effet d'insuline sur la production d'IL-2

	+ con A	+ Insuline	Degré d'inhibition (-)
Témoins	2150±178.25	1612.5±128.01*	-25%
DID	1488.64±86.26	1420.55±500.81	-4.5%
DNID	2193.75±166.23	2006.75±120.24	-8.5%

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

*p < 0.05 : différence significatif entre les incubations de même groupe (intragroupe).

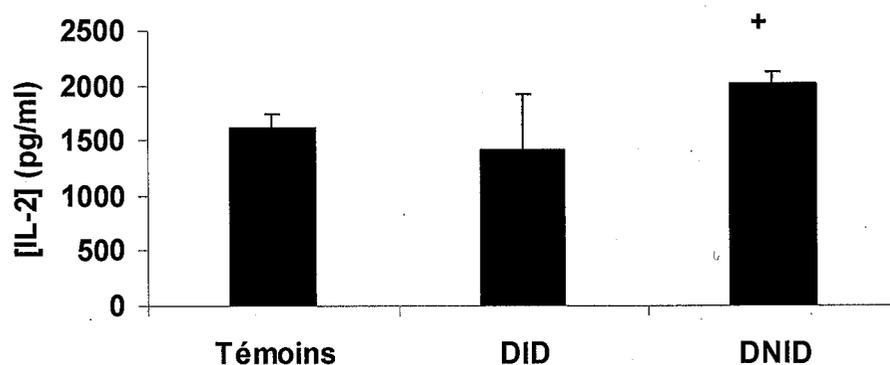


Figure II.13: Effet de l'insuline sur l'IL-2 produite par les lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ p < 0.05 : différence significatif entre les témoins et diabétiques.

p < 0.05 : différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

Tableau II.9: Effet du DHA sur la production d'IL-2

	+ con A	+DHA	Degré d'inhibition (-)
Témoins	2150±178.25	1368.73±102.62*	-36%
DID	1488.64±86.26	1171.29±92.41*	-21%
DNID	2193.75±166.23	1837.51±88.37*	-16%

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

*p < 0.05 : différence significatif entre les incubations de même groupe (intragroupe).

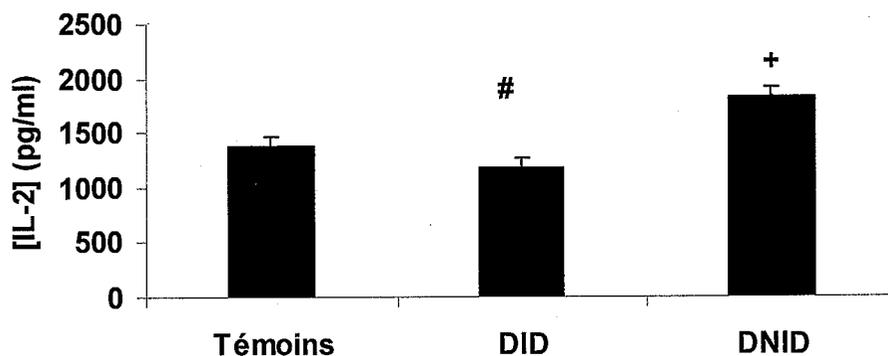


Figure II.14: Effet du DHA sur l'IL-2 produite par les lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ p < 0.05 : différence significatif entre les témoins et diabétiques.

p < 0.05 : différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

5-Effet du EPA sur la production d'IL-2

EPA inhibe significativement la production d' IL-2 chez les témoins et les DNID comparés au puit 2 (tableau II.10). Par contre, la concentration d'IL-2 chez les DNID est significativement élevée par rapport aux témoins et aux DID (figure II.15).

6-Effet d'AA sur la production d'IL 2

une diminution significative d'IL 2 produite chez tous les groupes étudiés en présence d'AA (tableau II.11).

Ainsi, une diminution significative a été observée entre les DID et DNID ainsi chez les témoins. (figure II.16).

La grande inhibition se fait avec les témoins (39 %) ensuite avec les DID (26%) et les DNID (23%).

Tableau II.10: Effet d' EPA sur la production d'IL-2

	+ con A	+EPA	Degré d'inhibition (-)
Témoins	2150±178.25	1462.49±95.92 *	-32%
DID	1488.64±86.26	1225.7±271.83	-18%
DNID	2193.75±166.23	1856.25±112.09 *	-15%

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

*p < 0.05 : différence significatif entre les incubations de même groupe (intragroupe).

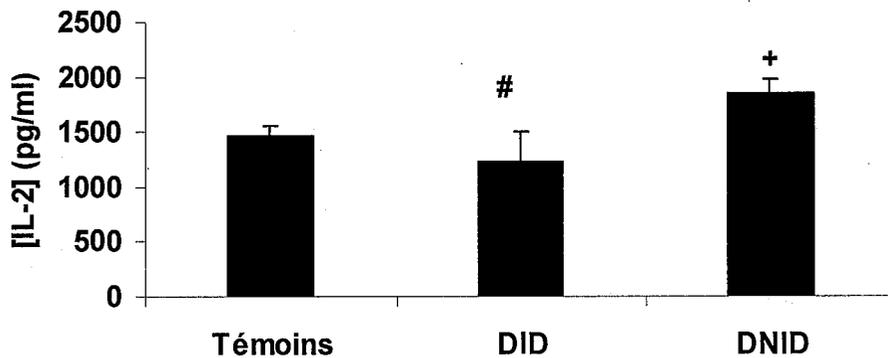


Figure II.15: Effet du EPA sur l'IL-2 produite par les lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ p < 0.05 : différence significatif entre les témoins et diabétiques.

p < 0.05 : différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

Tableau II.11: Effet d' AA sur la production d'IL-2

	+ con A	+AA	Degré d'inhibition (-)
Témoins	2150±178.25	1312.5±46.32 *	-39%
DID	1488.64±86.26	1102.59±65.03*	-26%
DNID	2193.75±166.23	1687.5±105.43*	-23%

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

*p < 0.05 : différence significatif entre les incubations de même groupe (intragroupe).

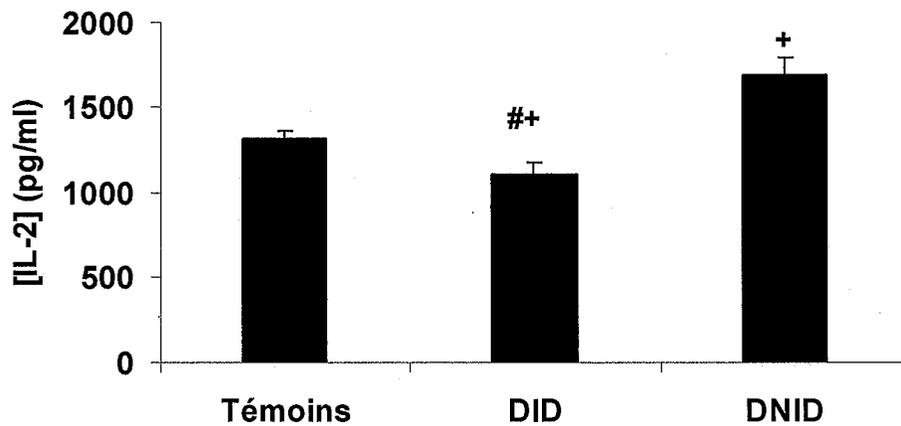


Figure II.16: Effet d' AA sur l'IL-2 produite par les lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ p < 0.05 : différence significatif entre les témoins et diabétiques.

p < 0.05 : différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

7-Effet du AGPI n-3 et/ou AGPI n-6 combiné sur la sécrétion d'IL 2

les AGPI n-3 et AGPI n-3 combiné avec AGPI n-6 diminue significativement le taux d'IL 2 chez tous les groupes étudiés comparés au puit 2 (tableau II.12).

Il est observé ainsi, qu'il y a une diminution significative en taux d'IL-2 produite chez les DID comparé aux témoins et au DNID (figure II.17).

8- Effet d'insuline avec les AGPI sur la production d'IL 2

une diminution significative d'IL-2 produite chez tous les groupes en comparant à puit 2 (tableau II.13). Ainsi, une diminution significative d'IL 2 produite a été observé chez les DID comparé aux témoins et au DNID (figure II.18).

Tableau II.12: Effet du AGPI n-3 combiné et AGPI n-3 et n-6 combinés sur la production d'IL-2

	+ con A	+AGPI n-3 (DHA+EPA)	+AGPI n-3 et n-6 (DHA+EPA+AA)	Degré d'inhibition (-) par AGPI n-3	Degré d'inhibition (-) par AGPI n-3 et n-6
Témoins	2150±178.25	1368.74±73.69*	1443.75±84.7*	-36%	-33%
DID	1488.64±86.26	1055.34±61.75*	1087.4±79.17*	-29%	-27%
DNID	2193.75±166.23	1443.74±68.15*	1668.75±96.43*	-34%	-24%

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

*p < 0.05 : différence significatif entre les incubations de même groupe (intragroupe).

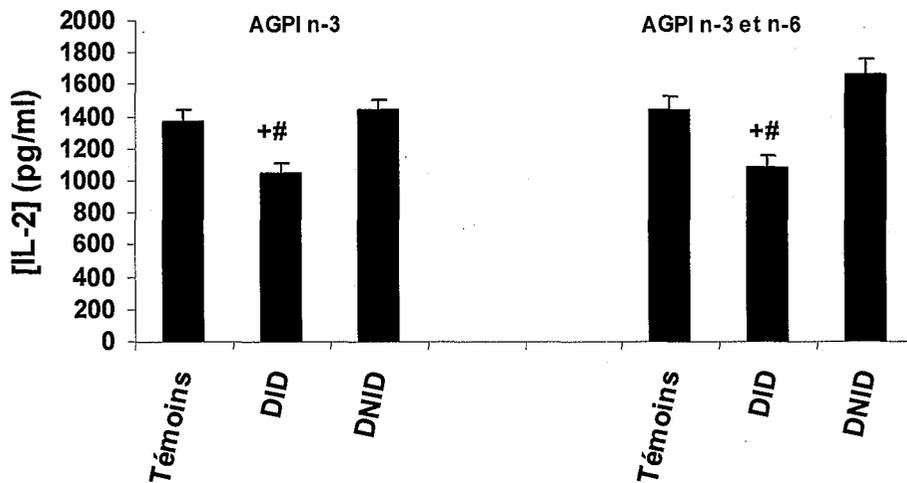


Figure II.17: Effet du AGPI n-3 combiné et AGPI n-3 et n-6 combinés sur l'IL-2 produite par les lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ p < 0.05 : différence significatif entre les témoins et diabétiques.

p < 0.05 : différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

Tableau II.13: Effet d'insuline avec AGPI n-3 combiné ou AGPI n-3 et n-6 combinés sur la production d'IL-2

	+ con A	+AGPI n-3 +Insuline	+AGPI n-3 et n-6 + Insuline	Degré d'inhibition (-) par AGPI n-3+insuline	Degré d'inhibition (-) par AGPI n-3 et n-6+insuline
Témoins	2150±178.25	1331.25±79.75*	1387.5±79.84*	-38%	-35%
DID	1488.64±86.26	1002.54±44.26*	1021.17±60.53*	-33%	-31%
DNID	2193.75±166.23	1406.25±56.22*	1481.24±54.86*	-36%	-32%

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

*p < 0.05 : différence significatif entre les incubations de même groupe (intragroupe).

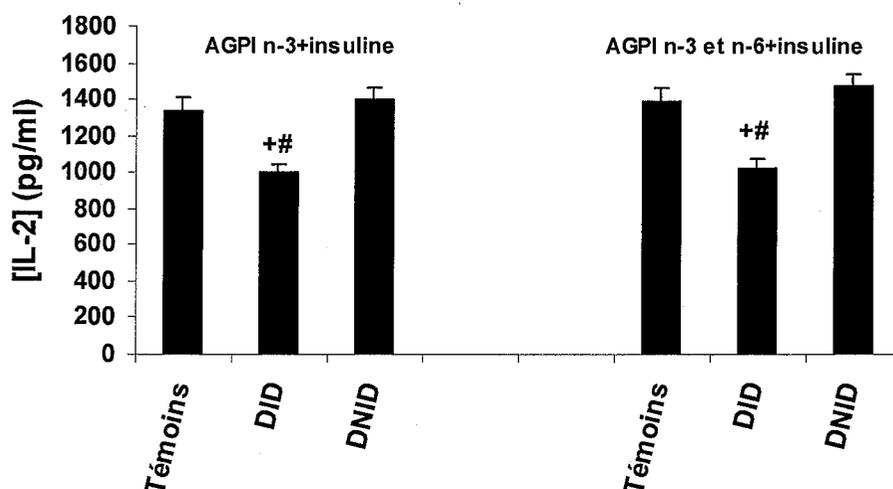


Figure II.18: Effet d'insuline avec AGPI n-3 combiné ou AGPI n-3 et n-6 combinés sur l'IL-2 produite par les lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Chaque valeur représente la moyenne ± ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ p < 0.05 : différence significatif entre les témoins et diabétiques.

p < 0.05 : différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

IV- Détermination de la composition en acides gras des membranes des lymphocytes

1-Au niveau du phospholipides (PL) membranaire

1.1- Effet du Con A

L'addition du Con A au milieu de culture augmente significativement l'acide α -linoléique chez les témoins en comparant aux cultures initiales. Ainsi le taux d'EPA augmente chez tous les groupes étudiés (Figure II.19). Par contre, une diminution significative de l'acide arachidonique, a été observée chez les DID comparé aux témoins ainsi une diminution significative a été noté de l'acide α -linoléique chez les DID comparés au DNID (Figure II.20). De plus, une diminution significative en l'acide arachidonique et l'acide eicosapentaénoïque a été observé chez les DNID par rapport aux témoins.

1.2- Effett du DHA

Les compositions en acides gras des lymphocytes incubés avec DHA montre une augmentation significative de la concentration en acide docosahexaénoïque membranaire comparé aux puit 2 chez tous les groupes étudiés (figure II.21).

Par contre, une diminution significative d'acide docosahexaénoïque a été observé chez les DID comparés au DNID et les témoins. De plus, cette diminution est observé avec l'acide arachidonique et l'acide eicosapentaénoïque chez les DID comparé aux témoins (figure II.22).

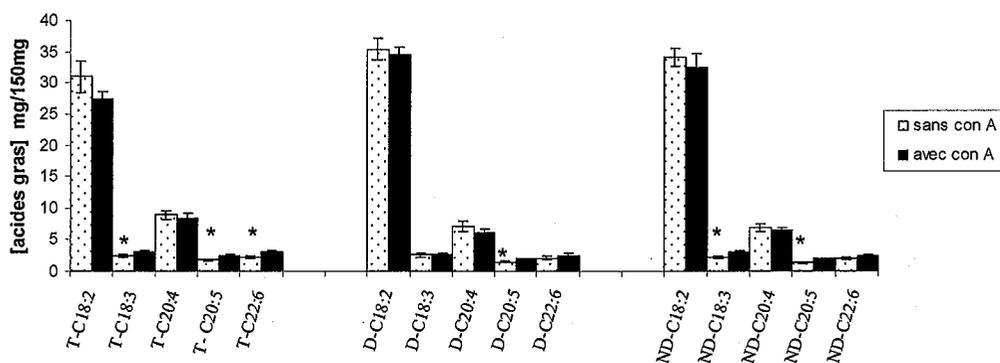


Figure II.19: Effet du con A sur les concentrations en acides gras des phospholipides membranaires des lymphocytes T chez les témoins (T), DID(d) et DNID (ND).

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

* $p < 0.05$: différence significatif entre les incubations de meme groupe (intragroupe).

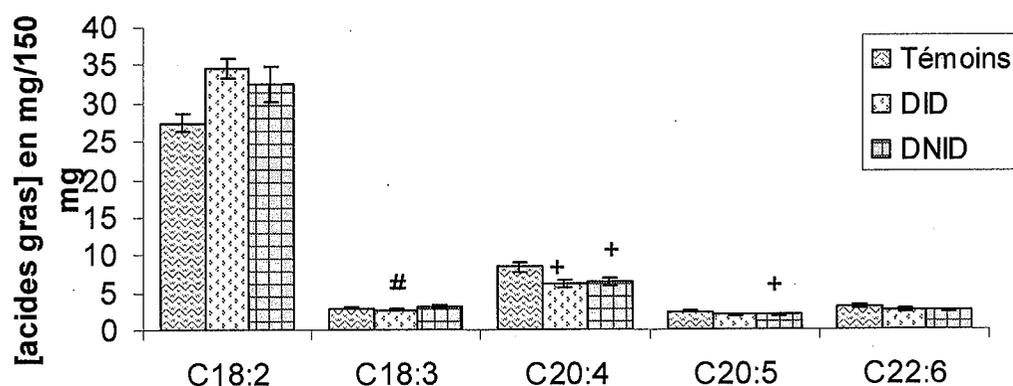


Figure II.20 : Effet du con A sur les concentrations en acides gras des phospholipides membranaires des lymphocytes T chez les témoins, DIDet DNID.

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ $p < 0.05$: différence significatif entre les témoins et diabétiques.

$p < 0.05$: différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

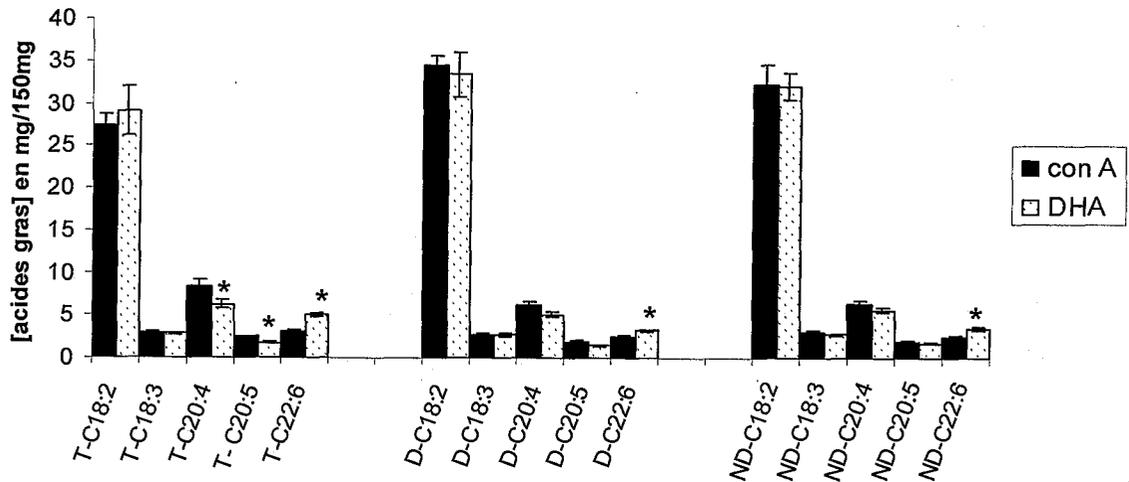


Figure II.21: Effet du DHA sur les concentrations en acides gras des phospholipides membranaires des lymphocytes T chez les témoins (T), DID(d) et DNID (ND).

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

* $p < 0.05$: différence significatif entre les incubations de meme groupe (intragroupe).

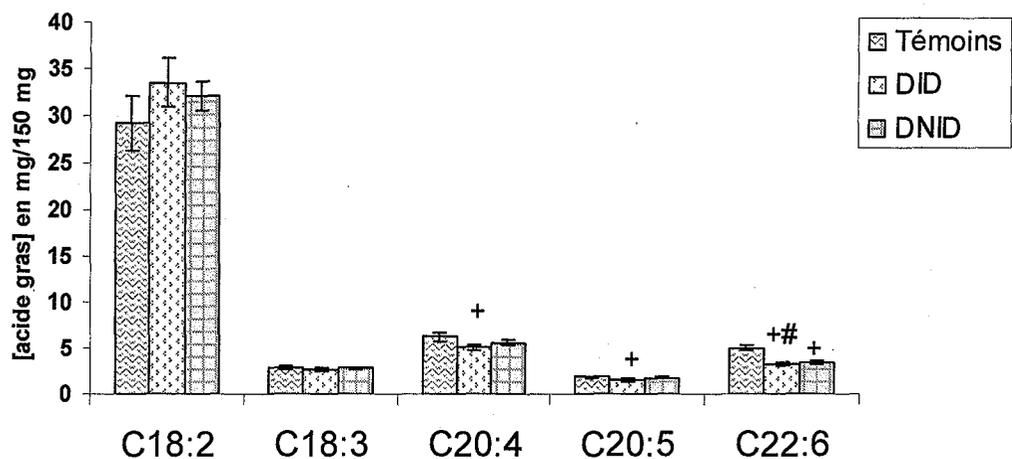


Figure II.22 :Effet du DHA sur les concentrations en acides gras des phospholipides membranaires des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ $p < 0.05$: différence significatif entre les témoins et diabétiques.

$p < 0.05$: différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

1.3 Effet du EPA

L'ajoute d'EPA au milieu de culture, augmente significativement le taux d'acide eicosapentaénoïque dans la membrane plasmique chez les témoins et de diabétique comparés à ceux sans acide gras (puit 2), (figure II.23). Ainsi, une diminution significative de l'acide arachidonique a été observé chez les DID et DNID comparés aux puit 2.

Une diminution significative de l'acide α -linoléinique, l'acide arachidonique, acide eicosapentaénoïque et l'acide docosahexaénoïque a été observé chez les DID comparés aux témoins (figure II.24) et avec l'acide arachidonique entre les DID et DNID.

De plus, une diminution significative de l'acide arachidonique et l'acide eicosapentaénoïque a été trouvé chez les DNID comparés aux témoins.

1.4 Effet d'AA

Une augmentation significative a été observée chez les témoins et les diabétiques au niveau de l'acide arachidonique lors des lymphocytes sont incubés avec l'AA comparé au puit 2 (figure II.25).

L'addition d'AA au milieu provoque une diminution significative du EPA au niveau de la membrane plasmique chez les diabétiques de type 1 et type 2.

De plus, une diminution significative de l'acide α -linoléinique, l'acide arachidonique, l'acide eicosapentaénoïque et l'acide docosahexaénoïque a été observé en comparant les DID avec les témoins tandis que la diminution est significative chez les DID au niveau d'acide docosahexaénoïque, comparés aux DNID (figure II.26).

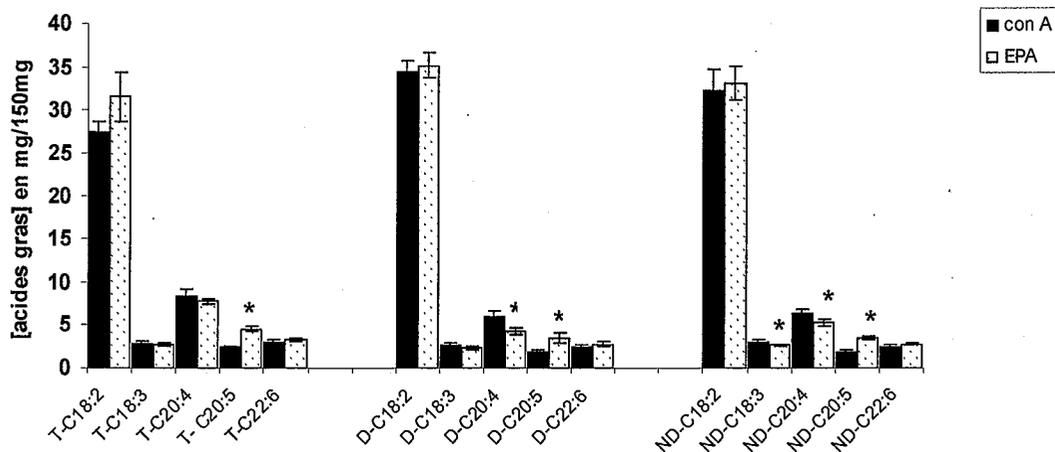


Figure II.23: Effet du EPA sur les concentrations en acides gras des phospholipides membranaires des lymphocytes T chez les témoins (T), DID(d) et DNID (ND).

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

* $p < 0.05$:différence significatif entre les incubations de meme groupe

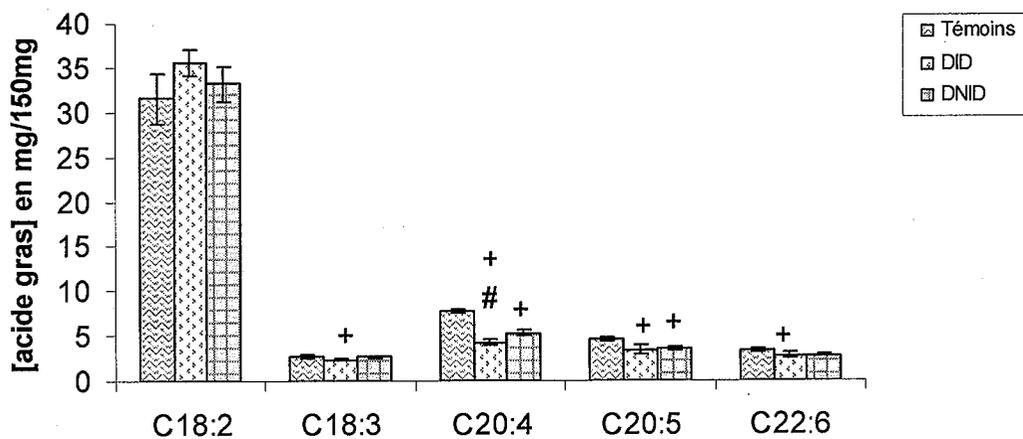


Figure II.24 :Effet du EPA sur les concentrations en acides gras des phospholipides membranaires des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ $p < 0.05$: différence significatif entre les témoins et diabétiques.

$p < 0.05$: différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

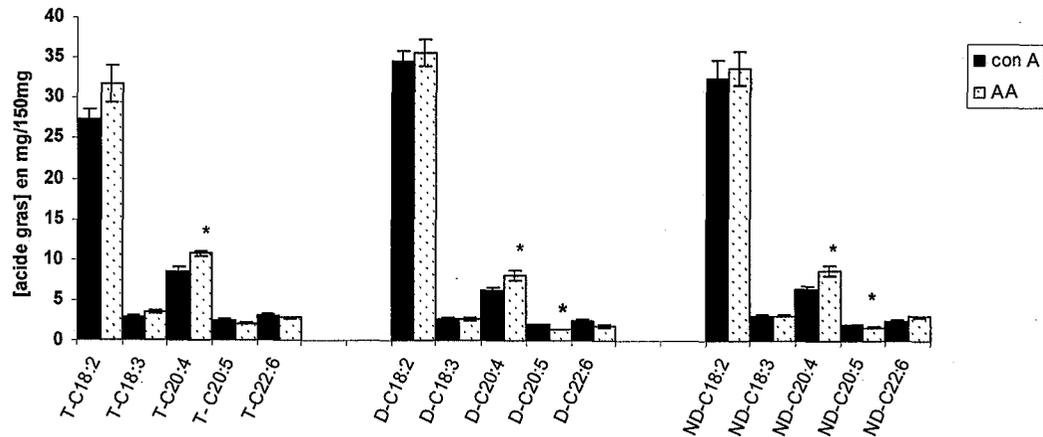


Figure II.25: Effet du AA sur les concentrations en acides gras des phospholipides membranaires des lymphocytes T chez les témoins (T), DID(d) et DNID (ND).

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

* $p < 0.05$: différence significatif entre les incubations de meme groupe (intragroupe).

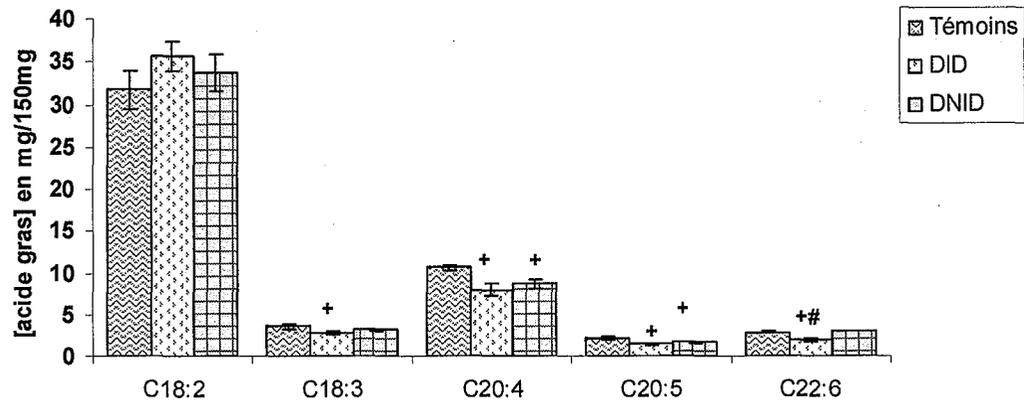


Figure II.26 :Effet du AA sur les concentrations en acides gras des phospholipides membranaires des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ $p < 0.05$: différence significatif entre les témoins et diabétiques.

$p < 0.05$: différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

2-Au niveau du triglycérides (TG) membranaire

1.1- Effet du Con A

L'addition du Con A au milieu de culture augmente significativement l'acide α -linoléique chez les témoins en comparant aux cultures initiales. Ainsi le taux d'EPA augmente chez tous les groupes étudiés (Figure II.27). Par contre, une diminution significative de l'acide arachidonique, l'acide eicosapentaénoïque et l'acide docosahexaénoïque a été observée chez les DNID et DID comparé aux témoins . De plus, une diminution significative de l'acide linoléique et l'acide arachidonique a été noté chez les DNID comparés aux DID (Figure II.28).

1.2- Effett du DHA

Les compositions en acides gras des lymphocytes incubés avec DHA montre une augmentation significative de la concentration en acide docosahexaénoïque membranaire comparé aux puit 2 chez tous les groupes étudiés (figure II.29).

Par contre, une diminution significative de l'acide arachidonique , l'acide eicosapentaénoïque et l'acide docosahexaénoïque a été observé chez les DID et DNID comparés aux témoins (figure II.30).

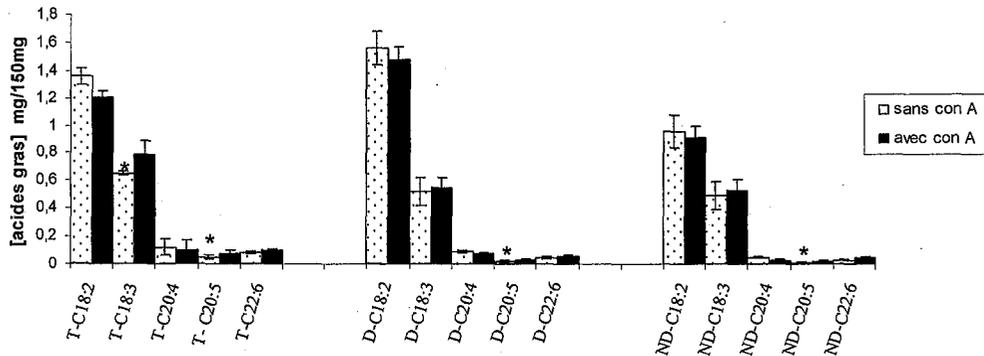


Figure II.27: Effet du con A sur les concentrations en acides gras des triglycerides membranaires des lymphocytes T chez les témoins (T), DID (d) et DNID (ND).

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

* $p < 0.05$: différence significatif entre les incubations de même groupe (intragroupe).

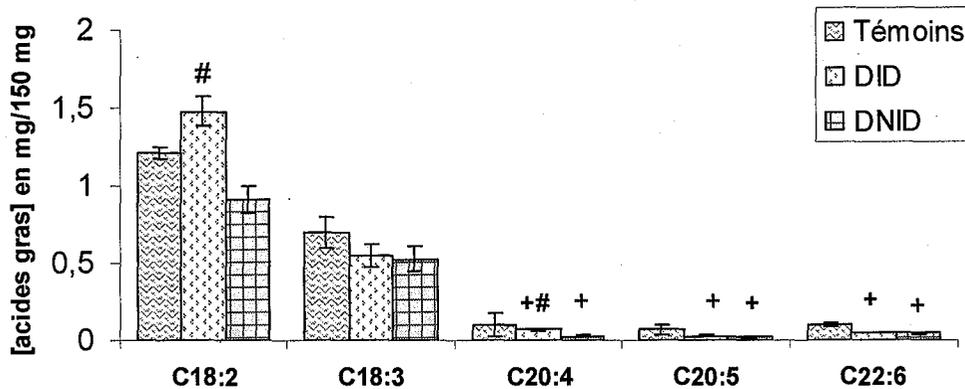


Figure II. 28: Effet du con A sur les concentrations en acides gras des triglycerides membranaires des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID.

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ $p < 0.05$: différence significatif entre les témoins et diabétiques.

$p < 0.05$: différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

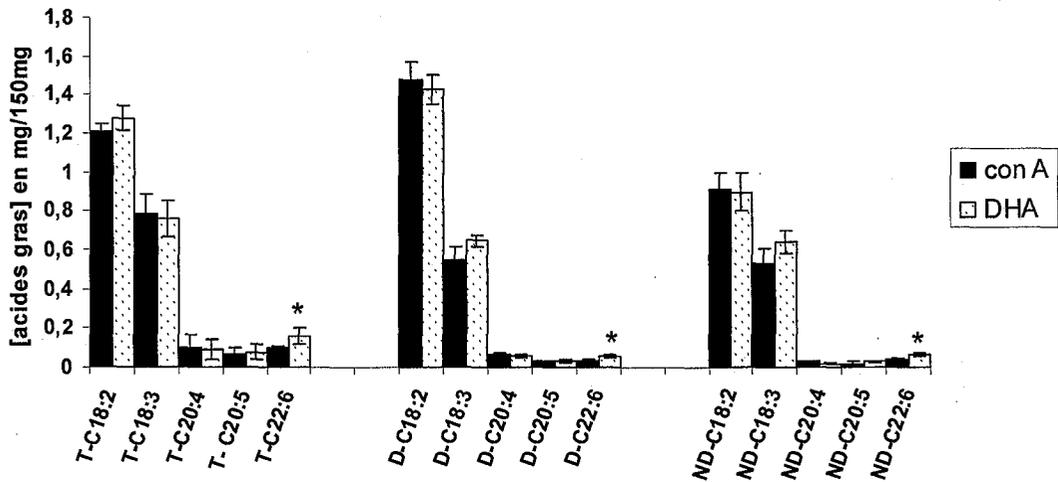


Figure II.29: Effet du DHA sur les concentrations en acides gras des triglycerides membranaires des lymphocytes T chez les témoins (T), DID (d) et DNID (ND).

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

* $p < 0.05$: différence significatif entre les incubations de même groupe (intragroupe).

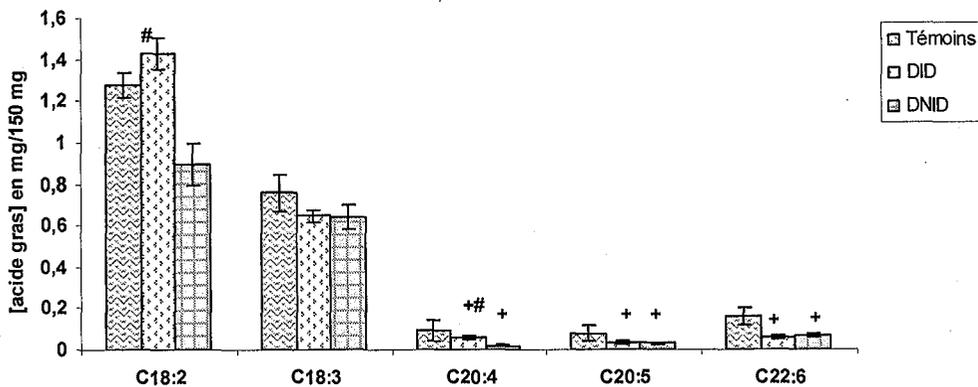


Figure II.30: Effet du DHA sur les concentrations en acides gras des triglycerides membranaires des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID.

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ $p < 0.05$: différence significatif entre les témoins et diabétiques.

$p < 0.05$: différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

1.3 Effet du EPA

L'ajoute d'EPA au milieu de culture, augmente significativement le taux de l'acide eicosapentaénoïque dans la membrane plasmique chez les témoins et de diabétique comparés à ceux sans acide gras (puit 2), ainsi il augmente le taux d'acide docosahexaénoïque chez les témoins (figure II.31).

Une diminution significative de l'acide α -linoléinique, l'acide eicosapentaénoïque et l'acide docosahexaénoïque a été observé chez les DID comparés aux témoins. Les memes resultats sont trouvés chez les DNID avec l'acide arachidonique, l'acide eicosapentaénoïque, et l'acide docosahexaénoïque.

De plus, une augmentation significative de l'acide arachidonique et l'acide linoléique été trouvé chez les DID comparés aux témoins. (figure II.32).

1.4 Effet d'AA

Une augmentation significative a été observée chez les témoins et les diabétiques au niveau de l'acide arachidonique lors des lymphocytes sont incubés avec l'AA comparé au puit 2, avec une diminution significative du DHA chez les témoins et les DNID(figure II.33).

L'addition d'AA au milieu provoque une diminution significative du EPA, DHA et AA au niveau de la membrane plasmique chez les diabétiques de type 1 et type 2 comparés aux témoins (figureII.34).

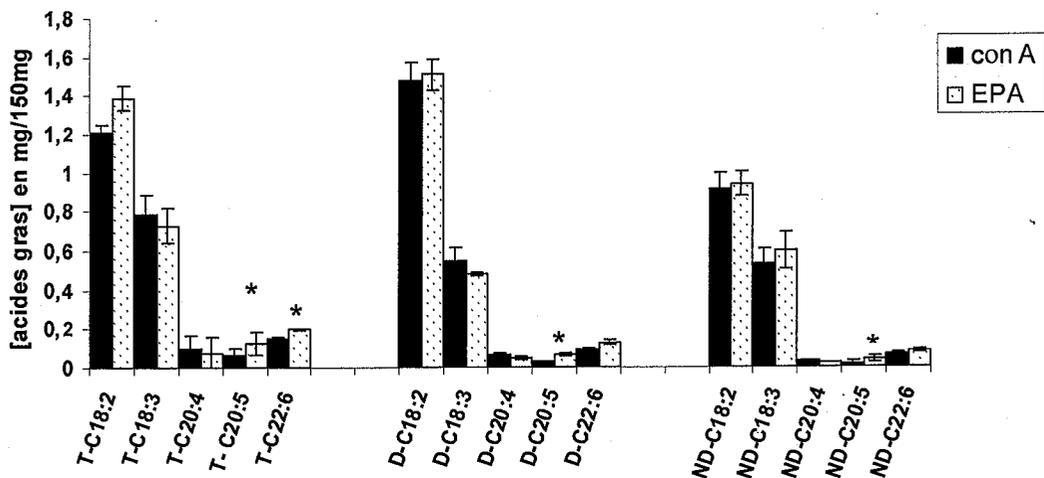


Figure II.31: Effet du EPA sur les concentrations en acides gras des triglycerides membranaires des lymphocytes T chez les témoins (T), DID (d) et DNID (ND).

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

* $p < 0.05$: différence significatif entre les incubations de même groupe (intragroupe).

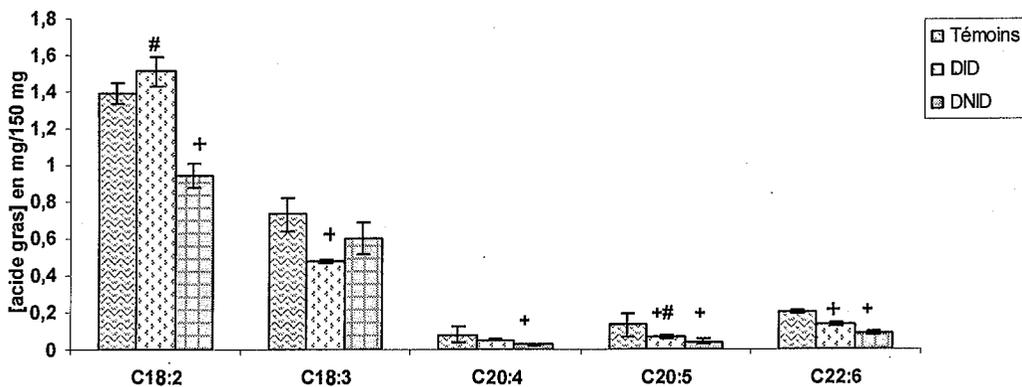


Figure II.32: Effet du EPA sur les concentrations en acides gras des triglycerides membranaires des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID.

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ $p < 0.05$: différence significatif entre les témoins et diabétiques.

$p < 0.05$: différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

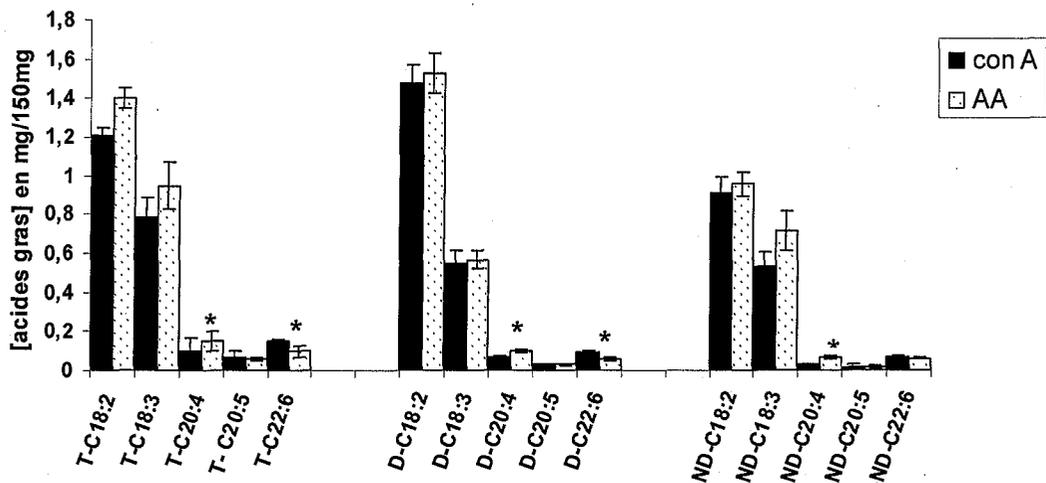


Figure II.33: Effet du AA sur les concentrations en acides gras des triglycerides membranaires des lymphocytes T chez les témoins (T), DID (d) et DNID (ND).

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

* $p < 0.05$: différence significatif entre les incubations de même groupe (intragroupe).

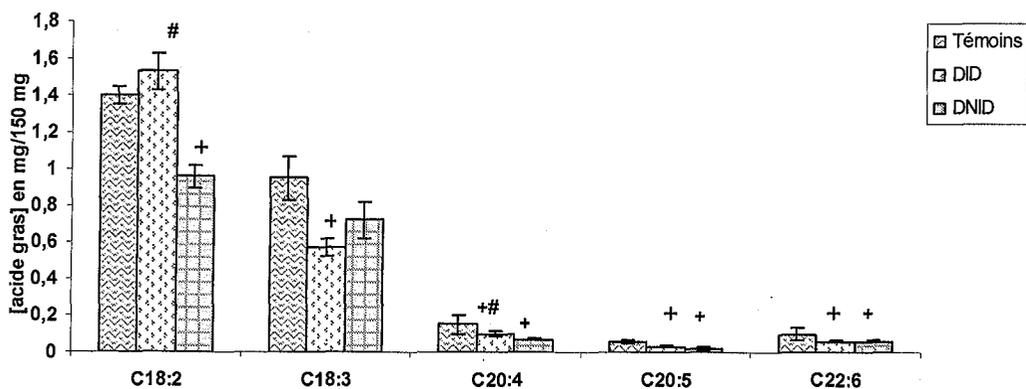


Figure II.34: Effet du AA sur les concentrations en acides gras des triglycerides membranaires des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID.

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ $p < 0.05$: différence significatif entre les témoins et diabétiques.

$p < 0.05$: différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

3- Au niveau des esters de cholestérol (EC) membranaire

3.1 Effet du Con A

L'addition du con A au milieu de culture diminue significativement l'acide linoléique et augmente EPA chez les témoins par contre, une augmentation de l'acide α -linoléique et EPA a été observée chez les DNID comparés au culture initiale (figure II.35).

La comparaison entre les témoins et les diabétiques montre qu'une augmentation de l'acide linoléique et une diminution de AA, EPA et DHA a été observée chez les DID tandis que les DNID ont une diminution significative en AA et EPA.

On note aussi, une augmentation significative de l'acide linoléique et EPA chez les DID que les DNID (figure II.36).

3.2 Effet de DHA

L'addition du DHA à l'incubation cause une diminution significative de l'AA chez les témoins comparés aux cultures en absence de DHA. L'augmentation du DHA a été trouvée aussi chez les deux types de diabète comparé à leurs témoins (puit 2), (figure II.37).

La comparaison entre les témoins et les diabétiques montrent qu'une augmentation de l'acide linoléique et une diminution significative des AA, DHA et EPA chez les DID. Par contre, les DNID présentent une augmentation significative de l'acide α -linoléique et diminution significative en taux de AA, DHA et EPA. La comparaison entre les diabétiques présents un taux significativement élevés de l'acide linoléique et EPA chez les DID que les DNID (figure II.38).

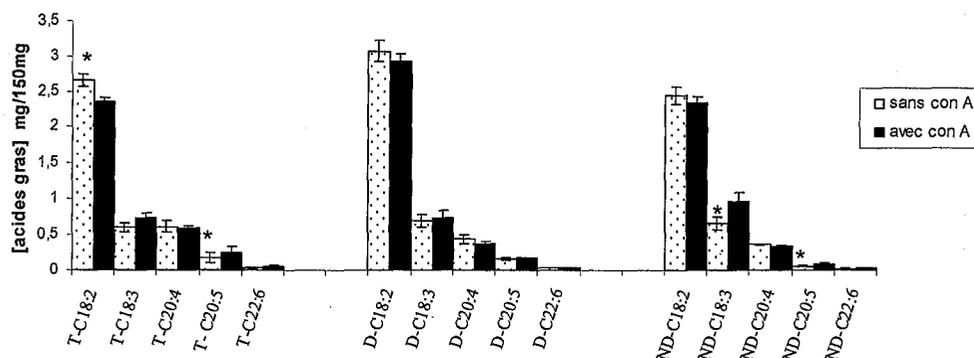


Figure II.35: Effet du con A sur les concentrations en acides gras des esters de cholesterol membranaires des lymphocytes T chez les témoins (T), DID(d) et DNID (ND).

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

* $p < 0.05$: différence significatif entre les incubations de même groupe (intragroupe).

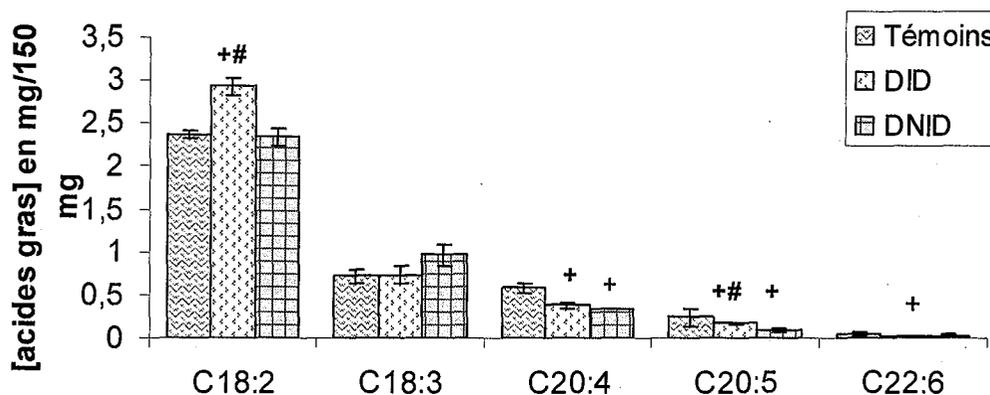


Figure II.36 : Effet du con A sur les concentrations en acides gras des esters de cholesterol membranaires des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID.

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ $p < 0.05$: différence significatif entre les témoins et diabétiques.

$p < 0.05$: différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

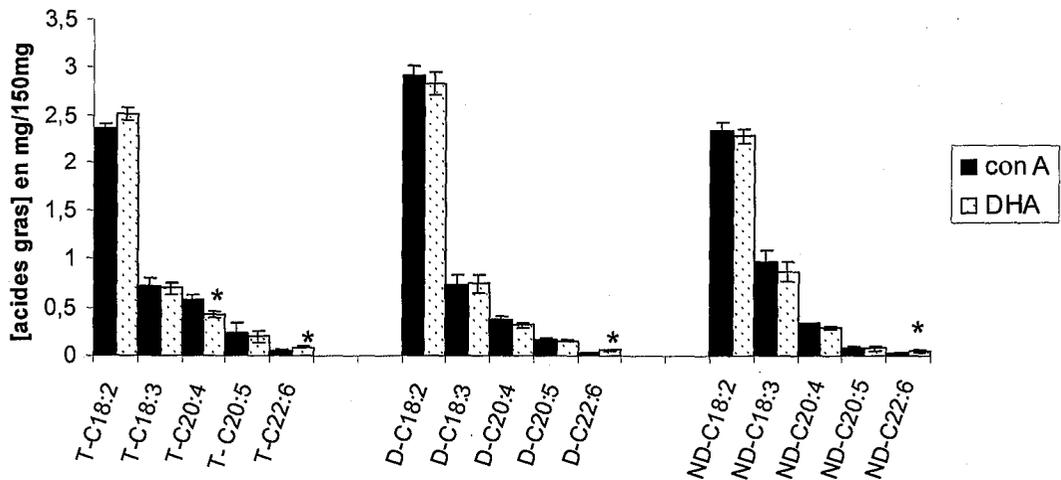


Figure II.37: Effet du DHA sur les concentrations en acides gras des esters de cholestérol membranaires des lymphocytes T chez les témoins (T), DID (d) et DNID (ND).

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

* $p < 0.05$: différence significatif entre les incubations de même groupe (intragroupe).

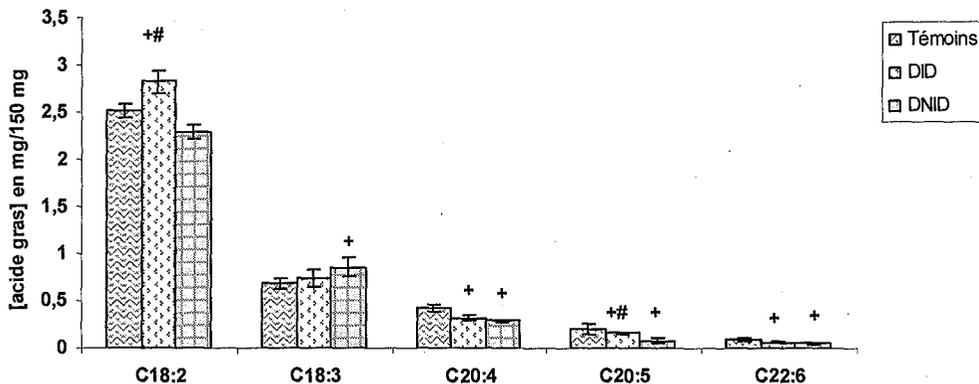


Figure II.38 : Effet du DHA sur les concentrations en acides gras des esters de cholestérol membranaires des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID.

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ $p < 0.05$: différence significatif entre les témoins et diabétiques.

$p < 0.05$: différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

3.3- Effet du EPA

L'ajoute du EPA au milieu de culture cause une augmentation significative de l'acide eicosapentaénoïque et l'acide docosahexaénoïque, ainsi une diminution significative d'AA chez les témoins comparée à leur incubation sans acides gras (puit 2).

Une diminution significative de l'acide arachidonique a été observée chez les DNID avec une augmentation significative d'EPA.

Les mêmes résultats sont trouvés chez les DID avec une augmentation en DHA. Les résultats sont représentés sur la figure II.39.

La comparaison entre les témoins et les diabétiques montre que les DNID ont une diminution significative des EPA et DHA. Les mêmes résultats sont trouvés chez les DID.

La comparaison entre les diabétiques de type 1 et de type 2 présente des taux significativement élevés en acide linoléique et en EPA chez les DID comparé aux DNID (figure II.40).

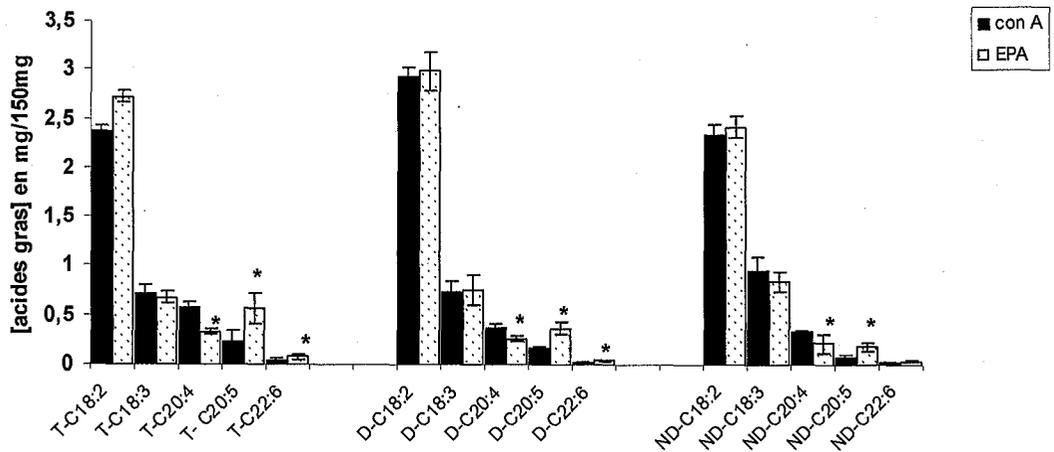


Figure II.39: Effet du EPA sur les concentrations en acides gras des esters de cholesterol membranaires des lymphocytes T chez les témoins (T), DID (d) et DNID (ND).

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

* $p < 0.05$: différence significatif entre les incubations de même groupe (intragroupe).

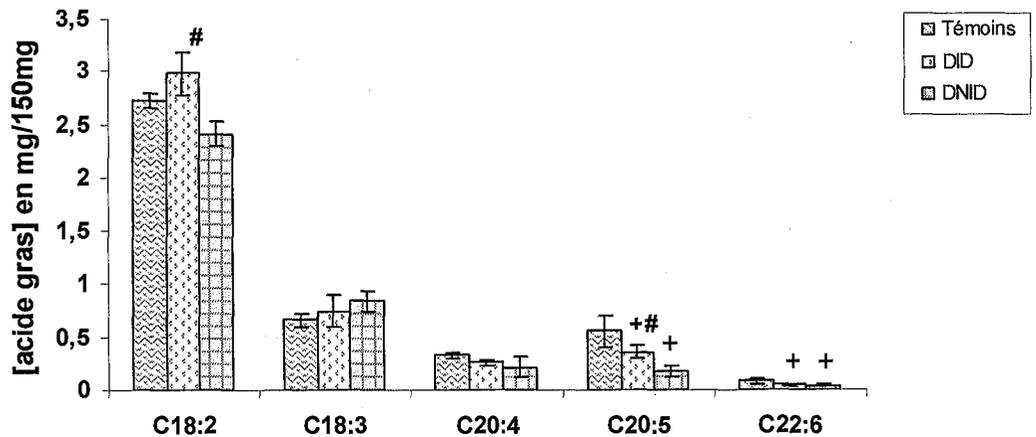


Figure II.40 : Effet du EPA sur les concentrations en acides gras des esters de cholesterol membranaires des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID.

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ $p < 0.05$: différence significatif entre les témoins et diabétiques.

$p < 0.05$: différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

3.4- Effet du AA

L'addition de l'acide arachidonique au milieu de culture, augmente significativement les concentrations en acide linoléique, acide α -linoléique et AA chez les témoins comparés aux cultures sans AA (puit 2) ainsi, on observe une diminution significative en EPA.

Par contre, une augmentation significative de l'acide arachidonique a été observée chez les deux types de diabète comparés à leurs cultures témoins (puit 2), (figure II.41).

La comparaison entre les diabétiques et les témoins montre une diminution significative de l'AA chez les DID ainsi que les DNID avec une diminution significative en EPA.

La comparaison entre les diabétiques montre une augmentation significative de l'acide α -linoléique et une diminution significative en AA chez les DNID comparés aux DID. Les résultats sont regroupés sur la figure II.42.

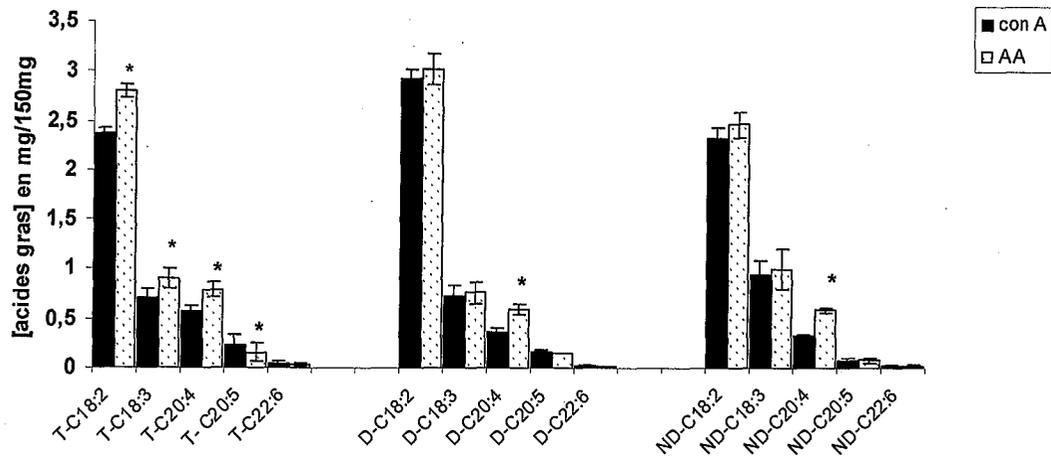


Figure II.41: Effet du AA sur les concentrations en acides gras des esters de cholestérol membranaires des lymphocytes T chez les témoins (T), DID (d) et DNID (ND).

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents incubations intragroupe est effectuée par paired t test de student.

* $p < 0.05$: différence significatif entre les incubations de même groupe (intragroupe).

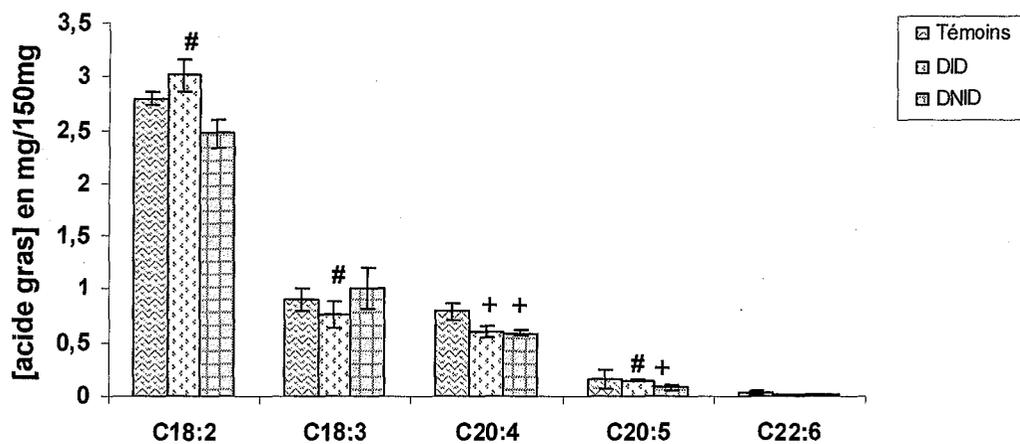


Figure II.42: Effet du AA sur les concentrations en acides gras des esters de cholestérol membranaires des lymphocytes T chez les témoins, DID et DNID.

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison des moyennes entre les différents groupes est effectuée par independent t test de student.

+ $p < 0.05$: différence significatif entre les témoins et diabétiques.

$p < 0.05$: différence significatif entre les diabétiques de type 1 et type 2

DISCUSSION

Dans ce travail, nous avons essayé de mettre en évidence quelques aspects pathologiques qui touchent les lymphocytes T chez les diabétiques de type 1 et de type 2 par rapport aux témoins.

Pour cela, il est important d'évaluer dans un premier temps le pouvoir proliférateur des lymphocytes T en présence ou absence de con A, d'insuline et des acides gras polyinsaturés des séries n-3 et n-6.

Cette prolifération des lymphocytes reste un processus dans lequel les lymphocytes synthétisent de nouvelles molécules d'ADN et subissent une division cellulaire suite à un stimulus qui conduit à une série de changements principalement cytomorphologiques tel l'augmentation en taille du lymphocyte, le cytoplasme qui devient plus extensif, la nucléole devient plus visible dans le noyau et la cellule se ressemble à une cellule en blaste (109).

Le stimulus qui peut provoquer la réponse proliférative des lymphocytes peut être un antigène, un alloantigène c'est à dire les leucocytes de deux donneurs sont mélangés dans une culture mixte, et un mitogène tel que le concanavalin A (con A), le phytohemagglutinine (PHA). Le premier rapport qui annonce que le mitogène induit une prolifération lymphocytaire était décrit avec PHA en 1960 (109).

On trouve que dans la culture basale des lymphocytes T, l'indice de prolifération ne présente aucune différence significative entre les témoins et les diabétiques. Ainsi, ces résultats sont trouvés en accord avec ceux des nouveaux DID comparés aux témoins.

L'effet du con A comme un mitogène stimulant la transformation cellulaire a été rapporté dans plusieurs études. Le con A est une molécule phytomitogène, de la classe de lectine qui est une famille des protéines dérivés des plantes, stimule les réponses cellulaires après son fixation sur

la chaîne glucidique de la membrane plasmique (101). Cette fixation se fait d'une manière similaire à celle de l'antigène dont le mitogène se fixe sur du récepteur spécifique sur la surface cellulaire créant un signal qui induit le cycle cellulaire des lymphocytes (77).

L'addition de 30µg/ml de con a au milieu de culture augmente significativement l'indice de prolifération des lymphocytes T chez les témoins et les diabétiques insulino-dépendants et non insulino-dépendants en comparant à ceux en culture initiale.

Cependant, les résultats trouvés montrant que nos diabétiques ont des réponses prolifératives plus inférieures que celles des témoins dont les DID ont la réponse la plus faible quand les lymphocytes sont stimulés par con A.

Ces observations sont plus ou moins en accord avec celles mentionnées dans la littérature. Cependant, plusieurs études ont confirmé que les patients diabétiques ont une réponse proliférative faible par rapport à celle du normal individu (31). Ainsi, les lymphocytes spléniques chez les rats diabétiques stimulés par con A présente une réponse proliférative basse que celle des rats non diabétiques (142), (219).

D'autres études ont confirmé l'existence d'une réponse altérée au PHA chez les diabétiques insulino-dépendants et les diabétiques non insulino-dépendants qui ont une réponse significativement plus grande que celle trouvée chez les DID. L'altération trouvée peut être influencée par la sévérité du diabète et spécialement chez les diabétiques mal contrôlés (208).

De plus, l'insuffisance de la réponse proliférative des lymphocytes est observée chez les diabétiques quand les lymphocytes sont activés par

des différents mitogènes tel que phytohemagglutinine à 1%, et d'autres mitogènes comme le con A à (10 µg/ml) ou PMA à (50µg/ml).(32). Cette réponse réduite aux mitogènes peut être rendue à plusieurs causes :

La pureté des cellules cultivées dont les cellules mononucléaires périphériques du sang sont un mélange de 80% lymphocytes, 15-20% monocytes et inférieurs de 5% contamination avec d'autres cellules (111).

La réduction de la lymphoprolifération chez les rats diabétiques peut être due à la production accrue de l'oxyde nitrique (NO) par les macrophages en comparant aux témoins (103).

En plus, la réduction de la réponse aux mitogènes peut être due à un manque dans l'absorption du glucose au niveau de la membrane tant que le glucose est la source principale d'énergie aux lymphocytes dans la période de prolifération. Ce manque est associé à une baisse dans l'expression du transporteur du glucose sur la membrane lymphocytaire (129) ainsi, à une altération dans le processus de phosphorylation de ces transporteurs par les protéines kinase (c) ; ce qui influence son activité et/ou son localisation au niveau de la membrane(145).

Chez les cellules immunitaires, l'expression du Glut-1 sur la membrane des lymphocytes se fait après une stimulation mitogénique (129).

Dans le cas du diabète induit par streptozotocine ou l'alloxane, la réduction d'expression du glut-1 est indépendante de la stimulation insulinique mais il est dépendant de l'altération du signal de transduction après une stimulation mitogénique (129).

Une autre possibilité a rendu la faible réponse cellulaire à l'inactivation des récepteurs lymphocytaires aux mitogènes (208).

Par ailleurs, il est possible que le problème est du au dysfonctionnement des lymphocytes diabétiques (60, 54) qui peuvent faire le transfert du diabète aux animaux non diabétiques par des lymphocytes des rats diabétiques stimulés par con A (7), (60).

D'autre explication annonce que les lymphocytes sont déjà activés chez les diabétiques pour cela ils répondent peu à l'effet de con A et leur prolifération in vitro est faible comparée à celle des lymphocytes des sujets témoins (71).

Par ailleurs, nos résultats montrent que l'indice de prolifération s'augmente significativement chez les lymphocytes incubé avec $20\mu\text{g/ml}$ d'insuline chez les témoins et les DNID. On remarque aussi que l'insuline stimule le pouvoir proliférateur des lymphocytes témoins (26%) plus que celles des diabétiques dont le pouvoir stimulant des DID est 22% et les DNID est 19%. Ces résultats sont similaires à d'autres études déclarant que l'insuline peut augmenter soit in vivo soit in vitro la réponse cellulaire des lymphocytes stimulé à différentes mitogènes (PHA, con A et lipopolysaccharide) (47). Ainsi, en présence d'insuline la lymphoprolifération est significativement faible chez les patients diabétiques par rapport à leurs témoins quelque soit le type du diabète (163),(187).

Il est trouvé que les lymphocytes T ont une aptitude à fixer l'insuline après l'activation. A l'état de repos, les cellules sanguines périphériques ne peuvent pas ni lier ni répond à l'insuline car il n'y a pas d'expression des récepteurs à l'insuline .(47)

La réponse proliférative des lymphocytes T à l'insuline humain conduit à des résultats contradictoires, qui a trouvé que cette réponse est de 20-50% chez les récents DID patients et de 0-33% chez les individus

normaux tandis que cette réponse est moins importante chez les anciennes DID (55).

La faible lymphoprolifération chez les anciennes DID peut être expliquée du fait que l'insuline exogène est un faible immunogène pour les cellules T où il est induit un état de tolérance chez la plupart des patients et les souris diabétiques in vivo. (51), (55), (6).

L'administration de l'insuline exogène est bénéfique chez les récents diabétiques insulino-dépendants ou il s'avère que la thérapie avec l'insuline intraveineuse peut augmenter la sécrétion d'insuline endogène. Cette augmentation peut être expliquée par la réduction de la destruction des cellules β causé par l'hyperglycémie ainsi les cellules β rendu moins immunogéniques à cause de la réduction de son activité métabolique produisant l'antigène cible (l'insuline) (8).

En plus, plusieurs études ont démontré qu'il y a une réduction de la résistance à l'insuline chez les diabétiques de type 2 après le traitement par l'insuline exogène (58).

En effet, ces différenciations en réponses prolifératives des lymphocytes suggèrent que la prolifération représente une incomplète image des réactions immunitaires (199).

Enfin, il est rapporté que la diminution des réponses lymphocytaires peut être reliée à l'hyperglycémie, hyperinsulinémie et d'autres facteurs métaboliques ou l'insuffisance en l'activité du récepteur de l'insuline sur les lymphocytes (31), (74) Il est observé que les cellules mononucléaires basale ou stimulées par insuline chez les DID, ont montré une diminution significative dans le taux d'absorption des hexoses en comparant aux témoins.

Cette différence significative révèle une réduction en réponse au niveau du transporteur du glucose chez les DID (39). Il est trouvé ainsi dans le cas de résistance à l'insuline avec une hyperinsulinémie que les lymphocytes T active répond à l'insuline moins que celles du normales individus.(187)

Par ailleurs, les différentes conditions de culture utilisées peuvent participer à cet état tel le temps d'incubation des lymphocytes source d'insuline comme un antigène où le traitement des patients avec l'insuline bovine, porcine ou humaine et la définition de la réponse significative des cellules T qui varie entre les résultats publiées (171).

Il est montré que l'insuline exogène peut moduler la réponse immunitaire chez l'homme et l'animal conduisant à retarder ou même empêcher le diabète auto immune (171).

Enfin, l'insuline est un hormone immunodulateur qui peut augmenter la fonction de la cellule T cytotoxique, permet la différenciation des cellules matures et maintient l'état active des lymphocytes (187).

Par ailleurs, La concentration d'interleukine 2 (IL-2) produite par les lymphocytes T dans la culture basale ne présente aucun différence significative entre les témoins et les diabétiques. Par contre, le taux d'Il-2 produite par les lymphocytes T stimulés par la con A montre une diminution significative chez les diabétiques de type 1 comparés aux témoins. ces résultats sont confirmés par plusieurs travaux dont il est trouvé que le taux d'Il-2 produite par les lymphocytes T humain est significativement réduite les chez les diabétiques de type 1 (219) ainsi chez les lymphocytes splénique du BB rats diabétiques (177), (219).

De plus, la culture initiale des cellules mononucléaires périphériques du sang ne présente aucune différences en production d'IL-2 entre les sujets normales et les anciennes diabétiques de type 1. Par contre, en culture stimulée par le PHA, les cellules des diabétiques de type 1 ont caractérisé par une hyposécrétion d'Il-2 en comparant à ceux des normales individus (61).

Par ailleurs, l'addition d'insuline au milieu du culture augmente la réponse proliférative chez les témoins et les DNID en comparant à ceux en absence d'insuline. Par contre, la production d'IL-2 se diminué significativement chez les témoins seulement et aucun différence significative a été noté chez les diabétiques.

Cependant, d'autre travaux effectués sur le dosage d'IL-2 secrété par les lymphocytes chez les diabétiques insulino dépendant montre une réduction significative comparé au normal individus, tandis que l'IL-2 chez les patients non insulino dépendant n'est pas diminué en comparant aux témoins groupe dont le taux d'hémoglobine glycyqué chez les DNID n'est pas statistiquement différentes de celle des DID. (220), (93).

Un autre étude indique que le facteur limitant pour la prolifération des cellules T est la déficience en production du IL-2 chez les diabétiques plus que la déficience en réponse à IL-2 lui-même. (138).

Cette justification est plus on moins en accord avec nos résultats car nos diabétiques de type 2 ne présentent pas une déficience en concentration d'IL-2 et malgré ça on a un taux de prolifération plus faible que celles des témoins.

D'autres études montrent que les lymphocytes des diabétiques de type 1 ont synthétisé un faible teneur en Il-2 que celles de non diabétiques individus et cette faiblesse est observés chez les DID bien

contrôlé ainsi que mal contrôlé (220). Ceci prouve que cette anomalie reste indépendante du contrôle métabolique ainsi que de l'administration d'insuline exogène. (178), (220), (219). Mais, cet effet peut être inclus dans les pathogènes de cette maladie et il est spécifique pour les DID. (220), (219).

Ces résultats suggèrent que les patients diabétiques de type 1 peuvent être ont un défaut intrinsèque dans les cellules T conduisant à une incapacité d'élaborer une quantité normale d'IL-2, (178) est due à la nature pathophysiologie de la maladie (93).

Puisque l'insuline augmente le taux de lymphoprolifération chez les témoins et les diabétiques sans augmenter la concentration d'IL-2, on peut proposer d'autre mécanisme dont l'insuline réagit directement en fixant sur les récepteurs des lymphocytes T et sans l'intervention de l'IL-2 à seul.

Ainsi, il est démontré que, chez les rats diabétiques, la réduction de la réponse lymphoproliférative *in vitro* est associée avec l'augmentation du taux de nitrite accumulé dans le milieu de culture sachant que l'oxyde nitrique produite en excès par le macrophage et rapidement converti au nitrite et nitrate. D'où la réduction en lymphoprolifération qui est médiée par l'oxyde nitrique (103). Par ailleurs, les cellules B peut produire ainsi une abondante quantité d'oxyde nitrique en réponse à une stimulation par les cytokines (8).

l'élévation en production de l'oxyde nitrique n'est pas le seul mécanisme d'inhibition; les prostaglandines produites par les macrophages réagit comme des suppresseurs de la prolifération lymphocytaires. D'autre part, il est trouvé qu'il y a un défaut intrinsèque se traduit par une réduction du nombre des récepteurs d'interleukin-2 chez les lymphocytes des BB rats (103).

D'autres mécanismes interviennent avec l'IL-2; ces lymphokines qui sont secrètes par les lymphocytes T activés par un antigène ou un mitogène. (220). Dont il existe deux classes majeurs des cellules T qui sont les cellules T aides (helper T cells, T_H cells), qui expriment les molécules de CD_4 , et les cellules T cytotoxique (cytotoxic T cells, T_C cells), qui expriment les molécule de CD_8 sur leur surface. Sachant que les molécules de classe I du MHC participent dans la présentation du antigène aux cellules T CD_8^+ ; par contre les molécules de classe II du MHC participent dans la présentation du antigène aux cellules T CD_4^+ (36,136).

Concernant les cellules T (aides) on a 2 sous classes les $TH_1 CD_4^+$; qui synthétisent les cytokines de IL-2, interféron γ et TNF B (tumor necrosis factor B, et les TH_2, CD_4^+ ; qui synthétisent les cytokines de IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 (36), (190), sachant que les cytokines de TH_1 ont activent essentiellement les réponses d'immunités cellulaires (TH_1 sont les médiateur de l'immunité cellulaires). Par contre, les cytokines de TH_2 sont généralement des stimulateurs de l'immunité humorale (production des anticorps).(93) ,(150).

Il est connue que les cytokines de TH_1 tel IFN- γ peut inhiber la production des cytokines de TH_2 (IL-4 et IL-10) et ces derniers, à leur tour, inhibent la production des cytokines de Th_1 . (150).

Par contre, IL-1 est connue en augmentant la production d'IL-2 par les lymphocytes T et aussi peut activer les lymphocytes B et augmente le production d'autre lymphokines tel Les interférons (35) donc les lymphokines peuvent influencer positivement ou négativement la régulation immunitaires dont n'importe quel déficience en production des lymphokines peut affecter la réponse cellulaire (178).

IL-2 est appelé aussi facteur de croissance de cellule T qui est synthétisé par les cellules TH1 après une stimulation par fixation l'antigène ou le mitogène sur les récepteurs des cellules T. Physiologiquement, il est l'un des lymphokines responsables de l'activation et la prolifération des cellules T. (220), (178), (22), (95a).

Le contrôle d'action de IL-2 est compliqué et il peut être régulariser à différents niveaux (178).

Plusieurs mécanismes peuvent être expliquer le processus de réduction en concentration d'IL-2 produite et la réponse proliférative chez les lymphocytes dont l'initiation du cycle cellulaire des lymphocytes T est dépend au signal immunostimulatrice tel l'antigène, mitogène ou spécifique monoclonale anticorps, sachant que la transition du phase G₁ à la phase réplivative (S, G₂, M) du cycle cellulaire a été orienté par IL-2 (29).

Il a été démontré que l'hyposécrétion d'IL-2 in vitro résulte de la déficience en nombre de lymphocyte T qui est déjà activé in vivo. (61). D'autre étude démontre que une diminution dans le niveau d'ARNm de l'IL-2 a été observé dans les cellules T des diabétiques insulino-dépendant en comparant aux témoins. L'étude de la demi-vie de ces matériels génétiques ont montré que l'ARNm de l'IL-2 de cellule T diabétique est généralement moins stable que celle des cellules témoins. Donc le défaut en sécrétion d'IL-2 n'est pas dépend seulement au attachement des agents stimulatrices sur les récepteurs de surface des cellules T mais il y a ainsi un défaut au niveau de la translation (178).

La nécessité d'une costimulation CD28 pour obtenir IL-2 et le taux élevé d'autres cytokines ont probablement un grand effet sur la stabilité d'ARNm des cytokines (82). Pour cela, les diabétiques de type 1 peuvent être considérés génétiquement de faible producteur d'IL-2 (61).

D'autre proposition à été mis pour expliquer la réduction en taux prolifératif chez les cellules T qui consiste d'une part, au pouvoir (capacité) stimulateur d'IL-2 qui est différent d'un subset (sous type) de lymphocyte à un autre (178) dont le rapport de cellules T4/T8 à été diminué chez les diabétiques de type 1 comparés au témoins (53), d'autre part, la synthèse d'IL-2 a été affecté, sachant que les cellules T synthétisent au moins 3 types de lymphokines qui peuvent influencer la prolifération du cellules T (IL-2 IL-4 et IL-6) (178).

Il est observé chez les DID, qu'il y a des récepteurs soluble d'IL-2 (IL-2RS) dans la circulation sanguine et/ou dans le surnageant du milieu des cultures des lymphocytes T humains, ces IL-2RS jouent un rôle inhibiteurs des cytokines ou des antagonistes. Ils sont formés à partir d'une clivage enzymatique protéolytique d'une portion de 45 KDa de la chaîne α du récepteur d'IL-2 (CD25). Ces portions qui sont libérés du IL-2 R ont l'habilité de fixer l'IL-2 sur leurs récepteurs spécifiques conduisant à neutraliser son activité (36). Ainsi, il est montré qu'il y a une corrélation positive entre IL-2 et IL-2 RS chez les DID par rapport aux témoins (61).

D'autre part, il est noté que l'activation chronique des cellules T est associé avec un taux élevé des récepteurs soluble d'IL-2. Ce qui permet d'utiliser ceci comme marqueur de l'activation des cellules T chez certaines maladies auto-immunes. (36), (61).

Le fait qu'une présence d'une faible réponse proliférative chez les DNID avec une concentration normale d'IL-2 chez les lymphocytes T stimulés par con A s'explique par les mécanismes suivants: Quand une cellule T a été activé par un antigène ou lectine (mitogène), les récepteurs d'IL-2 se manifeste et s'accumule sur la surface du cellule stimulé. Lorsque la densité critique du récepteurs d'IL-2 a été obtenu, la

progression du cycle cellulaire s'ensuit en présence d'une adéquate concentration d'IL-2, si le signal initial immunostimulatrice est disparaît, le nombre des récepteurs d'IL-2 diminue progressivement malgré la présence d'une concentration adéquate d'IL-2. Parallèlement, le taux de prolifération diminue aussi. Finalement, les cellules T restent dans la phase de Go-G1 (phase de repos). (29). On peut tiré comme conclusion qu'il y a trois facteurs critiques pour la progression de la cycle des lymphocytes T qui sont la concentration d'IL-2, la densité du récepteur d'IL-2 et la durée d'interaction entre l'IL-2 et son récepteur (29), (182).

En outre, plusieurs études ont montré l'effet des acides gras polyinsaturés de la série (n-3) et (n-6) sur le diabète sucré et ses effets bénéfiques chez les diabétiques (193).

Pour cela, on a fait l'incubation des lymphocytes avec DHA et/ou EPA comme des AGPI n-3 et/ou avec AA comme PUFA n-6 dans même temps et en même concentrations (40 μ M) d'une façon individuelle ou combiné.

Les résultats obtenus montrent des effets immunosuppressif des AGPI sur la prolifération cellulaire chez les témoins ainsi que les diabétiques de type 1 et type 2 où EPA a la plus grande degré d'inhibition que AA et DHA respectivement.

On note ainsi que l'inhibition de la lymphoprolifération est plus marqué chez les témoins que ceux des diabétiques.

Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux en littérature dont il est rapporté que un régime d'huile riche en l'acide linoléique, comme AGPI-n-6, diminue la réponse proliférative des lymphocytes stimulés par con A chez les rats. (75)

En plus, les études réalisés in vitro sur l'homme et sur Les animaux démontrent que AGPI n-3 a un effet suppressif sur la fonction lymphocytaire (25).

Ainsi, il est trouvé que la prolifération des lymphocytes spléniques des rats nourris par des régimes riches en EPA ou DHA sont diminués significativement par rapport à ceux nourris avec un régime contrôle. Par contre, le régime enrichie en AA ne diminue significativement l'indice de prolifération. (137).

Il est rapporté que EPA est un fort agent immunosuppresseur que DHA qui peut modulé les signaux des cellules T. (204).

Nos résultats présente aussi que la combinaison entre les acides gras polyinsaturés de série n-3 (EPA et DHA) ont diminué significativement l'indice de prolifération chez tous les groupes de témoins et diabétiques en comparant à ceux en absence de AGPI. D'autres auteurs montrent qu'un régime riche en AGPI n-3 (76 g d'huile de poisson/Kg) diminue la réponse proliférative des lymphocytes vis-à-vis con A et PHA chez les lapins (75).

De plus, la supplementation d'une régime riche en EPA et DHA (PUFA/EPAX) par les rats normotensives et les rats hypertensives pendant 10 semaines entraîne une diminution de la prolifération des cellules T chez les deux groupes des rats. Par contre, la sécrétion d'IL-2 a été réduit seulement chez les rats hypotensives en comparant aux rats nourris par un régime contrôle. (204).

On a remarqué aussi que les concentrations individuelles du DHA, EPA et AA ont inhibé significativement la production d'IL-2 chez les lymphocytes T simulé par con A. le grand degré d'inhibition a été observé avec l'AA puis DHA et EPA respectivement.

Par ailleurs, la combinaison entre les AGPI n-3 ou AGPI n-3 avec AGPI n-6 continue toujours l'inhibition d'IL-2 en comparant à ceux en absence de AGPI chez tous les groupes avec des degrés d'inhibition différents. Cependant, nos résultats sont soutenus par les observations de plusieurs auteurs qui ont démontré que la supplémentation avec huile de poisson a diminué la production des différentes cytokines et particulièrement IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6 et TNF α chez les cellules mononucléaires périphériques *in vitro* (25).

Ainsi, l'huile du poisson est un potentiel nutriment anti-inflammatoire à cause de sa capacité de réduire la production des cytokines pro-inflammatoires dont la supplémentation de 18 g d'huile de poisson pendant 6 semaines réduit significativement la production d'IL-1 et TNF- α par les cellules mononucléaire stimulé. (PBMC). (64), (52). Ceci révèle bien qu'il y a nombreuses voies dans lesquels la nutrition peut affecter les réponses des cytokines dont la synthèse des cytokines proinflammatoires est supprimé par supplémentation des PUFA n-3 chez des volontaires normales (138a). De plus, il est démontré que la consommation d'un régime riche en AGPI n-3 diminue la production d'IL-2 chez les cellules T purifiés. (196), ainsi chez les femmes vieilles plus que des jeunes femmes (112a).

En plus, il est rapporté que AGPI ω -6 dont AA et AGPI ω -3 inhibent la production du IL-1, IL-2, TNF chez les lymphocytes humaines *in vivo* et *in vitro*. (191).

De plus, il est noté que avec l'intervention du AGPI n-3, la production des cytokines proinflammatoires est plus sensitive que les autres fonctions des lymphocytes (137).

En effet, l'interaction entre AGPI n-6 et AGPI n-3 est très compliqué et il est difficile de prédire de son impact, sachant que chaque effet peut munir une stratégie nouvelle sur la manipulation des compositions cellulaires afin d'influencer la réponse et la fonction cellulaires dans désirable voie. (123).

Par ailleurs, l'addition d'insuline au milieu du culture contenant AGPI combiné, de série n-3 ou celui de AGPI n-3 et AGPI n-6, augmente significativement le taux de prolifération chez les témoins et DNID mais cette augmentation n'altère pas l'effet suppressive du PUFA. Par contre, la concentration d'IL-2 tend à diminuer en comparant à ceux sans insuline.

On note aussi que l'addition du AA au PUFA n-3 combiné stimule la lymphoprolifération des lymphocytes T chez les témoins (+4%), les DNID (+3%) et les DID (+2%) respectivement.

De plus, cette stimulation s'augmente en présence d'insuline pour arriver à 6% chez les témoins, 4% chez les DNID et 3% chez les DID.

On observe aussi que l'augmentation du taux de prolifération s'accompagne au diminution en la concentration d'IL-2, ce qui indique qu'il y a d'autre mécanisme influence la lymphoprolifération sans l'intervention d'IL-2.

Ainsi, il a été observé que l'apport d'un régime riche en huile de poisson protège les animaux (rats) contre une hyperlipidémie et l'insulinorésistance des adipocytes. (41). Les mécanismes exactes qui permet au AGPI de diminuer la résistance au insuline ne sont pas connues. Certaines possibilités inclus ça aux l'augmentation dans la fluidité membranaire.

Parallèlement, l'insuline a tendance à augmenter l'activité de Δ^6 et Δ^5 desaturases ; ce qui permet d'augmenter la formation de AGPI, ensuite ça à son tour, augmente l'action d'insuline par l'augmentation du nombre des récepteurs d'insuline sur la membrane cellulaire et ainsi qu'à l'affinité d'insuline à ses récepteurs. (41). Donc il existe une relation entre l'insuline et la quantité d'enzyme activé en plus au durée de l'effet d'insuline; l'augmentation observée des désaturases après l'induction par l'insuline peut être due au activation et/ou à la synthèse du nouvelles enzymes (140).

D'autre mécanisme consiste à la capacité du AA, EPA et DHA d'inhiber la synthèse et la sécrétion de $\text{TNF}\alpha$ (facteur nécrotique) par les lymphocytes T humaines soit in vivo soit in vitro dont il inhibe l'activité du tyrosine kinase du récepteur d'insuline. Une mécanisme dans laquelle les AGPIs peuvent reverse l'insulinorésistance par le blocage d'élaboration de $\text{TNE}\alpha$ et d'autres cytokines pro-inflammatoires. (41), (52), (138a).

Par ailleurs, le AGPI sert aussi comme ligand à PPARs et ce dernier modifie la résistance à l'insuline. (41).

Ainsi, l'effet insulintropique des acides gras est influencé par la longueur du chaîne et par leurs degrés d'insaturatation. (185).

Dont une proportion élevé des acides gras saturés et des acides gras trans est associée à l'insulinorésistance tandis que une proportion élevée des acides gras polyinsaturés est associée à la sensibilité d'insuline. (134), (84), (189).

Il est rapporté que la grande utilisation d'acides gras saturé et/ou trans entraîne un développement d'obésité avec un taux métabolique faible, une réduction de la capacité de fixation au niveau membranaire,

modification de la fonction des protéines en inhibant l'activité des enzymes désaturases ce qui affecte la sensibilité à l'insuline et conduit à un risque élevé de diabète de type 2 après quelques années; sachant que l'utilisation de 2% d'énergie des acides gras trans est associée avec 39% d'augmentation du risque en diabète. (84), (189), (125).

Par contre, il a été suggéré que la modification du type des lipides et des glucides dans l'alimentation a une grande influence en améliorant la réponse à l'insuline et réduit le risque du diabète type 2. (84), (156).

Ainsi, dans des études faites chez l'homme démontrent qu'il y a une association entre la proportion du AGPI n-3 dans le phospholipides des membranes squelettique et l'augmentation en sensibilité à l'insuline(84). De plus, il est montré que les acides gras monoinsaturés et polyinsaturés améliorent la sensibilité à l'insuline. (156) et particulièrement, AA et DHA ont un grand effet (125) dont il est observé que une habituelle consommation de petite quantité de poisson protège contre le développement d'intolérance au glucose et de diabète sucré (188).

Néanmoins, d'autres études n'ont pas démontré une relation significative entre la proportion du PUFA n-3 et la sensibilité à l'insuline chez l'homme au contraire aux animaux (134), (156). Ces différences en résultats peut être due d'une part à composition du milieu de culture in vitro, dont le changement en composition d'acides gras provoque des changements aux niveaux du nombre et d'affinité des récepteurs à l'insuline sur la surface cellulaire (165), (202).et d'autre part, aux différentes caractéristiques des populations étudiées tels l'âge, sexe, obésité, et les régimes ou habitudes alimentaires. (134), (202), (84).

Par ailleurs, Le traitement des souris non obèse par des agents immunosuppresseurs ou immunostimulateurs peut prévenir le diabète par

plusieurs mécanismes (177), appuyant sur le rôle important des cytokines en moduler l'expression des maladies auto-immunes dont l'administration d'IL-2 chez les souris non obèse diabétiques restaure la génération des lymphocytes T et diminue l'incidence du diabète. (161). D'autres études rapportent que l'administration des cytokines tel IL-2, IL-4 et IL-10 peut empêcher l'apparition du diabète chez les souris et chez les BB rats in vivo. (150). D'autres études montrent que l'IL-2 exogène administré aux rats diabétiques à une petite dose (1000 unités/semaines) et avec une dose élevée (75000 unités/semaine) ne présentent aucun effet sur le développement auto-immune du diabète (ni prévenir et ni induire le diabète) (22).

Par contre, autres études ont montré que l'incidence de diabète a été doublé lors les BB rats sont traités avec 20 µg/Kg de IL-2 recombiné (par 2 injections intrapéritoniales /jour pendant 80 jours) (95a). D'autres études montrent que le traitement des souris non obèse et diabétique par cyclosporine, un agent qui inhibe la production d'IL-2, est plus efficace quand la thérapie a été commencée en état d'insulinites minimaux ou absents. (177).

Enfin, le rôle précis d'IL-2 en initiation des maladies autoimmunes est mal compris mais la plupart des travaux suggèrent que tous les deux d'excès ou de déficience en IL-2 peut induire des maladies autoimmunes. (22).

Il est possible que cette différence en résultats est due aux différences en dosage de l'IL-2 et la voie d'administration (22) ainsi, la durée de la pathologie. (140)

Notre étude a pour but de voir l'effet de chaque acide gras testé sur la composition en acides gras de la membrane lymphocytaire et les fractions de phospholipides, triglycérides et esters de cholestérol.

Il est démontré que la stimulation du lymphocyte T avec con A chez les rats, provoque des changements significatifs de la composition en acides gras au niveau des fractions phospholipidiques et au niveau des lipides neutres où il y a une diminution de la proportion en acides stéarique, linoléique, et arachidonique et ce avec une augmentation de l'acide oléique (24), (218). Ces observations sont plus ou moins en accord avec nos résultats dont la stimulation par con A provoque aussi une augmentation des teneurs en EPA, DHA, et AA chez notre population témoin.

De plus, il y a une distribution caractéristique pour chaque acide gras testé dans les différentes fractions de la membrane. Calder et al. (1994) ont montré que l'acide arachidonique ajouté au milieu de culture, s'intègre principalement dans la fraction phospholipidique et spécialement dans la phosphatidylethanolamine partie (classe) (24). De plus, l'addition d'un acide gras au milieu de culture permet d'enrichir toutes les fractions lipidiques membranaires en cet acide.

La modification de la composition en acide gras dans les membranes des lymphocytes ou d'autres cellules par la ou les acides additionnés ont été mentionnés dans plusieurs travaux. (183)

Dans ce sens, l'addition de PUFA au milieu de culture modifie la composition en acide gras de la totalité des lipides des cellules. (215)

De plus, l'ingestion de 2g d'huile de foie de morue pendant 6 semaines augmente le contenu en EPA et DHA dans les membranes d'érythrocytes chez les hommes les plus âgées (48). Ainsi, les rats normaux et diabétiques nourris avec l'huile de poisson ont montré une augmentation des teneurs en EPA et DHA dans les membranes hépatiques (32'). En

parallèle, la composition en acides gras des phospholipides des cellules mononucléaires chez des volontaires montrent que la supplémentation acides gras de série n-3 pendant 6 semaines provoque une augmentation significative d'EPA avec une réduction dans la teneur d'AA en comparant à ceux avant la supplémentation. Après 10 semaines de la fin de la supplémentation, cette augmentation en EPA et la diminution en AA a été continuée et le rapport de AA/EPA reste toujours altéré quand comparé aux ceux avant la supplémentation. Après 20 semaines d'arrêt de la supplémentation, les teneurs en EPA et AA retournent à leur taux initial. (52).

En revanche, la supplémentation orale d'huile riche en acide arachidonique à lui seule indique d'une augmentation significative des teneurs en AA et EPA au niveau de la fraction lipidique du plasma. L'augmentation de l'EPA peut être expliquée par le blocage de la conversion d'EPA à DHA en présence d'un excès d'AA. (127) ainsi, au niveau de la fraction phospholipidique du foie, la supplémentation avec la même huile d'AA augmente le taux d'acide arachidonique et diminue le taux d'acide linoléique et DHA en comparant aux témoins (127). Donc, le contenu en PUFA n-3 s'augmente progressivement avec un régime de PUFA n-3, tandis que le contenu en PUFA n-6, incluant l'AA, devient faible malgré l'existence d'une concentration constante en l'acide linoléique qui représente le précurseur de l'AA. Cette observation (effet) est plus marquée chez les macrophages que ceux de plaquettes sanguines (195).

Par ailleurs, la composition en acides gras des lymphocytes humaines montrent que l'AA ensuite le DHA ont présenté en dominance dans la classe du phosphatidyléthanolamine (PE) phospholipidique (16).

La supplémentation de 3 g de DHA et EPA chez les sujets sains peut induire des changements dans la composition en acides gras d'érythrocytes est aussi peut changer la distribution des classes en phospholipides (143), dont le grand changement se voit au niveau des fractions de phosphatidylcholine (PC) et de phosphatidyléthanolamine (PE) du phospholipides d'érythrocytes où augmente le taux du EPA et DHA au niveau du PC (143).

Cependant, Les altérations lipidiques sont plus prononcées sur le côté extérieur de la membrane où la fixation sur les récepteurs et l'activité enzymatique sont localisés, ce qui donne une explication à l'augmentation d'insulinorésistance avec le diabète et l'obésité. (125).

Le taux d'apparition ou de disparition des acides gras n-3 dans les fractions de PC et PE de phospholipides des érythrocytes est différentes dont la lente disparition des acides gras n-3 est observée au niveau du PE qui est localisé dans la couche interne du membrane; pour cela, les processus de renouvellement des acides gras par acylation de lysophospholipide est lente (143). Par contre, PC est localisé principalement dans la couche externe du membrane où le taux de changement du composition en acides gras du PC au niveau des érythrocytes dépend au taux de changement du composition en acides gras du PC au niveau des lipoprotéines plasmatiques qui est relativement rapide (143).

Des auteurs ont montré qu'il y a une relation positive entre le contenu total des acides gras n-3 dans les lipides de plasma et le taux de DHA et de EPA supplémenté. De plus, l'augmentation du taux total du AGPI n-3 spécialement DHA et EPA ont montré que DHA était préférentiellement incorporé dans le phospholipide et le triglycéride et un peu dans EC, tandis que EPA est préférentiellement incorporé dans le PL et EC dans le lipide plasmatique. Ainsi, la proportion d'EPA en lipide plasmatique, plaquettes sanguines et membranes érythrocytes sont aussi augmentées par la supplémentation en DHA et la proportion d'acide linoléique s'augmente en les plaquettes sanguines et les membranes d'érythrocytes lors la supplémentation avec l'huile de DHA. Ces résultats suggèrent la rétroconversion de DHA en EPA (212).

Le profil des acides gras montre des grandes différences en composition d'un tissu à un autre, s'expliqué par différents mécanismes d'incorporation les acides gras en phospholipides et ainsi par différents profils de désaturation et élongation. (108').

Il est trouvé que les lymphocytes des thymus sont plus résistants aux variations des régimes (supplémentation) lipidiques que les lymphocytes spléniques (16). De plus, les cellules mononucléaires périphériques sanguines sont résistantes aux changements du composition en acides gras plus que le plasma lipides. (123).

Ainsi, la composition en phospholipides des plaquettes sanguines sont plus résistants aux variations des régimes alimentaires en comparant aux cellules péritoniales des macrophages et plaquettes (195).

En conséquence, la proportion entre AA et DHA diffère selon différents types des cellules cultivées. Le rapport du DHA/AA est plus bas en plaquettes que les monocytes et les érythrocytes. Ceci indique qu'il existe des différences métaboliques intrinsèques dans divers cellules jouant un rôle dans la détermination de la proportion du AGPI des séries n-3 et n-6, en plus, d'un certain degré de spécialisation est possible relié aux aspects fonctionnels. Par exemple, l'existence d'une proportion élevée d'AA est lié au processus des eicosanoïdes, en revanche, la proportion élevée en DHA existe dans les cellules excitables (155).

Les changements des compositions en acides gras a été observés ainsi chez les hommes et les animaux diabétiques. Sachant que le diabète expérimental est associé avec altération en conversion de l'acide linoléique à l'acide arachidonique. Ces changements et d'autres altérations en composition des acides gras du membrane plasmique et du membrane hépatique et d'autres tissus en diabète, peut contribuer aux les altérations du fonction immunitaire trouvée chez les diabétiques où le diabète est accompagné généralement d'une basse réponse de cellules T (180). Il est rapporté que la proportion de l'acide linoléique s'augmente par contre, son métabolite (AA) se diminue dans le sérum et les lipides membranaires chez les diabétiques de type 2 (165).

En parallèle, la conversion de l'acide linoléique à AA est altéré chez les diabétiques de type 1 mal contrôlés (203).

La relation entre certains composition en acides gras dans le sérum et le risque de développement de DNID peut-être attribué aux facteurs

nutritionnels en plus aux modifications génétiques des enzymes ; ce qui explique la modulation des compositions en acides gras et la sensibilité à l'insuline. (16).

Ainsi, il est rapporté un inverse est significatif corrélation entre divers indices glycémiques (concentration du glucose, HbA_{1c} et les fructosamines) et l'habilité du long chaîne AGPI chez les diabétiques adultes (194).

La composition en acides gras des EC du sérum reflète les qualités moyennes des lipides consommés pendant plusieurs semaines il est trouvé une relation positive et significative entre le contenu des acides gras dans le régime et la proportion des acides gras en EC du serum; ainsi, entre proportion des acides gras dans le sérum EC et le sérum phospholipide. (211). Ainsi, ils ont trouvé que les changements des compositions en acides gras des membranes d'érythrocytes sont en parallèle avec ceux des lipides du sérum (203) et le même chez les PBMCS (123).

De plus, il existe une relation directe entre la composition en phospholipides membranaires d'érythrocytes et son comportement sur la rhéologie (agrégation des globules rouges) (100).

La supplementation avec des régimes riche en EPA aux hommes volontaires augmente significativement la concentration d'EPA dans les membranes des cellules mononucléaires périphériques ainsi il y a un petit changement dans la teneur du DHA.. En revanche, l'augmentation en EPA s'accompagne par une réduction dans la proportion du AA. Cette augmentation s'accompagne à tendance d'incorporer le EPA dans

les plasma phospholipides et le cholestérol ester des membranes des cellules mononucléaires périphériques sanguines. (123).

Ainsi, le contenu en AA dans les phospholipides de cellules péritonéale des animaux consommant un régime riche en PUFA n-3 est significativement diminué en comparant aux témoins. (195).

En effet, la réduction dans le contenu de divers acides gras insaturés dans les animaux diabétiques par l'alloxan, peut être causé par la peroxydation des lipides et le faible contenu en AA chez les groupes animaux qui ont traité avec MAX EPA et l'huile de poissons concentrés peut-être causés par l'action inhibitrice d'EPA et DHA sur le métabolisme de l'acide linoléique et son remplacement par EPA et DHA.(127). Chaque effet peut offrir une nouvelle stratégie pour la manipulation sur la composition cellulaire afin d'influencer les réponses et les fonctions cellulaires au désirable direction (215).

Les cellules sont des outils utilisables à comparer l'état in vivo avec le système désigné à évaluer les acides gras soit singulier soit combiné sur la fonction immunitaire in vitro (215).

Afin d'étudier les ranges des doses, préférablement d'utiliser un seul acide gras pour identifier la dose optimale (82). Il est préférable de mesurer les effets de doses – réponse, car le contenu cellulaire en acide gras croît proportionnellement aux quantités des acides gras munis dans le milieu du culture (215). Il est rapporté que une concentration élevées du PUFA n-3 dans l'alimentation des Rats réduit le risque de développement d'insulinorésistance et la consommation habituelle d'huile de poisson est suggérée pour protéger contre le développement

du DNID chez les populations les plus âgés (211). Ainsi, PUFA -3 a été proposé à modifier les fonctions immunologiques comme l'effet de vasodilatation et les propriétés Anti- agrégations. (215).

De plus, l'huile riche en acide arachidonique peut significativement atténuer le développement du diabète induits par alloxane chez les rats wistars dont Le prétraitement avec l'huile d'AA avant l'administration d'alloxane apparaît plus effectif que celles administrées simultanément pour empêcher le diabète (127). Aussi, la consommation élevée du n-3 PUFA conduit aux progressives augmentations dans le contenu du PUFA n-3 avec une réduction dans le contenu du PUFA n-6 chez les PL des cellules péritonéales (195).

Parallèlement, une dose élevée de EPA et DHA peut remplacer l'AA dans les tissus ce qui conduit à réduire le taux d'AA. Ainsi, EPA et DHA peuvent inhiber aussi la conversion de l'acide dihomog- linoléique au AA en supprimant l'activité des enzymes Δ -5 désaturase et le métabolisme du AA aux eicosanoides (127).

En plus, cette effet de réduction en AA due au similarité structurelle dont PUFA n-3 peut remplacer l'AA du tissue de pL par compétition pour acylation du voie pathologique (195).

Des changements majeurs ont apparu dans la composition en acides gras des PL des leucocytes même en petite dose de Max EPA où la proportion d'acide linoléique est plus élevée chez le groupe recevant une dose élevé du Max EPA en comparant au témoin, ainsi il a apparu que le pourcentage d'EPA dans la fraction du phospholipides s'augmente d'une manière dépendante au concentration d'EPA consommé (81).

Il est noté que une grande doses d'acides gras n-3 est cliniquement inefficace tandis que petite dose apparaît cliniquement efficace qui peut augmenter le taux d'AA, ce qui permet de conclure que tous les deux groupes d'acides gras n-6 et n-3 sont nécessaires pour une structure et une fonction normale de la membrane (82).

De plus, l'effet de petite dose d'EPA sur la membrane cellulaire des globules rouge (et bien sûr d'autre membrane) augmente le taux d'AA et n'est pas le diminué (82). Ainsi, la grande dose d'EPA inhibe l'immunité cellulaire par contre une petite dose n'affecte pas (81).

En effet, une dose élevée du AGPI n-3 (EPA et DHA) est immunosuppresseur qui correspond à 10 % de l'énergie alimentaire. Ce pourcentage est plus élevé que celui trouvé dans l'alimentation humaine qui correspond de 5 à 6 % de l'énergie alimentaire chez les Eskimos (81).

D'autres exemples de crétois, qui ont mangé une concentration élevée du acides gras ω -3 ont un taux élevé en AA en leur sang (82). En effet, petite ou moyenne dose d'EPA augmente le taux membranaire en AA.

Ainsi, l'un des mécanismes possibles pour cette augmentation est par inhibition du phospholipase surtout PLA2 (82) qui est libéré l'AA de la phospholipide membranaire (152).

En effet, beaucoup de littérature sur AGPI n-3 peut être besoin a réévalué en prenant en considération la relation entre l'effet biologique et la dose où les animaux nourris généralement avec une grande dose de AGPI n-3 (5-20% d'alimentation). (82).

Enfin, à but d'assurer l'effet de l'acide gras sur le métabolisme et la fonction immunitaire, une concentration de 25 μM ou plus est bien en dans le rangs physiologiques (30 μM – 130 μM) (215).

Donc il faut définir la concentration du PUFA n-3 qui permet de fournir l'effet anti-inflammatoire et minimise la réduction de l'immunité cellulaire(112a).

CHAPITRE III

Détermination de la composition en acides gras des
phospholipides au niveau des membranes érythrocytaires chez
les diabétiques de type 1 et type 2

INTRODUCTION

Les lipides jouent un rôle clé dans la détermination de la fluidité membranaire et les changements en composition lipidique entraînent des altérations importantes sur les fonctions cellulaires (143).

De plus, Les modifications du métabolisme lipidique ont été largement discuté en diabète sucré (149) dont La composition en acides gras des membranes érythrocytaires a été altéré (98). Ces désordres lipidiques sont reconnu comme un indicateur de risque pour l'artériosclérose (214) et intervenir dans le pathogénese des lésions athérosclérotiques(149) en accumulant les lipides dans le paroi des vaisseaux sanguines (214).

Par ailleurs, Le membrane du globule rouge est essentiellement un exemple des membranes plasmiques, qui ont des compositions très similaires à ceux du endothélium vasculaire. En effet, si la membrane érythrocytaire est affectée par le diabète ou l'obésité, l'endothélium peut être aussi affecter conduisant à dysfonctionnement vasculaire.(125).

Ainsi, Les changements des composition en acides gras d'érythrocytes sont similaires avec ceux des lipides du sérum (203). Cependant, les phospholipides et les esters des cholestérols du plasma ainsi le PC et PE des membranes érythrocytaires sont corrélés avec les composition lipidiques des autres membranes cellulaire, ce qui permet d'étudier par les analyses lipidiques des plasma et des membrane d'érythrocyte les effets des acides gras supplémenté par l'alimentation (144).

De plus, La membrane d'érythrocyte forme une barrière entre le plasma et le contenu intérieure des cellules où approximativement,sa

moitié du poids de la membrane d'érythrocyte humain est constitué des lipides qui sont formé deux feuillets. Par ailleurs, le membrane contient des pompes et des canaux pour faciliter les mouvements du sodium, potassium et calcium ainsi facilité le transport du glucose et d'autre petites molécules.(98),(144)

Les diabétiques de type 1 et type 2 présentent désordres dans le fonctionnement cellulaire qui se résume par une réduction de la déformabilité d'érythrocyte conduisant à réduire l'influx sanguin avec une augmentation dans la viscosité du sang qui est corrélé avec les microangiopathie.(98) ainsi, provoque une augmentation des protéines glycosylées et la peroxydation des lipides(106).

Lors du diabète, l'exposition longtems des membrane d'érythrocyte aux stress conduit à une augmentation de la lipoperoxydation de la membrane qui provoque une réduction dans la vie cellulaire (hypercoagulabilité,et augmente l'adhésions aux cellules endothéliales).(149).

L'altération du quantité des antioxydants chez les diabétiques peut augmenter la lipoperoxydabilité.(149) Le changement peroxydative de la composition lipidique du membrane d'érythrocyte peut causer des perturbations sanguines qui jouent un rôle important de l'altération du flux microvasculaire et peut provoquer des complications chez les patients diabétiques .la plupart des dysfonctionnements de la membranes d'érythrocyte est due au stress oxydatif qui entraîne une augmentation dans les produits finals des acides gras peroxydé (AGPI) tel le malondialdehyde (112).

Lors du diabète, nombreuses anomalies sanguins sont rapportés (56). Ces perturbations dues aux altération du composition lipidiques des membranes d'érythrocytes et/ou fluidité membranaire.(56) Il est reporté que il y a une augmentation du rapport du cholestérol /phospholipide chez les érythrocytes diabétiques ce qui diminue la fluidité (113).

Ainsi, une réduction de l'activités de l'ATPase $\text{Na}^+\text{-k}^+$ a été observé dans le membrane érythrocytaire des diabétiques de type 1 et type 2 . La réduction observé dans l' activité du ATPase $\text{Na}^+\text{-k}^+$ peut être relié à altération qualitative de composition en phospholipide membranaire.(113) La différence des résultats dans la littérature concernant la composition lipidiques d'érythrocyte lors du diabète peut être due à la méthodologie de sélection des patients et les méthodes d'analyses utilisées.(98),(214).

Finalement, dans ce chapitre on a essayé de mettre en évidence les modifications touchant la composition du phospholipide des membranes érythrocytaires chez les diabétiques de type 1 et type 2.

MATERIELS ET METHODES

I- Prélèvements et traitements des échantillons

Les prélèvements de sang se font comme il a décrit précisément en chapitre 2. Après l'isolement du lymphocytes par la méthode décrit par Hay et Westwood (2002) et l'élimination du isolymphe (solution de séparation), un volume de 3 ml du culot sanguin à été récupéré dans une autre tube. Le culot obtenu est levé 3 fois de suite avec une solution tampon isotonique à pH =7.8 contenant (150mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM Tris). Ensuite, une hémolyse des globules rouges est obtenu grâce une solution tampon hypotonique pH =7.8 contenant (7mM NaCl, 71mM EDTA, 10mM Tris).

Après une centrifugation à 3000 tr/min pendant 15 min et lavage avec l'eau distillé, les membranes sont récupérés sous formes du culot.

II- Détermination des la composition en acides gras des phospholipides des membranes

L'extraction de lipides membranaires se fait par la méthode de Bligh et Deyar (1959) en utilisant un mélange du méthanol : chloroforme : chlorure de sodium (1:1:0.9,V:V:V) avec 0.01% (P/V) du BHT comme un antioxydant .

Après l'évaporation totale du solvant, les phospholipides sont séparés du lipides totaux par une chromatographie sur couche mince. Une concentration par référence au standard interne (acide heptanoïque, 17:0) à été ajouté à chaque fraction phospholipidique. Après une saponification et méthylation, la composition en acides gras est déterminée par une chromatographie en phase gazeuse comme il a été déjà mentionné en chapitre 2.

L'indentification des acides gras est réalisée par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux de standards d'acides gras.

III- Analyse statistique

Les résultats obtenus sont exprimés sous forme de moyenne \pm ES (standard erreur). Après analyse de variance, la comparaison des moyennes entre les diabétiques et les témoins est réalisée par le test « t » de student. On utilise le test « t » indépendant pour comparer entre les diabétiques et témoins d'une part et entre les diabétiques de type 1 et type 2 d'autre part.

La valeur P est significativement différentes quand $P < 0.05$ et hautement significative $P < 0.001$.

Tous les analyses sont réalisés à l'aide d'un programme statistique informatisé SPSS (Chicago, 2001, USA).

RESULTATS ET INTERPRETATION

I- Composition en acides gras des phospholipides des membranes des globules rouges

1-Teneurs en acides gras saturé

Aucune différence significative n'a été observée pour les teneurs en acides gras saturés entre tous les groupes étudiés (diabétiques et non diabétiques). Par contre, une augmentation significative en l'acide myristique (C14:0) a été observée chez les DNID : comparés aux témoins ($P < 0.05$). (figure III.1)

2-Teneurs en acides gras monounsaturés

Une augmentation significative des teneurs d'acides oléiques (C18:1-n-9) a été observée chez les DNID comparés aux témoins ($P < 0.05$) ainsi entre les deux groupes de diabète type 1 et type 2 ($P < 0.05$).

Les résultats sont représentés sur la figure III.2

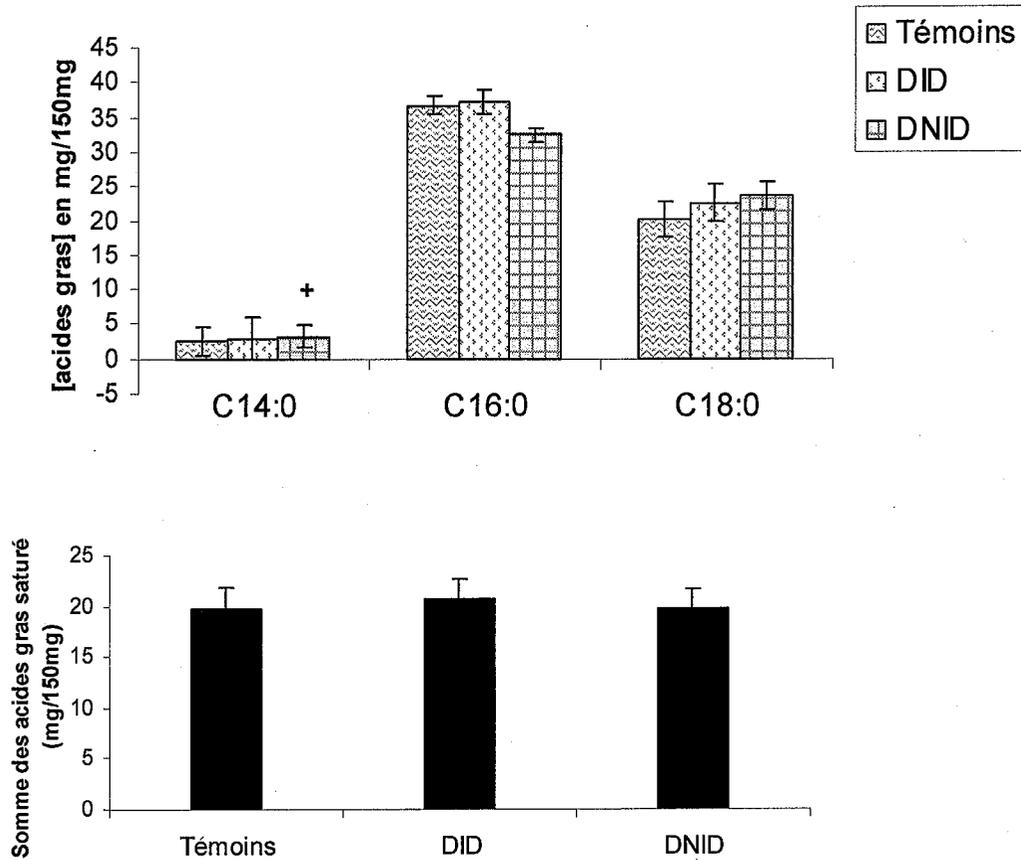


Figure III.1 : Concentrations moyennes des acides gras saturés(C14 :0, C16 :0 et C18 :0) des phospholipides membranaires d'érythrocytes chez les Témoins, DID et DNID. Les valeurs sont exprimés en mg/150 mg des lipides membranaire.

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison significative entre :
 témoins et DID: *p < 0.05; **p < 0.001, témoins et DNID: +p < 0.05; ++p < 0.001
 DID et DNID: # P < 0.05; ## p < 0.001.

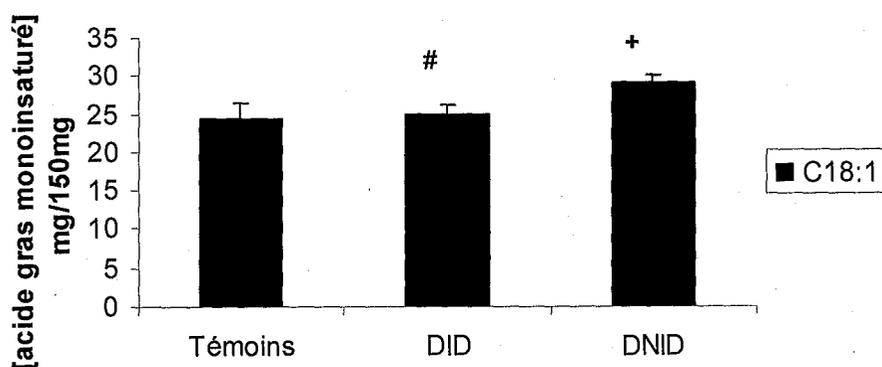


Figure III.2: Concentrations moyennes des acides gras monoinsaturés(C18:1) des phospholipides membranaires d'érythrocytes chez les Témoins, DID et DNID. Les valeurs sont exprimés en mg/150 mg des lipides membranaire.

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison significative entre :
 témoins et DID: *p < 0.05; **p < 0.001, témoins et DNID: +p < 0.05; ++p < 0.001
 DID et DNID: # P < 0.05; ## p < 0.001.

3-Teneurs en acides gras polyinsaturés n-6

Une diminution significative d'acide arachidonique (C20 : 4 n-6) a été noté chez les DIND comparés aux témoins (P<0.05) et au DID (P<0.05). de plus, les teneurs en acides gras PUFA n-6 chez DNID sont significativement plus faibles que les DID (P<0.05).

Les résultats sont représentés sur la figure III.3.

4-Teneurs en acides gras polyinsaturés n-3

Une augmentation significative des teneurs en acide α -linoléique (C18 : 3 n-3) a été observé chez les DNID comparés aux témoins (P<0.05). Par contre, une diminution significative en teneurs des acides eicosapentaénoïques (P<0.05) et docosahexapentanoïques (P<0.001) chez les diabétiques de type 1 et type 2 comparés aux témoins.

Les résultats sont regroupés sur la figure III.4.

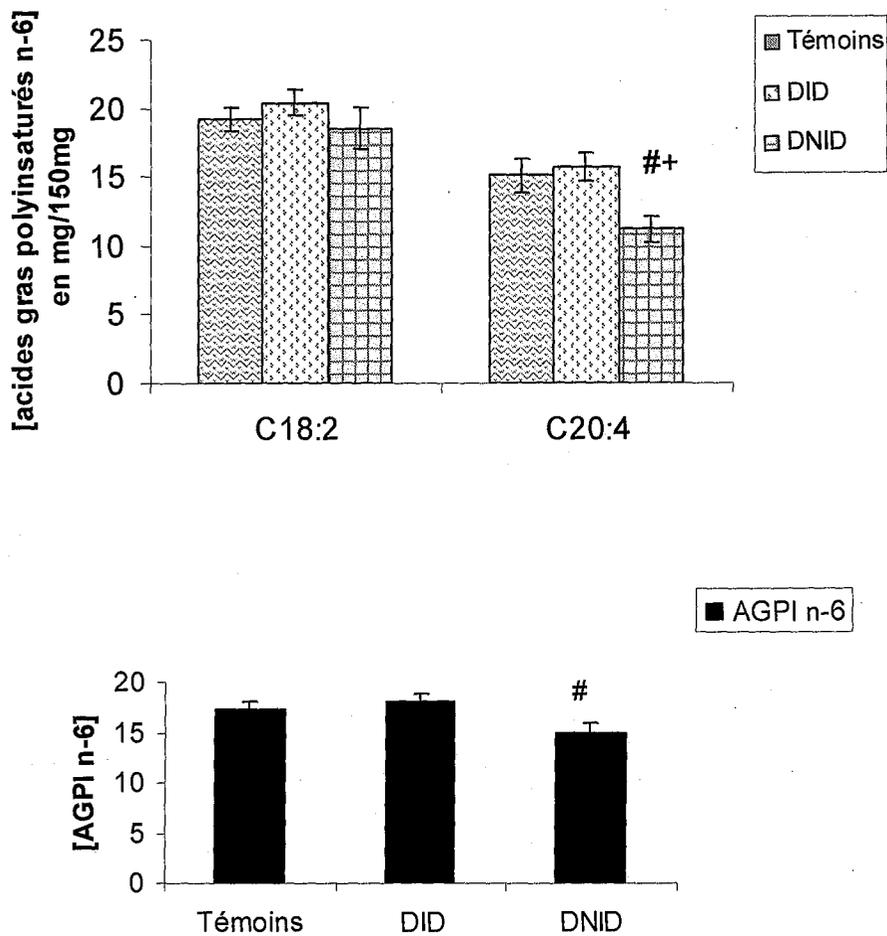


Figure III.3: Concentrations moyennes des acides gras polyinsaturés n-6(C18:2 et C20 :4) des phospholipides membranaires d'érythrocytes chez les Témoins, DID et DNID. Les valeurs sont exprimés en mg/150 mg des lipides membranaire.

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison significative entre :
 témoins et DID: *p < 0.05; **p < 0.001, témoins et DNID: +p < 0.05; ++p < 0.001
 DID et DNID: # P < 0.05; ## p < 0.001.

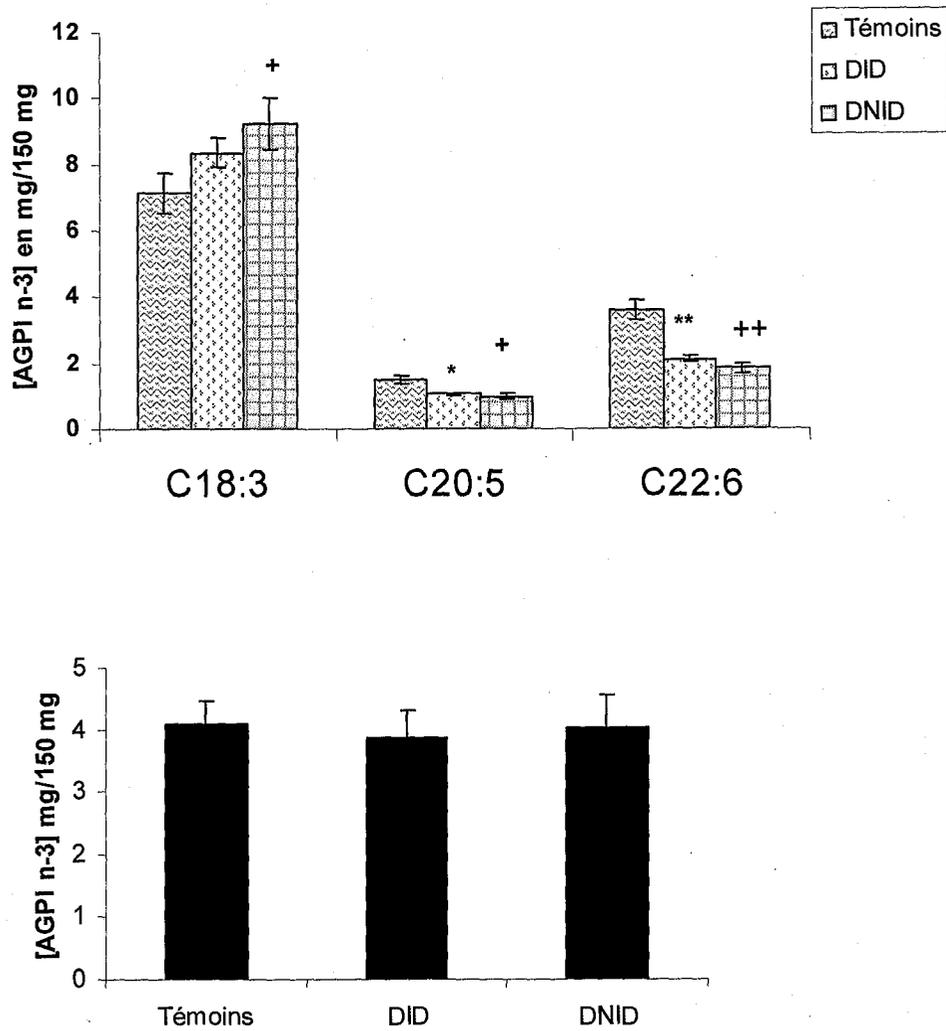


Figure III.4: Concentrations moyennes des acides gras polyinsaturés n-3(C18:3, C20 :5 et C22 :6) des phospholipides membranaires d'érythrocytes chez les Témoins, DID et DNID. Les valeurs sont exprimés en mg/150 mg des lipides membranaire.

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES. La comparaison significative entre :
 témoins et DID: *p < 0.05; **p < 0.001, témoins et DNID: +p < 0.05; ++p < 0.001

DID et DNID: # P < 0.05; ## p < 0.001.

DISCUSSION

La composition en acides gras des nutriments a un impact majeur sur la composition en acides gras des plasma ou plaquettes sanguines et les membranes érythrocytaires. (212), (82), (125).

De plus, l'altération en composition en acides gras du membrane d'érythrocyte est reliée à plusieurs pathologies et l'occurrence du diabète (158).

Les résultats obtenus ont montré que les concentrations des acides gras polyinsaturés sont plus affectés chez les DNID ainsi que les DID comparés au témoins. Des résultats similaires ont été reportés par d'autres études chez les DNID (40) et les DID (202).

Il est observé chez les diabétiques que le taux des lipides peroxydés est élevés, cela indique que la dénaturation du formation du AGPI peut être due à ces radicaux (40).

En plus, il n'y a pas des différences significatives entre la somme des acides gras saturés chez les diabétiques de type 1 et 2 en comparant aux témoins. On observe ainsi que les DNID ont une concentration élevé en l'acide oléique par rapport aux témoins et DID dont l'acide oléique est le principale caractéristiques du régime méditerranéen; Ce qui explique que chez les DNID la consommation généralement à base l'huile d'olive, riche en acide oléique, suivant à les recommandations des leurs médecins en évitant les acides gras saturés tel les graisses d'animaux. Ces dernières résultats sont en accord avec d'autres études (92), (98).

En effet il est rapporté que la nette réduction du taux d'insuline peut offrir cette dénaturation soit comme conséquence à l'insulinorésistance et/ou au la déficience en insuline (qualitative et/ou quantitative). (40).

De plus, l'augmentation de l'acide α -linoléique limite la synthèse d'AA par l'inhibition du $\Delta 6$ désaturase, ainsi $\Delta 6$ désaturase peut être inhiber par l'hyperglycémie observé chez les diabétiques. (92).

Plusieurs études ont montré que l'activité du $\Delta 6$ désaturase a été réduite chez le diabète expérimental ainsi que les deux types du diabète sucré chez l'homme. (92), (202), (194).

Cependant, le changement des composition en acides gras peut être lui-même responsable de cette état chez les diabétiques. Par ailleurs, les acides gras peuvent influencer l'action d'insuline tant que ils sont des précurseurs des eicosanoides (AA et EPA) ce qui permet d'augmenter le taux du prostaglandines E1 (PGE1), prostacycline (PGI2) et PGI3 qui sont des fortes antiagrégant et vasodilatateurs, ce qui empêche le thrombose et l'artériosclérose d'apparaître. (40).

En effet, il est suggère que les altérations observés au niveau des érythrocytes des diabétiques sont due partiellement aux modifications dans la composition des lipides et/ou à la fluidité membranaire car la fluidité est généralement influencé par la relative concentration en cholestérol et phospholipides, la composition en phospholipides ainsi la longue et la structure des acides gras. (214), (92), (144).

Plusieurs études d'analyses la composition en acides gras des érythrocytes ont montré des résultats contradictoires. Des auteurs ont trouvés une faible concentration en acide stéarique et acide palmitique au niveau des érythrocytes des DNID tandis que l'AA reste inchangeable. (98).

D'autres études rapportent que une faible concentration de l'acide linoléique a été trouvé au niveau des phospholipides membranaires du globule rouge avec une concentration élevées des AA. (134).

Par contre, chez les diabétiques DNID tunisien, il y a une augmentation du concentration de l'acide α -linolenic et l'acide myristique. (92) d'où, il est possible que le changement du composition en phospholipide est inclus dans la pathogénéicité du diabète spécialement type 2 (40).

Par ailleurs, d'autres études ont suggéré que la variation de la sensibilité à l'insuline est reliée au contenu du membrane cellulaire en AGPI dont ils ont montré que la diminution de la sensibilité à l'insuline est associé au concentration du AGPI (40).

Il est rapporté aussi que le traitement des diabétique avec l'huile de poisson riche en n-3 AGPI peut être réussir à traiter ce déficience en AGPI n-3. (212), (202) ou la quantité et la degré d'une saturation des acides gras jouent un rôle important en déterminant les propriétés physiques des membranes, la fluidité, perméabilité et le fonctionnement des récepteurs et l'attachement des enzymes membranaires (110), (158). Ainsi, Il est rapporté que l'AA est augmenté dans la membrane d'érythrocyte avec une petite dose d'EPA. (82).

Enfin, l'altération dans le profil des acides gras peut jouer un rôle en diminuant la déformabilité cellulaire dont la capacité d'érythrocytes d'entrer et passer dans les petites capillaires est réduite, entraînant un occlusion vasculaire et ischémie. (98). Ainsi, la modification de la composition lipidique en membrane peut influencer significativement la flexibilité mécanique de la globule rouge et la perméabilité membranaire

passive des cations (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}). (98). Chez les DID ainsi les DNID, il y a une diminution dans l'activité du pompe de sodium au niveau érythrocytaire. (191). De plus, la modification structural de la membrane plasmique affecte aussi l'absorption du glucose. (188).

Finalemt, la composition en acides gras des phospholipides des globules rouges sont corrélé au taux des lipides supplémenté qui se reflète sur la composition du membrane. (158) ainsi, les changements au niveau du phospholipides érythrocytaires peut attribuer à l'effet du diabète lui-même et peut être normaliser par les régimes et les traitements en hypoglycémiant (158) ou insuline (113).

CONCLUSION GENERALE

Nos résultats montrent que le métabolisme lipidique, glucidique et protéique est profondément perturbé par le diabète sucré.

Au niveau sérique, il y a une augmentation significative de glycémie et HbA1c chez les diabétiques de type 1 et 2 et d'une concentration élevée d'insuline chez les diabétiques de type 2 comparé aux témoins, par contre l'insulinémie se diminue chez les DID.

Le profil lipidique sérique du CL, TG sont augmenter chez les DNID tandis que les protéines totales montrent une abaissement significatif chez les DID.

De plus, le diabète provoque des altérations au niveau des différentes fractions lipoprotéiques chez les DNID, il y a une augmentation des TG au niveau des différentes fractions du lipoprotéine en plus, le PT et les masses au niveau du VLDL et CL au niveau du LDL. Par contre, chez les DID, il y a une augmentation en CT, PL et la masse du LDL et le TG du HDL 3 tandis que une diminution du PT au niveau du HDL2 et HDL3 ainsi le PL du HDL2 chez les deux types de diabète.

Il est observé aussi que le taux de cholestérol des LDL est diminué chez les DNID comparé aux témoins.

Par ailleurs, nous avons étudié l'effet du diabète sur les lymphocytes T comme un représentant du système immunitaire pour détecter les modifications faites par le diabète sucré.

Pour cela, les lymphocytes isolés des témoins et des deux groupes de diabètes de type 1 et type 2 sont cultivées dans différentes incubation

pour tester l'effet proliférateur et la concentration d'IL-2 produite dans chaque milieu.

Les résultats obtenus montrent que l'indice de prolifération est significativement diminué chez les diabétiques de type 1 et de type 2 comparé aux témoins quand les lymphocytes sont incubé avec Con A. Par contre, il n'y a pas de différence significative entre les diabétiques et les témoins dans la culture initiale (sans mitogène). En plus, l'addition d'insuline au milieu de culture augmente significativement l'indice de prolifération (PI) chez les témoins et les DNID mais PI reste toujours basse chez les diabétiques que témoins.

La diminution du pouvoir proliférateur chez les diabétiques peut rendre à un effet intrinsèque dans les lymphocytes à cause de diabète. Par contre, la production d'IL-2 est plus élevé chez les lymphocytes stimulés par Con A dans tous les groupes des témoins et diabétiques comparés au culture initiale.

En présence d'insuline, les lymphocytes des témoins montrent un taux élevé de prolifération et une faible concentration d'IL-2 produite comparés à ceux en absence d'insuline. Par contre aucune différences significatives au niveau d'IL-2 produites chez les diabétiques. À partir de ses résultats on peut conclure que l'insuline augmente la lymphoprolifération d'un mécanisme différent que celle d'intervention d'IL-2.

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) de série n-3 et n-6 inhibent la lymphoprolifération chez tous les groupes étudiés cependant, la grande inhibition de PI se fait par EPA ensuite AA et DHA

respectivement chez tous les groupes mais les témoins subis à la plus grande inhibition. En plus, les AGPI n-3 et n-6 ont inhibé la production d'IL-2 chez tous les groupes étudiés tandis que le l'AA est le plus fort inhibiteur ensuite le DHA et l'EPA.

Ainsi, on trouve que la grande inhibition se fait chez les témoins puis les DID et les DNID.

Les effets d'inhibition différents entre l'indice de prolifération et le taux d'IL-2 synthétisé permet de déduire que les AGPI ont inhibé les fonctions des lymphocytes par d'autres mécanismes que celle de la production d'IL-2. De plus la combinaison entre différents AGPI de série n-3 et n-6 permet d'augmenter le PI en présence d'insuline de 4 % à 6 % chez les témoins, de 2 % à 3 % chez les DID et de 3% à 4 % chez les DNID. Cette faible sensibilisation du AGPI à l'insuline peut être améliorée en cherchant la dose et le rapport optimal entre les AGPI n-3 et AGPI n-6.

En outre, enfin d'approfondir nos connaissances sur les variations lipidiques au niveau du membrane lymphocytaire, on a analysé la composition en acides gras des différentes fractions de membrane des lymphocytes : PL, TG et EC chez les témoins les diabétiques de type 1 et type 2.

On observe qu'il n'y a pas une différence significative entre l'acide linoléique dans les différents milieu de culture en présence de DHA , EPA ou AA comparés à ceux en absence de AGPI (puit2) chez les trois groupes étudiés. Ce qui peut expliquer par l'absence d'insuline en milieu de culture provoque l'accumulation de ces acides gras (C18 : 2n-6) dans

la membrane plasmique des lymphocytes. Ces acides gras sont les précurseurs des AGPI dont la synthèse des AGPI se fait par $\Delta 5$ et $\Delta 6$ désaturases qui sont dépendant a l'insuline.

On observe ainsi que la Con A augmente le taux des AGPI au niveau du PL fraction des lymphocytes stimulés chez les diabétiques et les témoins par rapport aux cultures initiales.

On a trouvé ainsi que l'acides linoléique s'intègre principalement dans les fraction de phospholipides et de EC par contre l'acide α -linoléique s'intègre en dominance dans les fractions de PL et TG que les EC.

l'addition d'un acide gras au milieu de culture enrichit les différentes factions lipidiques de PL, TG et EC en cet acide chez les témoins ainsi que chez les diabétiques .

On note que l'addition d'EPA au milieu de culture diminue la proportion d'acide arachidonique dans la membrane plasmique ce qui peut expliquer par la compétition entre les deux séries de n-3 et n-6.

En plus, l'analyse de la composition en acides gras des membranes d'érythrocytes montre que aucun différence significatif n'a été observé pour les teneurs en acides gras saturés pour tous les groupes par contre, il y a augmentation significative des teneurs d'acide oléique chez les DNID comparé aux témoins ce qui peut être expliquer par le remplacement des aliments riches en acides gras saturés par ceux en acides monoinsaturés.

De plus, il y a une diminution significative d'AA chez les DNID comparé aux témoins.

À la fin, une diminution significative des EPA et DHA a été observé chez les diabétiques comparé au témoins.

De ces résultats montrent que les DNID ont les grandes parties des changements au niveau du PL de la membrane érythrocytaire.

Enfin, on peut conclure que le diabète touche toute les cellules et les systèmes de l'organisme ce qui oblige à nous de continuer la recherche pour arrêter cette maladie.

Notre travail nécessite d'approfondir la recherche sur la dose optimale d'acides gras polyinsaturés qui peut régler cette maladie sans réduire d'autres acides tel AA qui est nécessaire à la santé. Ainsi, sur l'effet des AGPI sur les lymphocytes in vivo.

References Bibliographiques

- 1) Abrams j.j., Ginsberg H., Grundy S.M., Metabolism of cholesterol and plasma triglycerides in nonketotic diabetes mellitus, *Diabetes* 31 (1982) 903-910.
 - 1a) Abraham E.C. et al., *Diabetes* 27 (1978) 931
- 2) Abuharfeil N., Sarsour E., Hassouneh M., The effect of sodium nitrite on some parameters of the immune system, *Food and chemical Toxicology* 39 (2001) 119-124
- 3) Ajlouni K., Jaddon H., Batieha A., Diabetes and impaired glucose tolerance in Jordan : Prevalence and associated risk factors, *J. Intern. Med.* 244 (1998) 317-323
- 4) Alberti K., G.M.M., Zimmet P.Z, Definition, Diagnosis and classification of diabetes Mellitus and its complications ; Part 1 : Diagnosis and classification of diabetes Mellitus, Provisional report of a WHO consultation, *Diabet. Med.* 15 (1998) 539-553.
- 5) Alexander J.W; Immunonutrition: The role of w-3 fatty acids, *Nutrition* 14 (1998) 627-633
- 6) Alleva D., Crowe P., Jin L., Kwok W., Ling N., Gottscalk M., Conlon P., Gottlieb P., Putnam A., Gaur A., A disease-associated cellular immune response in Type 1 diabetics to an immunodominant epitope of insulin, *The journal of clinical investigation* 107 (2001) 173-180.
- 7) Arata M., Fabiano de Bruno L., Goncalvez Volpini W., Gagliardi G., Quintans . J., Basabe J.C., Insuline secretion by pancreas of athymic mice injected with peripheral mononuclear cells from insulin-dependent diabetic patients, *Metabolism* 44 (1995) 1435-1441.

- 8) Atkinson M., Maclaren N., The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus, *The new england journal of medicine* 331 (1994) 1428-1436.
- 9) Attia N., Touzani A., Lahrichi M., Balafrej A., Kabbaj O., Girard-Globa A., Response of apolipoprotein AIV and lipoproteins to glycaemic control in young people with insulin-dependent diabetes mellitus, *Diabetic medicine* 14 (1997) 242-247.
- 9a) Barham D. and Trinder P., *Analyst*. 97 (1972) 142-145.
- 10) Barter PH.J., Bryan Brewer Jr, John Chapman M., Hennekens CH. H., Rader D. J., Tall A.R., Cholesteryl ester transfer protein: A novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (2003) 160-167
- 11) Batiha A., Jaddou H., Ajlouni K., Hyperlipidemia in Jordan ; a community- based survey, *saudi Medical Journal* 18 (1997) 279-285.
- 12) Benmansour M., Influence des acides gras alimentaires sur la composition en acides gras des membranes des globules rouges et des lipoprotéines chez les diabétiques de type II de la région de Tlemcen, mémoire de Magister. université de Tlemcen, 2002.
- 13) Berlin E., Bhathena S.J., Judd J.T., Nair P.P., Jones Y., Taylor Ph. R., Dietary fat and hormonal effects on erythrocyte membrane fluidity and lipid composition in adult women, *Metabolism* 38 (1989) 790-796
- 14) Bligh E.G. and Dyer W.J., A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911-917.
- 15) Bottazo G. F., Background paper of the TEAM marking group on diabetes mellitus, The Techno-Economic Analysis Network in the

Mediterranean, coordinated by the JRC- Institute for prospective Technological studies (IPTS), (1999) , Seville, 1-17.

16) Bougnoux PH., Salem N., Lyons C., Hoffman T., Alteration in the membrane fatty acid composition of human lymphocytes and cultured transformed cells induced by interferon, *Molecular Immunology* 220 (1985) 1107-1113.

17) Brenner R.R., Hormonal modulation of $\Delta 6$ and $\Delta 5$ desaturases: case of diabetes, *plefa* 68 (2003) 151-162.

18) Briones E.R., Mao S.J.T., Palumbo B.J., O' Fallon W.M., Chenoweth W., Kottke B.A., A nalysis of plasma lipids and apolipoproteins in insulin-dependent and non insulin-dependent diabetics, *Metabolism* 33 (1984) 42-49

19) Bruckert E., Daniel T., Les hypercholesterolemia: Guide pratique, © Jhon Libbey Eurotext, 1997, Paris, PP. 18,87.

20) Burstein M., Scholnick H.R. , Morfin R., Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions, *J. Lipid. Res.* 11 (1970) 583-

21) Burstein M., Fine A., Atger V., et al, Rapid method for the isolation of two purified subfractions of high density lipoproteins by differential dextran sulphate-magesium chloride precipitation, *Biochem.* 71 (1989) 741-746

22) Burstin D., Handler E., Schindler J., Seals J., Mordes J. Rossini A. Effect Of interlenkin-2 on diabetes in the BB/W or RAT, *Diabetes research* 5 (1987) 163-167.

- 23) Bush-Brafin M.S., Pinget M., Le diabète de type 2, *Médecine Nucléaire – Imagerie fonctionnelle et métabolique* 25 (2001) 102-113
- 24) Calder Ph.C., yaqoob.P., Harvey D.J., Watts A., Newsholme E. A., Incorporation of fatty acids by concanovolin A-stimulated lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity, *Biochem. J.* 300 (1994) 509-518
- 25) Calder PH. C. Effects of fatty acids and dietary lipids on cells of the immune system. *Proceedings of the Nutrition Society* 55 (1996)127-150.
- 26) Calder PH.C., Dietary fatty acids and the immune system, *Lipids* 34 (1999) s137-s140
- 27) Calmarza P., Vella J.C., Lipids, lipoproteins and apolipoprotein (a) isoforms in type 2 diabetic patients, *Journal of cardiovascular risk* 6 (1999). 171-175
- 28) Connor W.E; Do the n-3 fatty acids from fish prevent deaths from cardiovascular disease? *Am.J.Clin.Nutr.* 66 (1997) 188-189
- 29) Cantrell D., Smith K., The interleukin-2 T-cell system : A new cell growth model, *Science* 224.
- 30) Carlson S.E, Docosahexaenoic acid and arachidonic acid in infant development, *Semin Neonatol* 6 (2001) 437-449.
- 30a) Carmena R., Duriez P., Fruchart J.-Ch., Atherogenic lipoprotein particles in Atherosclerosis, *Circulation* 109 (2004) III₂-III₇.
- 31) Casey J., Sturm CH., Impaired response of Lymphocytes from non-insulin. Dependent Diabetics to 1 Taphage L/satre and tetanus. Antigen, *Journal of clinical microbiology* 15 (1982) 109-114.

- 32) Chang F-Y and Shaio M-F. Decreased cell-mediated immunity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Research and clinical practice* (1995), 28, 137-146.
- 33) Chapman J.M., Guerin M., CETP, a key player in atherogenic dyslipidemia of type II diabetes, *International Congress Series 1262* (2004) 503-506.
- 34) Christ E.R., Carroll P.V., Albany E., Umpleby A.M., Lumby p.j, Wierzbick A.S., Simpson H.L., Sonksen P.H., Russell-Jones D.L., Normal VLDL metabolism despite altered lipoprotein composition in type 1 diabetes mellitus, *Clinical Endocrinology* 55 (2001) 777-787
- 35) Ciampolillo A., Guastanacchia E., Caragiulo L., Lollino G., De Robertis O., Lattarzi V., Giorgino R., In vitro secretion of interleukin-1 B and interferon- γ by peripheral blood Lymphomononuclear cells in diabetic patients, *Diabetes research and clinical practice* 21 (1993) 87-93
- 36) Coico R., Sunshine G., Benjamini E., *Immunologie: A short course*, 5^{ème} edition, © John Wiley & Sons. Inc, 2003, Canada, PP.135, 144,150,161.
- 37) Couillard Ch., Bergeron N., Bergeron J., Pascot A., Mauriege P., Tremblay A., Prud'homme D., Bouchard C., Despres J-P., Metabolic heterogeneity underlying postprandial lipemia among men with low fasting high density lipoprotein cholesterol concentrations, *JCE & M.* 85 (2000) 4575-4582
- 38) Daimon M., Ji G., Saitoh T., Oizumi T., Tominaga M., Nakamura T., Ishii K., K., Matsuura T., Inageda k., Matsumine H., Kido T., Htay L.,

kamatani N., Muramatsu M., Kato T., Large-scale search of SNPs for type 2 DM susceptibility genes in a Japanese population, *Biochem. Biophysic. Res. Commun.* 302 (2003) 751-758

39) Daneman D., Zinman B., Elliott E., Bilan Ph., Klip A., Insulin-stimulated glucose Transport in circulating mononuclear cells from nondiabetic and IDDM subjects, *Diabetes* 41 (1992) 227-235.

40) Das U.N, Essential fatty acid metabolism in patients with essential hypertension, diabetes mellitus and coronary heart disease, *prostaglandins Leukot. Essent. Fatty acids* 52 (1995) 387-391

41) Das U.N, A defect in the activity of Δ^6 and Δ^5 desaturases may be a factor predisposing to the development of insulin resistance syndrome, *Prostaglandins, Leukotriens and essential acids* 72 (2005) 343-350.

42) De Pablo M., De Cienfuegos G.A., Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions, *Immunology and cell Biology* 78(2000) 31-39.

43) Delespesse G., Duchateau J., Bastenie P.A., Lauvaux J.P., Collet H., Govaerts A., Cell-mediated immunity in diabetes mellitus, *Clin. Exp. Immunol.* 18 (1974) 461-467.

44) Denys A., Hichami A. and Khan N.A. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid modulate MAP kinase enzyme activity in human T-cells. *Mol. Cell. Biochem* 232 (2002) 143-148.

45) Desrumaux C., Athias A., Bessede G., Verges B., Farnier M., Persegol L., Gambert PH., Lagrost L., Mass concentration of plasma phospholipid transfer protein in normolipidemic, type IIa hyperlipidemic, type IIb hyperlipidemic, and non-insulin-dependent diabetic subjects as

- measured by aspecific ELISA, *Arterioscler. Thromb. Vas. Biol.* 19 (1999) 266-275
- 46) Dieplinger H., Zechner R., Kostner G.M., The in vitro formation of HDL₂ during the action of LCAT: the role of triglyceride-rich lipoproteins, *J. Lipid. Res.* 26 (1985) 273-282
- 47) Drell D.W., Notkins A.L., Multiple immunological abnormalities in patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus, *Diabetologie* 30 (1987) 132-143.
- 48) Driss F., Darcet ph., Delhaye N., Mendy F., Effect of eicosapentaenoic acid on RBC filterability and fatty acid composition , *clinical Hermorheology* 8 (1988) 679-685.
- 49) Dullaart R.P.F., Plasma lipoprotein abnormalities in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus, *Netherlands J. Med.* 46(1995) 44-54
- 50) Dutta-Roy A.K., Cellular uptake of long-chain fatty acids: role of membrane associated fatty- acid- lunding, transport proteins, CMLS, *cell.Mol. Life Sci,* 57 (2000) 1360-1372.
- 51) Ellis T., jodoïn E., ottendorfer E., ottendorfer E., Salisbury P., she J., Schatz D., Alkinson M., Cellular immune responses against proinsulin : No evidence for enhanced reactivity in individuals with IDDM, *Diabetes* 48 (1999) 299-303.
- 52) Endres S. Ghorbani R., Kelley V., Georgilis K., Lonnemann G., Meer J., Cannon J., Rogers T., Klempner M., Weber P., Schaefer E., Wolff S., Dianarello C., The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interlenkin-1 and tumor

- necrosis factor by mononuclear cells, the new england journal of medicine 320 (1989) 266-27 53)
- 52a) Esders T. W., Michrina C.A., J. of Biol. Chem. (1979) 254-271
- 53) Faustman D., Eisenbarth G., Daley J., Breitmeyer J., Abnormal T-lymphocyte subsets in type I diabetes, Diabets 38 (1989) 1462-1468.
- 54) Fisher B.M, Smith J.G., Mccruden D.C., Frier B.M., Responses of periperal blood cells and Lymphocyte subpopulations o insulin-induced hypoglycoemia in human insulin-dependent (Type 1) diabetes, European journal of clinical investigation 17 (1987) 208-213.
- 55) Forgue D., Carel J., Bougnères P., Guillet J., Boitard C., T-Cells response to proinsulin and insulin in type 1 and pretype 1 diabetes, journal of clinical immunology 19 (1999) 127-134.
- 56) Freyburger G., Gin H., Heape A., Juguelin H., Boisseau M.R., Cassagne C., Phospholipid and fatty acid composition of erythrocytes in type 1 and type 2 diabetes, Metabolism 38 (1989) 673-678.
- 57) Fujimoto W.Y., The importance of insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus, Am. J. Med. 108 (2000) 9s-14s
- 57a) Gabbay K.H. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 44 (1977) 859.
- 58) Garvey T., Olefsky J.M., Griffin J., hamman R.F., Kolterman O.G., The effect of insulin treatment on insulin secretion and insulin action in type II diabetes mellitus, Diabetes 34 (1985) 222-234.
- 59) Ginsberg H.N., Lipoprotein physiology in nondiabetic and diabetic states: Relationship to atherogenesis, Diabetes care 14 (1991) 839-855
- 60) Giordano C., PanTo F., caruso C., Modica M., Zambito A., sapienza N., AmaTo M., Galluzo A., Interlenkin 2 and soluble interlenkin 2-

receptor secretion defect in vitro in newly diagnosed type I diabetic patients, *Diabetes* 38 (1989).

61) Giordano C., Panto F., Caruso C., Modica M.A., Zamluto M., Saprienza N., Amato M.p, Galluzzo A., Interleukin 2- receptor secretion defect in vitro in nearly diagnosed type 1 diabetic patients., *diabetes* 38 (1989) 310-315.

61a) Gonen E and Rubenstein A.H., *Diabetologia* 15 (1978) 1.

62) Grimaldi A., Heurtier A., Epidémiologie des complications cardiovasculaires du diabète, *Diabetes & Metabolism* 25 (1999)12-20

63) Grimble R. F., Modification of inflammatory aspects of immune function by nutrients, *Nutrition Research* 18 (1998) 1297-1317.

64) Grimble R.F., Nutritional modulation of immune Function, *Proceedings of the nutrition society* 60 (2001) 389-397.

65) Groop L.C., Insulin resistance: the fundamental trigger of type 2 diabetes, *Diabetes, Obesity and Metabolism* 1(1999) s1-s7.

66) Grundy S.M; Laveille G.A; Van Horn L; Williams Ch.L; Booth S.L ; Directory fat consumption and health, *Nutrition Reviews* 56(1998) S₃ - S₂₈ .

67) Guerci B, Bohme P., Kearney-Schwartz A., Zannad F., Drouin P., Endothelial dysfunction and type 2 diabetes, *Diabetes Metab.* 27 (2001) 436-447

68) Guerci B., Ziegler O., Drouin P., Hyperlipidémie au cours du diabète: Notions récentes, *Press Med* 23 (1994) 82-88

- 69) Guérine M., Le Goff W., Lassel T.S., Tol A.V., Steiner G., Chapman M.J., Proatherogenic role of elevated CE transfer from HDL to VLDL₁ and dense LDL in type 2 diabetes: impact of the degree of triglyceridemia, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21(2001) 282-288
- 70) Guermouche B., Yessoufou A., Soulimane N., Merzouk H., Moutairou K., Hichami A., Khan N.A., n-3 Fatty acids modulate T-cell calcium signal in obese macrosomic rats, *obesity research* 12 (2004) 1744-1753.
- 71) Guermouche B.Ch., Role des acides gras polyinsaturés alimentaires dans la modulation du système immunitaire chez la rate gestante diabétique et chez ses nouveaux-nés., Thèse du doctorat, université de Tlemcen, 2006.
- 72) Haban P., Zidekova E., Klvanova J., Supplementation with long-chain n-3 fatty acids in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients leads to the lowering of oleic acid content in serum phospholipids, *Eur. J. Nutr* 39 (2000) 201-206.
- 73) Hall J.A; Henry L.R; Jha S; Skinner M.M; Jewell D.E; Wander R.C; Diatary (n-3) fatty acids alter plasma fatty acids and leukotriene B synthesis by stimulated neutrophils from healthy geriatric beagles, *Prostaglandins, leukot.Essent. Fatty acids* 73 (2005) 335- 341
- 74) Handberg A., Glucose transporters and insulin receptors in skeletal muscle : physiology and pathophysiology, *Danis medical bulletin* 42 (1995) 211-226.

- 75) Harbige L.S. Dietary n-6 and n-3 fatty acids in immunity and auto-immune disease. *Proceedings of the Nutrition Society* (1998), 57, 555-562.
- 76) Harris W.S; Nonpharmacologic treatment of hypertriglyceridemia: Focus on Fish oils, *Clin.cardiol.* 22 (1999) II-40 – II-43
- 77) Hay F.C., Westwood O.M.R, *Practical Immunology*, 4^{eme} edit. 2002, London, pp. 183
- 78) Hedrik C.C., Thorpe S.R., Fu M.-X., Harper C.M., Yoo J., Kim S.-M., Wong H., Peters A.L., Glycation impairs high-density lipoprotein function, *Diabetologia* 43 (2000) 312-320
- 79) Heukamp I., Kilian M., Gregor J.I, Kiewert C., Schimke I., Kristiansen G., Walz M.K., Jacobi C. A., Wenger F.A., Impact of polyunsaturated fatty acids on hepato-pancreatic prostaglandin and liver metastasis ?, *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty acids* 74 (2006) 223-233.
- 80) Hinds A., Sanders T.A.B, The effect of increasing levels of dietary fish oil rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on lymphocyte phospholipd fatty acid composition and cell-mediated immunity in the mouse, *British Journal of Nutrition* 69 (1993) 423-429
- 81) Holter W., Schwarz M., Cerwenka A., Knapp W., The role of CD2 as a regulator of human T-cell cytokine production, *immunological reviews* 153 (1996) 107-122.
- 82) Horrobin D.F., Jenkins K., Bennett C.N., Christie W.W., Eicosapentaenoic acid and arachidonic acid; Collaboration and not antagonism is the key to biological understanding, *prostaglandins, leukot*

Essent . Fatty acids 66 (2002) 83-90

83) Horrocks L.A; YEOY.K; Health benefits of docosahexanoic acid (DHA), Pharmacological research. 40 (1999) 211-225

84) Hu F.B., Dam R.M.V., Liu S., Diet and risk of type II diabetes: the role of types of fat carbohydrate, Diabetologia 44 (2001) 805-817

85) Hughes D.A; Piper Z.; Lund E.K; N-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) modulate the expression of functionally associated molecules on human monocytes, Biochemical society transactions 23 (1995) 3035

86) Igau B., Castro G., Clavey V., Slomianny Ch., Régis B., Drouin P., ruchart J-Ch., Fiévet C., In vivo glucosylated Lp A-I subfraction: Evidence for structural and functional alterations, Arterioscler.Thromb.Vasc. Biol. 17 (1997) 2830-2836

86 a) Jeffrey & All

87) Jenkins A.B., Campbell L.V., The genetics and pathophysiology of diabetes mellitus type II, J. Inherit. Metab. Dis. 27 (2004) 331-347

88) Jolly ch. A, Jiang X-H, Chapkin R. S., Mc Murray D.N, Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids suppress Murine lymphproliferation, Interleukin -2 secretion, and the formation of diacylglycerol and ceramide, J. nutr. 127 (1997) 37-43.

89) Joshi N ; Caputo G ; Weitekamp M.R; Karchmer A.W; Infections in patients with diabetes Mellitus; N. engl.J . Med 341 (1999) 1906-1913.

90) Kahloula K., Aspect qualitatif et quantitatif des sous fractions lipoproteiques HDL2 et HDL3 et l'avtivité de l'enzyme Lecithine Cholesterol Acyl Transferase (LCAT) chez les diabetiques de type I et

type II de la région de Tlemcen, memoire de Magister.université de Tlemcen,

91) Kamal Eldin A., Yanihlieva N., N-3 fatty acids for human nutrition: stability considerations, *Eur.J. lipid sci. Tchnol.* 104 (2002) 825-836.

92) Kassab A., Frechichi S., Amira D., Hammeni M., Laradis S., Miled A., Plasma phospholipids fatty acids composition in Tunisian diabetes type 2, *Arab J. clin . ab . Irnest.* 1 (2004) 69-78

93) Kaye W., Adri M.N.S., Soeldner S., Rabinowe S., Kaldany A., Kabn R., Bistran B., Srikanta S. Ganda P., Eisenbarth G., Acquired defect in interlenkin-2 production in patients with type I diabetes mellitus, *The nex england journal of medecine* (1986).

94) Khatib O., Non communicable diseases risk factors and regional strategies for prevention and care, *La revue de santé de la méditerranée orientales* 10 (2004) 778-788.

95) King H., Aubert R.E., Herman W.H., Global Burden of diabetes, 1995-2025; Prevalence, numerical estimates, and projections, *Diabetes care*, 21 (1998) 1414-1430.

95a) Kolb H., Zielasek J., Treichel U., Freytag G., Wrann M., Kiesel U., Recombinant interleukin 2 enhances spontaneous insulin- dépendent diabetes spontaneous insulin –dependent diabetes in BB rats, *Eur.J. Immunol.* 16 (1986) 209-212

96) Kold H., Zielasek J., Treichel U., Freytag G., Wrann M., Kiesel U., Recombinant interteukin 2 enhances spontaneous insulin-depent diabetes in BB rats, *Eur.J.Immunol* 16 (1986) 209-212.

- 97) Kruger. M. C, Schollum L.M., Is docosahexaenoic acid more effective than eicosapentaenoic acid for increasing calcium bioavailability?, *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty acids* 73 (2005) 327-334.
- 98) Kulacoglu D.N., Kocer I., Kurtul N., Keles S., Baycal o., Alteration of fatty acids composition of erythrocyte membrane in type 2 diabetes patients with diabetic retinopathy, *Jpn. J. ophthalmol.*47 (2003) 551-55
- 99) Kunkel S.L., Chensue S.W., Prostaglandins and the regulation of immune responses, *Advances in inflammation research.* 7 (1984) 93-109.
- 100) Labrouch S., Freyburger G., Gin H., Boisseau M.R., Cassagne C., Changes in phospholipid composition of blood cell membranes (erythrocyte, platelet, and polymophonuclear) in different types of diabetes-clinical and biological correlations, *Metabolism* 45 (1996) 57-52.
- 101) Lazarus D, Trimble L., Moldawer L., The métabolic effects of pokeweed mitogen in nice, *Metabolism* 47 (1998) 75-82.
- 102) Le Roith D., β - cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes: Role of metabolic and genetic abnormalities, *Am. J. Med.* 113 (2002) 3S-11S
- 103) Lee K., Nitric oxide produced by macrophages mediates suppression of conA-induced proliferative responses of splenic leukocytes in the diabetes-prone BB rat, *Diabetes* 43 (1994) 1218-1220.
- 104) Leonhardt W., Hanefeld M., Muller G., Horda C., Meissner D., Lattke, Paetzold A., Jaross W., Schroeder H-E., Impact of concentration of glycated hemoglobin, α -tocopherol, copper, and manganese on

- oxidation of low-density lipoproteins in patients with type I diabetes, type II diabetes and control subjects, *Clinica. Chemica. Acta* 254 (1996) 173-186
- 105) Lichtenstein A.H; Kennedy E; Barrier PH; Danford D; Ernst N.D;
- 106) Linderkamp O ., Ruef P ., Zilour E.P ., Hoffman G.F ., Impaired deformability of erythrocytes and neutrophils in children with nearly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus, *Diabetologia* 42 (1999) 865-869
- 107) Llorente L., De La Fuente . H., Richand-Patin y., De La Berrera, Diaz-Borjon . A., Lopez-Ponce A., Lerman- Garber I., Jakez- Ocampo J., *Immunology letters* 74 (2000) 239-244.
- 108) Ly. L.H., Smith R., Suritzer K.C., Chapkin R.S., Mc Murray D.N., *Prostaglandins, Leukot, Essent. Fatty acids* 74 (2006) 29-37.
- 109) Maluish A., Strong D., Lymphocyte proliferation ; in Rose N.R. and Freidman H., *Manual of clinical laboratory immunology*, 1986, 3^{ème} édition, Washignton, USA.
- 110) Manku M.S., Horrobin D.F., Huang Y.S, Morse N., Fatty acids in plasma and red cell membranes in normal humans, *lipids* 18 (1983) 906-908.
- 111) Mari A.T., Effect of diabetes mellitus and glucose imbalances on different in into parameters of immune competence, thèse de magistère, université de science et de technologie, Irbid, Jordan, 2002.
- 111a) Massod M.F, *Am. J. Med. Technol.* 43 (1976) 243
- 112) Mawatari S., Saito K., Murakami K., Takehiko F., Absence of correlation beween glycated hemoglohin and lipid composition of

erythrocyte membrane in type 2 diabetic patients, *Metabolism* 53 (2004) 123-127.

113) Mazzanti L., Rabini R.A., Faloia E., Fumelli P., Bertoli E., DE Pirro R., Altered cellular Ca^{+2} and Na^{+} transport in diabetes Mellitus, *Diabetes* 39 (1990) 850-854.

114) Mc Garry D.J., Disordred metabolism in diabetes: Have we underemphasized the fat component, *J. Cell. Biochem.*, 55s (1994) 29-38

115) McEneny J., O'Kane M.J., Moles K.W., McMaster C., McMaster D., Mercer C., Trimble E.R., Young I.S., Very low density lipoprotein subfraction in type II diabetes mellitus: Alterations in composition and suceptibility to oxidation, *Diabetologia* 43 (2000) 485-493

116) Méghit B.K., Effet du jeûne du ramadan chez les diabétiques non insulino-dépendant (type 2) obèse de sexe féminin, profil biologique et évaluation nutritionnelle, étude prospective et multicentrique, Thèse de doctorat, Université Djilali liabes, 2006-07-11.

118) Merrin P.k, Baynes c., Henderson A., Richmond B., Elkeles R., The effects of gender and type of diabetes on HDL-cholesterol, *Diabete & Metabolisme* 20 (1994) 20-24

119) Merzouk H., L'hypertrophie et la macrosomie du nouveau né à terme s'accompagnant de perturbations importantes du métabolisme des lipides et des lipoprotéines, Thèse du Doctorat, université de Tlemcen, 1999

120) Merzouk H., Madani S., Chabane Sari D., Prost J., Bouchenak M., Belleville, Time course of changes in serum glucose, insulin, lipids and

- tissue lipase activities in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes, *clinical science* 98 (2000) 21-30.
- 121) Merzouk H, Khan N.A., Implication of lipids in macrosomia of diabetic pregnancy : can n-3 polyunsaturated fatty acids exert beneficial effects ?, *clinical science* 105 (2003) 519-529.
- 122) Meydani S.N., Endres S., Woods M. M., Goldin B. R., Soo C., Morrill-Labrode A., Dinarello C. A. and Gorbach SH. L. Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: Comparison between young and older women. *J. Nutr.* 121 (1991) 547-555.
- 123)** Miles E., Banerjee T., Calder P., The influence of different combinations of γ -Linolenic, stearidonic and eicosapentaenoic acids on the fatty acid composition of blood lipids and mononuclear cells in human volunteers, *Prostaglandins, Leukotrienes and essential fatty acids* 70 (2004) 529-538.
- 124) Miles J.M., Lipid fuel metabolism in health and disease, *Current opinion in general surgery* (1993) 78-84
- 125) Min Y., Ghebremeskel K., Lomy C., Thomas B, Cromford, Adverse effect of obesity on red cell membrane arachidonic and docosahexaenoic acids in gestational diabetes, *Diabetologia* 47 (2004) 75-81.
- 126) Mingrone, Henriksen F.L., Gerco A.V., Krogh L.N., Capristo E., Gastaldelli A., Castagneto M., Ferrannini E., Gasbarrini G., Beck-Nielsen H., Triglyceride induced diabetes associated with familial lipoprotein lipase deficiency, *Diabetes* 48 (1999) 1258-1263

- 127) Mohan I.K., Das U.N., Prevention of chemically induced diabetes mellitus in experimental animals by polyunsaturated fatty acids, *Nutrition* 17(2001) 126-151
- 128) Molin PH., Hyperlipoprotéinémies, *la revue du praticien* 51 (2001) 1379-1387
- 129) Moriguchi S., Kato M., Sakai K., Yamamoto S., Shimizu E., Decreased mitogen response of splenic lymphocytes in obese Zucker rats is associated with the decreased expression of glucose transporter 1 (GLUT-1)¹⁻³, *Am. J. Clin. Nutr.* 67 (1998) 1124-1129.
- 130) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65, (1983), 55-63.
- 131) Muir A., Peck A., Clare-Salzler M., Song Y., Cornelius J., Luchetta R., Krischer J. Maclaren N., Insulin immunization of nonobese diabetic mice induces a protective insulinitis characterized by diminished intraislet interferon- γ transcription, *J.Clin. invest.* 95 (1995) 628-634.
- 132) Otton R., Mendonça J.R., Curi., Diabetes causes marked changes in lymphocyte metabolism, *Journal of endocrinology* 174 (2002) 55-61.
- 133) Pascot A., Lemieux I., Prud'homme D., Tremblay A., Nadeau A., Couillard CH., Bergeron J., Lamarche B., Després J-P., Reduced HDL particle size as an additional feature of the atherogenic dyslipidemia of abdominal obesity, *J.Lipid Res.* 42 (2001) 2007-2014
- 134) Pelikanova T., Kazdova L., Chvojkova S., Base J., Serum phospholipid fatty acid composition and insulin action in type 2 diabetic patients, *Metabolism* 50 (2001) 1472-1478

- 135) Pérez A., Caixas A., Carreras G., Mauricio D., Pou J-M., Serrat J., Gomez-Gerique J., Leiva A.D., Lipoprotein compositional abnormalities in type I diabetes: Effect of improved glycaemic control, *Diabetes research and clinical practice* 36 (1997) 83-90
- 136) Peterson L.D., Duinkerken G., Bruining J., Van Lier R, de Vrier R., Roep B., Increased numbers of in vivo activated T cells in patients with recent onset insulin-dependent diabetes mellitus, *Journal of autoimmunity* 9 (1996) 731-737.
- 137) Peterson L.D., Jeffery N.M., Thies F., Sanderson P., Newsholme E.A., Calder P.C, Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids alter rat spleen Leukocyte Fatty acid composition and prostaglandin E2 Production but have different effects on lymphocyte Function and Cell-mediated immunity, *Lipids* 33 (1998) 171-180.
- 138) Piccolella E., Vismara D., Lombardi G., Gueritore D., Piantelli M., Ranelletti F., Effect of glucocorticoids on the development of suppressive activity in human lymphocyte response to a polysaccharide purified from candida albicans, *the journal of immunology* 134 (1985) 1166-1171.
- 138a) Pickup J.C, Crook M.A, Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system?, *Diabetologia* 41 (1998) 1241-1248
- 139) Poisson J-P., Essential fatty acid metabolism in diabetes, *Nutrition* 5 (1989)
- 140) Poisson J-P. G and Cunnane S. Long-chain fatty acid metabolism in fasting and diabetes: relation between altered desaturase activity and fatty acid composition. *J. Nutr. Biochem.* 2 (1991) 60-70.

- 141) Pond. C.M., Adipose tissue and the immune system, Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty acids 73 (2005) 17-30.
- 142) Pontes P.V; Torres A.G; Trugo N.M.F; Fonseca V.M; Sichieri; n-6 and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in the erythrocyte membrane of Brazilian preterm and term neonates and their mothers at delivery, Prostaglandins, Leukot.Essent. Fatty acids 74 (2006) 177-123
- 3) Poppe-Snijders C., Schouten J.A., Van Blittersmijk et Van der Van E.A., Changes in membrane lipid composition of human erythrocytes after dietary supplementation of n-3 polyunsaturated fatty acids. Maintenance of membrane fluidity, Biochimica et Biophysica Acta 854 (1986) 31-37.
- 144) Pöschl J.M.P., Paul K., Leichsenring M., Han S. R., Pfisterer M., Bremer H.J., and Linderkamp O. Effects of dietary supplementation of saturated fatty acids and of n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids on plasma and red blood cell membrane phospholipids and deformability in Weanling Guinea pigs. Lipids (1999), 34, 467-473.
- 145) Proietto J., Filippis A., Nakhla Ch., Clark Stella, Nutrient-induced insulin resistance, Molecular and cellular endocrinology 151 (1999) 143-149.
- 146) Purnell J.Q., Brunzell J.D., Effect of intensive diabetes therapy on diabetic dyslipidemia, Diabetes review (1997), 434-444
- 147) Qi B., Beaudoin F; Fraser T; Stobart A.K; Napier J.A; Lazarus C.N; Identification of a cDNA encoding a novel C18- Polyunsaturated fatty acid- specific elongating activity from the docosahexaenoic acid (DHA) – producing microalga, Isochrysis galbana, FEBS letters 510 (2002) 159-165.

- 148) Qiu X., Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4, 7, 10, 13, 16, 19): two distinct pathways, prostaglandins leukot. *Essent. Fatty Acids* 68 (2003) 181-186
- 149) Rabini R. A., Fumelli P., Galassi R., Dousset N., Taus M., Ferretti G., Mazzanti L., Curatola G., Solera M.L., Valdiguié, Increased susceptibility to lipid oxidation of low-density lipoproteins and erythrocyte membranes from diabetic patients, *Metabolism* 43 (1994) 1470-1474
- 150) Rabinovitch A., Perspectives indiabètes : immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM : therapeutic intervention by immunostimulation ?, *Diabetes* 43 (1994) 613-621.
- 151) Raheja B.S., Sadikot Sh.M., Phatak R., Rao M.B., Significance of the N-6/N-3 Ratio for insulin action in diabetes, *Ann. N.Y. Acad Sci.* 683 (1993) 258-271.
- 152) Ren H., Ghebremeskl K., Okpala I., Ugochukmu C.C., Crawford M., Ibegbunan O., Abnormality of erythrocyte membrane n-3 long chain polyunsaturated fatty acids in sickle cell haemoglobin C (HbSC) disease is not as remarkable as in sickle cell anaemia (HbSS.), *Prostaglandins leukot. Essent. Fatty acids* 74 (2006) 1-6
- 153) Richard L., Delaunay J., Dorleac E., Gillet P., Apolipoprotéines et hémoglobine glycosylée chez le jeune diabétique insulino-dépendant, *Arch. Fr. pediatr.* 40 (1983) 11-14
- 153a) Richmond W., *Clin.chem.* 19 (1973) 1350
- 154) Riemens S.C., Tol A.V., Sluiter W.J., Dullaart R.P.E., Plasma phospholipid transfer protein activity is related to insulin resistance:

impaired acute lowering by insulin in obese type II diabetic patients, *Diabetologia* 41 (1998) 929-934

155) Risé p., Marangoni F., Gallic., Regulation of PUFA metabolism pharmacological and toxicological aspects, prostaglandins, leukot.Essent. Fatty acids 67 (2002) 85-89.

156) Rivellese A.A. Lilli S., Quality of dietary fatty acids, insulin sensitivity and type 2 diabetes, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57 (2003) 84-87

157) Rodier M., Le diabète de type 1, *Medécine Nucléaire – Imagerie fonctionnelle et métabolique* 25 (2001) 94-101

158) Rodriguez Y., Christophe A.B., Effect of diabetes mellitus and different treatments on plasma and Erythrocyte phospholipids fatty acid composition in type 2 diabetics, *Ann. Nutr. Metab.* 48 (2004) 335-342.

159) Roelofsen B., Van Meer G., Op Den Kamp J.A.F., The lipids of red cell membranes: compositional, structural and functional aspects, *Scand.J. clin. Lab. Invest.* 41 (1981) 111-115.

159a) Roeschlau P. Bernt E. et Gruber W.J., *Clin. Chem. Clin. Biochem.* 12, 403 (1974).

160) Sacks F.M., Campos H., Cardiovascular endocrinology: Low-density lipoprotein size and cardiovascular disease: A reappraisal, *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (2003) 4525-4532

161) Sadelain M., Qin H., Sumoski W., Parfrey N., Singh B., Rabinovitch A., Prevention of diabetes in the BB rat by early immunotherapy using Freund's adjuvant, *Journal of autoimmunity* 3 (1990) 671-680.

- 162) Sailaja Devi M.M., Das V.N., Effect of prostaglandins against alloxan-induced diabetes mellitus, prostaglandins, leukot. Essent. Fatty acids 74 (2006) 39-60
- 163) Saker M., Effets des AGPI n-3 exogènes sur polyferation des lymphocytes T et la composition en acides gras des membranes chez les diabétiques, mémoire de magistère, université de Tlemcen, 2003.
- 164) Sala-Vila A; Camoy C; Castellote A.I, Garrido F.J; Rivero M; Rodriguez-Palmero M; Lopez-Sabater M.C; Influence of dietary source of docosahexaenoic and arachidonic acids on their incorporation into membrane phospholipids of red blood cells in term infants, prostaglandins, leukot. Essent. Fatty Acids 74 (2006) 143-148
- 165) Salommaa V., Ahola L. Tuomileho J., Aro A., Pietinen P., Korhonen H.J., Penttilä L., Fatty acid composition of serum cholesterol esters in different Degrees of glucose intolerance : A population-Based study, Metabolism. 39 (1990) 1285-1291.
- 166) San Giovanni J.P., Cem E. Y., The role of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina, Progress in retinal and eye Research 24 (2005) 87-138.
- 167) Sarsour E., The effect of soduim nitrite on some parameters of the immune system of mice, these de magister, Jordan universite of science and technology, 1999
- 168) Sasaki T., Kanke Y., Kudoh K., Misanra Y., Shimizu J., Takita T., Effectsof dietary docosahexaenoic acid on surface molecules involved in T cell proliferation, Biochemica et Biophysica Acta 1436 (1999) 519-530.

- 169) Sasaki T., Kanke Y., Nagahachi M., Toyokawa M., Matsuda M., Shimizu J., Misawa Y., Takita T., Dietary docosahexaenoic acid can alter the surface expression of CD4 and CD8 on T cells in peripheral blood, *J Agric. Foodchem* 48(2000) 1047-1049.
- 170) Schernthaner G., Kostner G.M., Dieplinger H., Prager R., Muhlhauser I., Apolipoproteins (A-I, A-II, B), Lp (a) lipoprotein and lecithin: Cholesterol acyltransferase activity in diabetes mellitus, *Atherosclerosis* 49 (1983) 277-293
- 171) Schloot N.C., Roep B.O., Wegmann D., Yu L., Chase H.P., Wang T., Eisenbart G.S, Altered immune response to insulin in newly diagnosed compared to insulin-treated diabetic patients and healthy control subjects, *Diabetologia* 40 (1997) 564-572.
- 172) Schulze M.B., Facteurs liés à l'alimentation et aux modes de vie, et diabète de type 2, *La Revue Whitehall-Robins* 13 (2004) 1-2
- 173) Sebbagh N., Détermination de la composition en acides gras des membranes des érythrocytes, et des lipides des lipoprotéines chez les sujets diabétiques insulinodépendants (Type I), mémoire de magistère, université de Tlemcen, 2002.
- 174) Seghrouchni I., Draï J., Bannier E., Riviere J.; Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency, *Clinica Chemica Acta* 321 (2002) 89-96/
- 175) Seidell J.C., Obesity, insulin resistance and diabetes – a worldwide epidemic, *British J. Nutr.* 83 (2000) s5-s8

- 176) Seppänen – Laakso T ; Laakso I ; Hiltunen R; Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition, *Analytica chemical Acta* 465 (2002) 39-62
- 177) Serreze D. Hamaguchi K., Leiter E., Immunostimulation circumvents diabetes in NOD/LE Mice, *journal of auto immunity* 2 (1989) 759-776.
- 178) Shah U. Karch L., Baker L., Zier K., Low interleukin-2 synthesis by type 1 diabetics is regulated at the pretranslational level, *Clinical immunology and immunopathology* 61 (1991) 177-190.
- 179) Simopoulos A.P., Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development, *Ann. J. Clin. Nutr.* 54 (1991) 438- 463.
- 180) Singh B., Lauzon J., Venkatraman J., Thomson A.B.R., Rajotte R.V., Clandini M.T., Effect of high/low dietary linoleic acid levels on the function and fatty acid composition of T-lymphocytes of normal and diabetic rats, *diabetes Research* 8 (1988) 129-134.
- 181) Smaoui M., Koubaa N., Hammami S., Abid N., Feki M., Chaaba R., Attia N., Abid M., Hammami M., Association between dietary fat and antioxidant status of tunisian type 2 diabetic patients, *prostaglandins, leukot. Essent. Fatty acid* 74 (2006) 323-329.
- 182) Smith K.a., Interleukin-2: Inception, Impact and implications, *Sciences* 240 (1988) 1169-1176.
- 183) Soulimane-Mokhtari N.A., Guermouche B., Yessoufou A., Saker M., Moutairou K., Hichami A., Merzouk H., Khan N.A., Modulation of lipid metabolism by n-3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetic rats and their macrocosmic offspring, *clinical science* 109

(2005) 287-295.

184) Sowers J.R., Lester M.A., Diabetes and cardiovascular disease, *Diabetes Care* 22 (1999) c14-c20

185) Stein D., Stevenson B., Chhester M., Basit M., Daniels M., Turley S., The insulinotropic potency of fatty Acids is influenced profoundly by their chain Length and degree of saturation, *the american society for clinical investigation* 100 n° 2 (1997) 398—403.

186) Steiner G., The dyslipoproteinemias of diabetes, *Atherosclerosis* 110 (1994) s27-s33

187) Stentz F.B, Kitabchi A. E., De Novo emergence of growth factor receptors in activated human CD_4^+ and CD_8^+ T lymphocytes, *Metabolism*, 53 (2004) 117-122.

188) Stiefel P., Ruiz-Gutierrez V., Gajon E., Acosta D., Garcia-Donas M., Madrozo J., Villar J., carneado J., Sodium transport kinetics, cells membrane Lipid composition, neural conduction and metabolic control in type 1 diabetic patients : change after a low-dose n-3 fatty acid dietary intervention, *Annals of nutrition and metabolism* 43 (1999) 113-120.

189) Storlien L., Hulbert A., Else P., Polyunsaturated fatty acids, membrane function and metabolic diseases such as diabetes and obesity, *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 1 (1998) 559-563.

190) Street N., Mosmann T., Functional diversity of T Lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns,

191) Sureh Y., Das U.N., Differential effect of saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on alloxaninduced

diabetes mellitus, Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty acids 74 (2006) 199-213.

192) Suresh Y. and Das U.N. Protective action of arachidonic acid against alloxan-induced cytotoxicity and diabetes mellitus. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential fatty acids (2001), 64, 1, 37-52.

193) Suresh y., Das U.N., Long-chain polyunsaturated fatty acids and chemically induced diabetes mellitus : effect of ω -3 fatty acids, nutrition 19 (2003) 213-228.

194) Suresh Y. and Das U.N. Long-chain polyunsaturated fatty acids and chemically induced diabetes mellitus: Effect of ω -6 fatty acids. Nutrition (2003), 19, 93-114.

195) Surette M.E., Whelan J., Lu Guoping., Hardard'ottir I., Kinsella J.E, Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids modify Syrian hamster platelet and macrophage phospholipids fatty acyl composition and eicosanoid synthesis; a controlled study., Biochemica et Biophysica Acta 1255 (1995) 185-191

196) Tapiero H., Nguyen Ba. G., Counreur P., Teur K.D., Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies, Biomed Pharmacother 56 (2002) 215-222 .

197) Taskinen M-R., Quantitative and qualitative lipoprotein abnormalities in diabetes mellitus, Diabetes 41 (1992) 12-17

198) Taylor K.G., Wright A.D., Carter T.J.N., Valente A.J. Betts S.A., Matthews K.A., High-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein

A-I levels at diagnosis in patients with non-insulin dependent diabetes, *Diabetologia* 20 (1981) 535-539

199) Tchorzewski H., Glowacka E., Banasik M., Lewkowicz P., Szlapska-Zawodniak M., Activated I diabetes mellitus have different ability to produce interferon-8, interlenkin-6 and interlenkin-10 and undergo anti-CD 95 induced apoptosis after insulin stimulation, *immunology letters* 75 (2001) 225-234.

200) Tebbey P; Buttke T.M; Independent arachidonic acid-mediated gene regulatory pathways in lymphocytes, *Biochemical and Biophysical Research communications* 194 (1993) 862-868.

201) Tichelaar H.Y., Possible relevance of abnormal fatty acid metabolism in undernutrition : the relationship between oleic acid and growth, *Medical hypotheses* 54 (2000) 708-711.

202) Tilvis R., Miettinen T., Fatty acid compositions of serum Lipids, Erythrocytes, and platelets in insulin-dependent diabetic women, *Journal of clinical endocrinology and metabolism* 61 (1985) 741-745.

203) Tilvis R.S., Taskinen M.-R., Miettinen T.A., Effect of insulin treatment on fatty acids of plasma and erythrocyte membrane lipids in type 2 diabetes, *clinica chemica Acta*, 171 (1988) 293-304

204) Triboulot C., Hicami A., Denys A., Khan N., Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids exert antihypertensive effects by modulating calcium signaling in T-Cells of rats, *Nutritional immunology* (2001) 2364-2369.

204a) Trinder P., *Ann. Clin. Biochem.* 6, 24 (1969)

204b) Trivelli L.A. et al., *New. Engl. J. Med* 284 (1971) 353.

- 205) Valverde A.M., Benito M., Lorenzo M., The brown adipose cell: a model for understanding the molecular mechanisms of insulin resistance, *Acta Physiol. Scand.* 183 (2005) 59-73
- 206) Vergès B., Traitement des hyperlipoprotéïnémies au cours du diabète, *STV* 10 (1998) 151-
- 207) Vergès B., Dyslipidaemia in diabetes mellitus, *Diabetes & Metabolism* 25 (1999) 32-40
- 208)** Vergès B., Insulinosensibilité et lipides, *Diabetes Metab* 27 (2001) 223-227
- 209)** Vergès B., Hyperlipidémie des diabétiques, *EMC- Endocrinologie* 1 (2004) 106-116
- 210) Verrotti A., Lobefalo L., Chiarelli F., Mastropasqua L., Pallotta R., Colangelo L., Morgese G., Gallenga P.E., Lipids and lipoproteins in diabetic adolescents and young adults with retinopathy, *Eye* 11 (1997) 876-881
- 211) Vessby B., Aro A., Skarfors E., Berglund L., SIminen I., Lithell H., The risk to develop NIDDM is related to the fatty acid composition of the serum cholesterol Esters, *Diabetes* 43 (1994) 1353-1357.
- 212) Vidgren H.M., Agren J.J., Schwab U., Rissamen T., Hänninen O., Uusitupa M.I.J., Incorporation of n-3 fatty acids into plasma lipid fractions and erythrocyte membranes and platelets during dietary supplementation with fish, fish oil, and docosahexaenoic acid-rich oil among healthy young men, *lipids* 32 (1997) 697-704
- 213) Wang Y., Liu Q., Thorlacius H., Docosahexanoic acid inhibits cytokine-induced expression of P-selection and neutrophil adhesion to

- endothelial cells, *European Journal of pharmacology* 459 (2003) 269-273.
- 214) Watala C. and JÓźwiak Z. The phospholipids composition of erythrocyte ghosts and plasma lipoproteins in diabetes type 1 in children. *Clinica Chimica Acta* (1990),188, 211-220.
- 215) Wiesenfeld P.W., Bahu .U.S.n Donnell W., Effect of long chain acids in the culture medium on fatty acid composition of WEHI-3 and J774A.1 cells, *comparative Biochemistry and physiology Part B* 128 (2001) 123-134
- 216) Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H., Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030, *Diabetes care* 27 (2004) 1047-1053.
- 217) Yamashita N;Maruyama M; Yamazaki K; Hamazaki T; Yano S; Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid natural killer cell activity in human peripheral blood lymphocytes, *clin . Immunol and Immunopathol.*59 (1991) 335-345
- 218) Yaqoob P., Newsholme E.A., Calder ph.C, Influence of cell culture conditions on diet- induced changes in lymphocyte fatty acid composition, *Biochimica et Biophysica Acta* 1255 (1995) 333-3
- 219) Yokono K., Kawase Y., Nagata M., Hatamori N., Baba S., Suppression of concanavalin A-induced responses in splenic lymphocytes by activated macrophages in the non-obese diabetic mouse, *Diadetologia* 32 (1989) 67-73.
- 220) Zier K.S., Leo M.M., Spielman R., Baker L., Decreased synthesis of interleukin 2 (Il-2) in insulin- dependent diabetes mellitus, *Diabetes* 33 (1984) 552-555.

ARTICLE



Effect of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on lymphocyte proliferation, interleukin production and phospholipid fatty acids composition in type 2 diabetic and healthy subjects in Jordan people

A. Alnajjar^{a,*}, D. Chabane Sari^a, N. Abuharfeil^b, M. Hudaib^c, T. Aburjai^c

^aLaboratory of Cellular Biology, Department of Biology, University of Tlemcen, P.O. Box 119, Tlemcen 13000, Algeria

^bLaboratory of Immunology, Department of Biotechnology and Genetic Engineering, Jordan University of Science and Technology, Irbid, Jordan

^cDepartment of Pharmaceutical Sciences, University of Jordan, Amman, Jordan

Received 28 December 2005; accepted 12 March 2006

Abstract

Dietary lipid manipulation may affect a great number of immune parameters, such as lymphocyte proliferation, cytokine synthesis. In this study, lymphocytes of diabetic type 2 were incubated with different polyunsaturated fatty acid (docosahexaenoic, eicosapentaenoic, arachidonic acid) for investigated their effect on lymphoproliferation response, the concentration of interleukin 2 produced in each assay and phospholipid fatty acid composition of lymphocyte membrane.

Our results found that the concanavalin A and insulin increase significantly the proliferative response while eicosapentaenoic, arachidonic and docosahexaenoic acid inhibited that by different degrees: 47%, 37% and 19%, respectively, for healthy subjects and 39%, 29% and 13% for diabetes. However, the concentration of IL-2 produced in presence of either docosahexaenoic, eicosapentaenoic or arachidonic acid was significantly reduced by 36%, 32% and 39%, respectively, in controls while 16%, 15% and 23%, respectively, in diabetics.

On the other hand, the tested fatty acids demonstrated a major impact on the fatty acid composition of different phospholipid fractions of lymphocyte membrane but these fractions were different in their response to each fatty acid examined. For instance, the addition of docosahexaenoic acid to culture media was accompanied with a predominant composition of docosahexaenoic acid in phospholipid fractions.

Also, our results showed a notable increased proportion of arachidonic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in control phospholipid fractions than those of diabetic.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The capacity for nutrients to modulate the actions of the immune system and to affect clinical outcome has become an important issue in clinical practice and public health [1]. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) such as arachidonic acid (AA), docosahexaenoic (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), which constitute cell membrane phospholipids, are important for many biochemical and physiological functions [2,3]. Synthesis of AA acid and DHA occurs in

vivo by desaturation and elongation of linoleic acid (18:2n-6) and α -linolenic acid (18:3n-3), respectively [2].

Lipid biology plays significant roles in the normal and pathological functioning of cells of the mammalian immune system. In addition to the physiological requirement of immune cells for essential fatty acids, dietary fatty acid modulation of the membrane composition and functions of immune cells can affect both normal and pathological processes. In recent years important new concepts in immunoregulation have emerged concerning of fatty acid nutrition on immunity [4].

Fatty acids have many diverse functions in cells; their principal roles are as energy sources and as membrane

*Corresponding author. Fax: +213 43 21 51 96.

E-mail address: alnajjar_as@yahoo.com (A. Alnajjar).

constituents [3,5]. Changing the proportions of different types of fatty acids in cell membranes may alter the fluidity of those membranes [5,6]. Both the fatty acid composition of plasma-membrane phospholipids [5,7] and the fluidity of the plasma membrane are known to affect membrane activities, such as ion and substrate transport, receptor functioning and the activities of membrane-bound enzymes [5,8,9].

Also, n-3 fatty acids might alter T-cell functions [6,10]. The role of essential accessory cells in the process of T-cell activation might be altered by dietary n-3 fatty acids, resulting in reduced antigen processing and presentation and changes in the production of soluble mediators such as IL-1 or prostaglandin E2 [10]. Prostaglandin and other metabolites of arachidonic acid are important local regulators of blood flow [11] and inflammation [6].

In diabetes, atherosclerosis is of particular importance whereas; disturbed lipid metabolism is recognized as one indicator of arteriosclerosis risk [12]. Therefore daily intake of these n-3 fatty acid may protect against atherosclerosis and thrombosis [13,14].

In diabetes mellitus a coordinate set of metabolic changes occurs that severely compromises the utilization of glucose and fatty acids by the cells. The de novo synthesis of fatty acids is diminished. This disturbance is accompanied by a combined decrease in the activities of the principal desaturases responsible for double bond insertion into all three of the long-chain fatty acid families, n-9, n-6 and n-3 [15]. The desaturation process of fatty acids is impaired in diabetes [16]. Animal models of diabetes have provided conceiving evidence that development of diabetes is caused by a breakdown of T-cell tolerance and depends on T-cell function [17].

Insulin is a potent activator of essential fatty acid metabolism [18]. The decrease of Δ -6 and Δ -5 desaturase activities were normalized by insulin injections in experimental diabetic rats [19].

The aim of the present study was to examine effect of DHA, EPA, AA, with and without insulin on T-cell proliferation and interleukin II (IL-2) production, also on the incorporation of fatty acids in phospholipids membrane of lymphocyte.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

The investigated group included 20 patients with type 2 diabetes mellitus (10 men and 10 women), free from recognizable diabetic complications, and 20 controls (10 men and 10 women) were selected from the outpatient diabetes clinic of Jordan health center of sciences and technology. Informed consent was obtained from all subjects after the nature of the procedure was explained.

2.2. Methods

2.2.1. Blood sample

After an overnight fast, blood samples were drawn into evacuated tubes without any additives and also into heparinized tubes.

Serum was promptly separated by centrifugation (1500g for 15 min). An aliquot of serum was preserved with 0.1% EDTA and 0.02% sodium azide for lipoproteins separation and another aliquot was used immediately for determination of cholesterol and triglycerides concentration with enzymatic methods using commercially available kits respectively (Syrbio, 060307038, France; Biolabo, 010321A, France)

Blood glucose was evaluated with enzymatic kit (Arcomex, GL151, Jordan). Insulin was evaluated using a immunologic method (Active[®] insulin ELISA: DSL 10-1600, 02184, USA).

IL-2 was evaluated using Euroclone ELISA kit human IL-2 (euroclone LTD, 0101303FB, UK). An aliquot of heparinized blood was addressed to measure HbA1C by Stanbio laboratory kit (P350-050, USA).

2.2.2. Isolation of lymphocyte T

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from dilute heparinized blood by isolymp (art 7730cfb, Budenheim, Norway) density after centrifugation (800g for 20 min). The plasma was then removed by Pasteur pipette and the buffy coat was washed three times with Hank's solution. After that, the cells were resuspended in 1 ml RPMI 1640 media supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES, 200 µg/ml gentamicine as antibiotics and 25 µg/ml amphotericine B. Viability and count of cells was performed using the trypan blue method. Briefly, 25 µl cells was mixed with 100 µl trypan blue stain (0.4%), then counted under the light microscope at 400× magnification using an improved Cunningham counting chamber. Cells number was adjusted to 2×10^6 cell/ml.

2.2.3. T-cell proliferation assays

Lymphocyte proliferation was performed in flat bottomed 96 well microtiter plates by different treatment with 30 µg/ml concanavalin A (con A, sigma grade); 40 µM of final concentration fatty acid of docosahexaenoic acid (DHA, sigma grade); eicosapentaenoic acid (EPA, sigma grade), arachidonic acid (AA, sigma grade) and 20 µg/ml human insulin described as follows:

Well 1:	150 µl lymphocyte + 150 µl RPMI
Well 2:	150 µl lymphocyte + 30 µl con A + 120 µl RPMI
Well 3:	150 µl lymphocyte + 30 µl con A + 30 µl insulin + 90 µl RPMI
Well 4:	150 µl lymphocyte + 30 µl con A + 30 µl DHA + 90 µl RPMI

- Well 5: 150 μ l lymphocyte + 30 μ l con A + 30 μ l EPA + 90 μ l RPMI
- Well 6: 150 μ l lymphocyte + 30 μ l con A + 30 μ l AA + 90 μ l RPMI
- Well 7: 150 μ l lymphocyte + 30 μ l con A + 30 μ l (40 μ M DHA + 40 μ M EPA) + 90 μ l RPMI
- Well 8: 150 μ l lymphocyte + 30 μ l con A + 30 μ l (40 μ M DHA + 40 μ M EPA) + 30 μ l insulin + 60 μ l RPMI
- Well 9: 150 μ l lymphocyte + 30 μ l con A + 30 μ l (40 μ M DHA + 40 μ M EPA + 40 μ M AA) + 90 μ l RPMI
- Well 10: 150 μ l lymphocyte + 30 μ l con A + 30 μ l (40 μ M DHA + 40 μ M EPA + 40 μ M AA) + 30 μ l insulin + 60 μ l RPMI

The plate was incubated in 5% CO₂ humidified atmosphere at 37 °C for 72 h. After incubation period, 100 μ l of each well was transferred to another plate to test the proliferation index by MTT method [20], then 10 μ l MTT per well was added and the cultures were incubated for a further 4 h for the dye to be metabolized. 100 μ l of the solubilization reagent (0.04 N HCl in isopropanol) was added to each well. Microtiter plates were then read using an ELISA reader (Dynatech MR 5000) at 580 nm.

Proliferation index (PI) was calculated as follows:

$$PI = \frac{\text{absorbance of stimulated cells}}{\text{absorbance of unstimulated cells}}$$

The cell remnant of first plate was collected after washing the plate with RPMI media and centrifuged at 1000g for 10 min to separate the T-cells pellet from the supernatant, which used to determine IL-2 concentration.

2.2.4. Phospholipid analysis of T-cells membrane

Lymphocytes were lysed with cold distilled water. After centrifugation, the membrane pellets were homogenated in chloroform: methanol: NaCl 2 M (1:1:0.9, v/v) with BHT 0.01% (w/v) as antioxidant. Total lipids were extracted by the Bligh and Dyer procedure (1959) [21]. The chloroform phase was aspirated.

Spots phospholipids (PL) were separated by one-dimensional thin-layer chromatography (TLC) on glass plates coated with silica gel 60G (Merck) using hexane-diethyl ether-acetic acid (90:30:1, v/v/v) as a solvent. Spots were visualized by iodine vapor and scraped from the plates. Heptadecanoic acid was added to each lipid fractions. Each fraction was transmethylated with 2 ml of 14% BF₃ in methanol at 80 °C for 15 min and extracted in hexane. The hexane extract was concentrated and injected into a Hewlett-Packard 5890 series II gas chromatograph (Palo Alto, CA) equipped with 30m \times 0.25 mm ID, 0.25 μ m omegawax 250 capillary column (Supelco, Bellefonte, PA). Dried nitrogen was used as a carrier gas (linear

velocity, 1 ml/min). The initial column temperature was 50 °C for 2 min and the increase rate was 4 °C/min until 130 °C for 2 min. The temperature was 250 °C at the injection port and 300 °C at the hydrogen flame ionization detector. Fatty acids methyl ester peaks were identified by comparing their retention times against those of the Supelco standard (37 component FAME mixture, Cat No. 47885-U, Bellefonte, PA).

2.2.5. Statistical analysis

Results for fatty acids are expressed as concentration % (mg/100 mg) and the results are expressed as means \pm SE. Statistical analyses were carried out with the use of SPSS for windows, release 11 (SPSS, Chicago, IL, USA).

Statistical evaluation of differences between the groups was performed by *t*-Student test procedures. Paired test was used to compare the difference within group and the independent *t*-test was used to compare the values of the diabetic group to those of the control group. A *P*-value of less than 0.05 was considered to be statistically significant by two tailed *t*-Student test.

3. Results

The clinical characteristics of the population studied are shown in Table 1.

Body mass index, systolic and diastolic blood pressure (SBP, DBP), and hemoglobin in the diabetics were higher than those in control subjects, but there was no significant difference between them.

Blood glucose, HbA1c, insulin concentration, total cholesterol, triglyceride and LDL cholesterol were significantly higher in diabetic groups as compared with normal subjects (*P* < 0.001) whereas the HDL-cholesterol concentration was significantly lower.

Table 1
Clinical characteristics of study subjects (mean \pm SE)

Characteristics	Controls	Diabetes type 2
No. of subjects	20	20
Male/female ratio	10/10	10/10
Age (years)	33.65 \pm 2.09	38.7 \pm 1.56
BMI (kg/m ²)	25.05 \pm 0.91	27.8 \pm 0.99
SBP	117.25 \pm 1.33	115 \pm 3.44
DBP	77 \pm 1.59	79.25 \pm 1.41
Diabetes duration (years)	—	4.25 \pm 0.51
Fasting glycemia (mmol/l)	4.36 \pm 0.17	8.41 \pm 0.74
Hb (g/dl)	13.38 \pm 0.39	13.56 \pm 0.25
Insulin (μ UI/ml)	7.49 \pm 0.4	10.71 \pm 0.64
HbA1c (%)	5.38 \pm 0.15	8.06 \pm 0.34
Serum triglyceride (mmol/l)	1.08 \pm 0.081	1.36 \pm 0.084
Serum total cholesterol (mmol/l)	4.62 \pm 0.17	5.22 \pm 0.21
LDL-cholesterol (mmol/l)	3.15 \pm 0.11	3.6 \pm 0.14
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.28 \pm 0.05	1.12 \pm 0.04

3.1. Lymphocyte proliferation in different incubations

Fig. 1 shows the proliferation activity of lymphocytes from type 2 diabetic patients and controls under the effect of con A, insulin, docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA) and arachidonic acid (AA) in vitro incubation.

In Table 2, the proliferation index (PI) showed no significant reduction of diabetic lymphocytes as compared with that of controls in basal culture without mitogen.

Using 30 µg/ml of con A as stimulant, a significant increase in PI (22 fold for NIDDM and 29 for controls), was obtained with significant differences between diabetic and normal lymphocyte ($P = 0.001$).

The addition of insulin to culture media increased significantly the PI of both diabetic and controls, respectively ($P = 0.001$ and 0).

On the other hand, incubation of lymphocyte with DHA or EPA as n-3 polyunsaturated fatty acid and AA as n-6 polyunsaturated fatty acid inhibited the PI with different degrees. The greatest inhibition was observed with EPA (39%), followed by AA (29%) and DHA (13%) for diabetic subjects and EPA (47%), AA (37%) and DHA (19%) for healthy subjects as compared with well 2.

The proliferative response was, moreover, significantly reduced by each of EPA, AA or DHA in diabetic patients as compared with those of controls ($P = 0.006$, 0, 0.001), respectively.

Concerning the combination between the different fatty acid; we observed that the addition of DHA and EPA or DHA, EPA and AA cause significant reduction of PI as compared with these in absence of fatty acids, respectively, by ($P = 0.001$, 0) in diabetic and ($P = 0$, 0) in controls.

The addition of insulin to these incubations raised the proliferative response of NIDDM and controls subjects to arrive nearly to well 2 response.

3.2. IL-2 production in different incubations

Fig. 2 shows that there were no differences in IL-2 production between the patients with type 2 diabetes and the normal controls (2193.75 ± 166.23 and 2150 ± 178.25 pg/ml, respectively).

In the presence of con A (Table 3); IL-2 was significantly increased in type 2 diabetic (3.7 fold, $P = 0$) as compared with the basal incubation and (4.5 fold, $P = 0$) for controls while, there was a notable decrease in IL-2 production in the presence of insulin (8% and 25%, respectively).

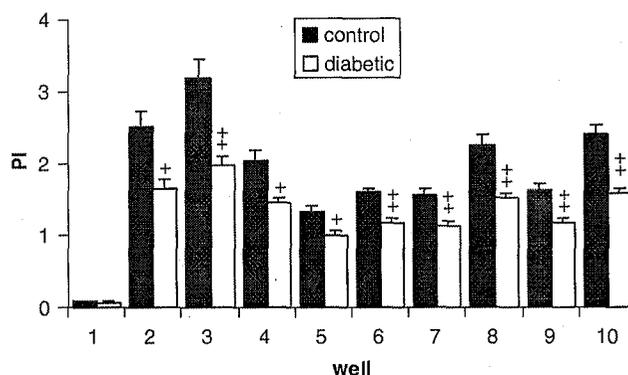


Fig. 1. The effect of different polyunsaturated fatty acid with and without insulin on the lymphoproliferation between diabetic and normal subjects. Results are expressed as means \pm SE. + $P < 0.05$, ++ $P < 0.001$: significant difference between controls and patient.

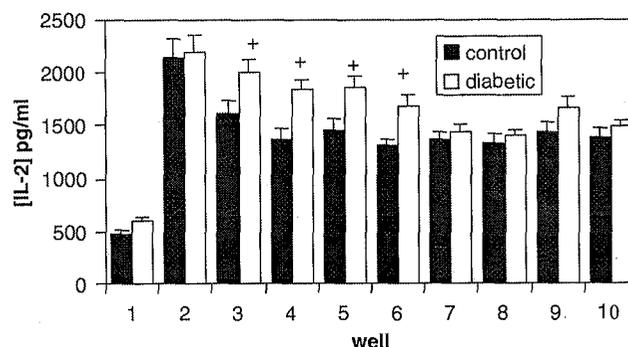


Fig. 2. The effect of different polyunsaturated fatty acid with and without insulin on IL-2 production between diabetic and normal subjects. Results are expressed as means \pm SE. + $P < 0.05$, ++ $P < 0.001$: significant difference between controls and patient.

Table 2
Effect of different treatments on proliferation index of lymphocyte when compared with well 2 in diabetic and healthy subjects

Well No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control	0.087 ± 0.007**	2.53 ± 0.21	3.2 ± 0.254***	2.05 ± 0.154**	1.33 ± 0.087**	1.60 ± 0.056**	1.56 ± 0.084**	2.27 ± 0.136	1.63 ± 0.095**	2.41 ± 0.138
Diabetic	0.075 ± 0.006**	1.66 ± 0.125	1.98 ± 0.118*	1.45 ± 0.07	1.01 ± 0.061**	1.17 ± 0.073**	1.14 ± 0.054*	1.53 ± 0.061	1.18 ± 0.068**	1.59 ± 0.059

Results are expressed as means ± SE. ** are statistically significant in the same group (intragroup) versus control (well 2) $P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively, by a two-tailed paired *t*-test.

Table 3
Effect of different treatments on IL-2 production from lymphocyte when compared with well 2 in diabetic and healthy subjects

Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control	472 ± 40.86**	2150 ± 178.25	1612.5 ± 128.01*	1368.73 ± 102.62*	1462.49 ± 95.92*	1312.5 ± 46.32**	1368.74 ± 73.69*	1331.25 ± 79.75*	1443.75 ± 84.69*	1387.5 ± 79.84**
Diabetic	595.54 ± 50.15**	2193.75 ± 166.23	2006.75 ± 120.24	1837.51 ± 88.37*	1856.25 ± 112.09*	1687.5 ± 105.43*	1443.74 ± 68.15**	1406.25 ± 56.22**	1668.75 ± 96.43*	1481.24 ± 54.86**

Results are expressed as means ± SE. ** are statistically significant in the same group (intragroup) versus control (well 2) $P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively, by a two-tailed paired *t*-test.

Treatments of n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) or n-6 PUFA alone that the concentration of IL-2 produced in presence of either DHA, EPA or AA was significantly reduced by (36%, 32% and 39%, respectively) in control ($P = 0.001, 0.002, 0$) and (16%, 15% and 23%, respectively) in diabetic ($P = 0.03, 0.04, 0.02$) when compared with well 2. We observed also that IL-2 production in controls to be more sensitive to each variation than those in diabetic subjects.

The same decrease pattern was found in those combined fatty acid, whereas the combined n-3 PUFA (DHA and EPA, well 7) was lowered by 36% in control and 34% in diabetes. The addition of insulin to n-3 PUFA (well 8) no significantly depressed the IL-2 production as compared with well 7 in both of controls and patients.

On the other hand, the effect of combined n-3 and n-6 PUFA (DHA, EPA and AA) on inhibition of IL-2 production was 32% in control and 23% in type 2 diabetes compared as well 2. Also, the insulin adding to well 10 increase significantly the inhibition of IL-2 production by 35% in control and 32% in diabetes compared with stimulated con A well.

3.3. Fatty acid composition of PL fraction in lymphocyte membrane presented in Table 4

In phospholipid (PL) fraction, DHA adding decrease with high significance the concentration of palmitic acid ($P = 0.04$), oleic acid ($P = 0$) and arachidonic acid

($P = 0.001$) while it increase significantly the concentrations of myristic acid ($P = 0.001$) and the docosahexaenoic concentration ($P = 0$) in lymphocyte membrane of controls as compared with well 2 (in absence of fatty acid addition). In diabetic lymphocyte incubated with DHA, we observed only an increase in DHA concentration whereas this increase was significantly raised in control than diabetic.

Lymphocyte incubated with EPA was lowered the concentration of myristic acid ($P = 0.01$) and oleic acid ($P = 0.01$) while EPA level was significantly increased ($P = 0$) as compared with well 2 in control lymphocyte but in diabetic, EPA adding decreased significantly α -linolenic acid ($P = 0.04$), arachidonic acid ($P = 0.01$); also EPA level increased significantly ($P = 0$) compared as well2 in absence of fatty acid addition. We noted that oleic acid was more significantly decreased in control than these of diabetic lymphocyte by ($P = 0.001$) while arachidonic acid and EPA differents significantly ($P = 0, 0.006$, respectively) in control compared as diabetic lymphocyte.

However, lymphocyte incubated with AA increased significantly AA concentration ($P = 0.008$) in controls as compared with well 2. In diabetic, we noted that EPA was decreased significantly ($P = 0.04$), also AA concentration was increased significantly by ($P = 0.008$). The fatty acid concentration of arachidonic and eicosapentaenoic acid was significantly increased in controls than NIDDM diabetic membrane.

Table 4

fatty acid composition of phospholipids (PL) fraction of lymphocyte membrane incubated under different fatty acid regimens for control (c) and diabetic (nd) subjects

Fatty acid/well	C1	C2	C4	C5	C6
C14:0	2.95±0.25	2.63±0.21	3.48±0.27*	2.01±0.13* ⁺⁺	2.43±0.08 ⁺
C16:0	39.33±3.4	40.56±3.36	35.9±2.69*	38.82±2.54	37.91±1.33
C18:0	18.19±1.57	17.81±1.47	16.95±1.27	18.95±1.24	17.88±0.63
C18:1	22.61±1.95	24.18±1.69	15.95±1.19** ⁺⁺	18.15±1.19* ⁺	22.84±0.8
C18:2	30.98±2.55	27.45±1.24	29.21±2.92	31.55±2.87	31.76±0.23
C18:3	2.45±0.21*	2.96±0.24	2.84±0.16	2.74±0.18	3.55±0.24
C20:4	8.85±0.76 ⁺	8.41±0.69 ⁺	6.28±0.47*	7.76±0.29 ⁺⁺	10.69±0.37* ⁺
C20:5	1.77±0.14** ⁺⁺	2.44±0.18 ⁺	1.84±0.08*	4.57±0.27** ⁺⁺	2.15±0.13 ⁺
C22:6	2.26±0.19**	3.05±0.23	5.06±0.24** ⁺⁺	3.35±0.2	2.85±0.13
Fatty acid/well	nd1	nd2	nd4	nd5	nd6
C14:0	3.34±0.28	3.25±0.24	2.93±0.14	3.04±0.18 ⁺⁺	3.17±0.19 ⁺
C16:0	43.26±3.63	43.74±3.31	40.52±1.94	41.64±2.51	43.04±2.68
C18:0	19.17±1.61	18.82±1.42	19.8±0.95	20.01±1.2	20.49±1.28
C18:1	24.58±2.07	26.45±2	25.12±1.2 ⁺⁺	25.39±1.53 ⁺	26.13±1.63
C18:2	34.12±1.49	32.47±2.33	32.21±1.54	33.21±2	33.82±2.11
C18:3	2.16±0.18*	3.1±0.16	2.83±0.13	2.64±0.15*	3.21±0.12
C20:4	6.88±0.57 ⁺	6.41±0.48 ⁺	5.67±0.27	5.28±0.31 ⁺⁺	8.71±0.54** ⁺⁺
C20:5	1.35±0.11* ⁺	1.97±0.16 ⁺	1.79±0.13	3.52±0.23** ⁺⁺	1.69±0.09* ⁺
C22:6	2.06±0.17	2.47±0.2	3.49±0.26** ⁺⁺	2.82±0.18	3.01±0.1 ⁺

Results are expressed as follows: *Comparison between well 2 and others wells within same group ($P < 0.05$, ** $P < 0.001$), ⁺Comparison between diabetic and control groups ($P < 0.05$, ⁺⁺ $P < 0.001$).

4. Discussion

Previous studies have in general investigated the effect of ω -6 and ω -3 fatty acid in diabetes mellitus (DM) and emphasized upon the possible beneficial actions of these fatty acids in the prevention or arrest of progression of diabetic complications, however, the results were not very impressive [22].

Our results have shown that the proliferative response of lymphocytes and IL2 production had lower mitogenic response to con A than those of controls.

Also, insufficient lymphocyte proliferations were observed with peripheral blood mononuclear cells from NIDDM patients when were activated by phytohemagglutinin (PHA) (1%) and other mitogens as con A (10 μ g/ml) or PMA (50 μ g/ml) [23].

The production of IL-2 by con A-activated lymphocyte was not significantly different between diabetic and healthy subjects. The addition of human insulin to culture lymphocyte showed an increase of proliferative level of lymphocytes but the IL-2 production was reduced. Kaye et al. confirmed our finding when IL-2 production did not differ between patients of types II diabetes and controls, regardless of whether the patients used insulin. These latter normal levels speak strongly against the possibility that insulin itself depresses interleukin production [24].

The incubation of lymphocyte with either n-3 PUFA or n-6 PUFA, individually added, resulted in a reduction of the lymphocyte proliferation, where the EPA was the more inhibitor than AA and DHA respectively. In contrast to this hyporesponsiveness of lymphocyte by EPA, the concentration of IL-2 produced was more elevated in both diabetic and healthy subjects with EPA incubation as compared to AA or DHA incubations.

Both ω -6 and ω -3 fatty acids can inhibit IL-2 production and lymphoproliferation of cells and this action was not seen to be mediated by the formation of eicosanoids from PUFAs [22].

Meydani reported that PUFA could reduce IL-2 production directly and independently of changes in cyclooxygenase products. Products of lipid peroxidation such as H₂O₂ have been shown to have a suppressive effect on lymphocytes proliferation and cytokine production [25].

Lymphocytes incubated with combined n-3 and n-6 PUFA showed enhanced proliferative response and IL-2 concentration produced from lymphocyte than those incubated with only combined n-3 PUFAs. When insulin was added alone to culture, the lymphoproliferation was raised but the IL-2 production was lowered than these of con A. Also, the significant differences found in IL-2 production when the media contained either of 40 μ M DHA, 40 μ M EPA or 40 μ M AA as individual fatty acid, were lost between diabetic and

control subjects with combined fatty acid (DHA and EPA or DHA, EPA and AA) in presence or absence of insulin.

Several investigators have reported a suppressive effect of large doses of n-3 fatty acid on neutrophil, monocyte and lymphocyte. However, it is still unclear why patients with NIDDM have an impaired lymphocyte proliferation. The hypothesis suggested showed that patients with NIDDM had either a defect in the production of IL-2 or in the expression of IL2-R on the mitogen activated mononuclear cells [23].

Although T-cell proliferation depends upon the interaction of cells and the activators (con A must bind to the T-cell receptor), it is initiated by signal generated after the binding of IL-2 with its membrane IL-2R. The insufficient expression of IL-2R on activated lymphocytes from NIDDM patients was due to a decreased population of receptor-bearing cells [23]. It is possible that the biological competence of the IL-2R on the IL-2R bearing lymphocytes was affected by a longer exposure time to high concentration of glucose.

Concerning our finding firstly, the basal and activated culture of NIDDM showed a raised level of IL-2 than those of normal lymphocyte, then the defect in IL-2 production as suggested previously for NIDDM lymphocyte was unacceptable hypothesis. Secondly, the greater level of proliferation of lymphocyte with insulin in culture media and the decrease of IL-2 concentration presented another hypothesis that insulin affects the capacity of proliferation directly by fixing on insulin receptor of lymphocyte and not by IL-2 intervention alone.

Concerning the addition of fatty acid to culture media with same concentration and same time present different responses of proliferation whereas the greatest inhibition of lymphocyte was obtained by EPA, AA and DHA, respectively. In contrast, we observed that EPA was more stimulant of IL-2 production than DHA and ARA, respectively. These latter observations, moreover, indicated the existence of other ways for interaction between lymphocyte proliferation and IL-2 production.

Some other studies showed that other cellular defects including insulin receptor and certain enzymes could also be responsible for the insufficient lymphocyte proliferation from diabetic patients.

It is showed that the numbers of insulin receptors on diabetic lymphocytes were decreased. Moreover, the molecular mechanism for the impaired protein phosphatase activation in NIDDM patients was due to a functional loss of protein kinase FA. This loss of enzymes in NIDDM lymphocytes may represent another aspect of the pathogenic mechanisms to generate abnormal lymphocyte or non-activable lymphocytes and thus promoting the immunological dysfunctions in the diabetics [23].

Recent studies showed that n-3 PUFA reduce agonist stimulated diacylglycerol and ceramide production, phospholipase C γ 1 activation and phosphatidic acid generation in lymphocytes. Thus n-3 PUFA appears to influence the generation of a range of lipid-derived second messengers in lymphocytes, and perhaps other immune and inflammatory cell types. This might account for widespread effects of these fatty acids on the functioning of these cells [26]. Also, it was found that EPA and DHA modulate MAP kinase activation, but AA potentiates the MAP kinase enzyme activity [27].

Calder (1996) reported that culture of con A-stimulated rat lymph-node lymphocytes with AA, EPA or DHA resulted in a 40–50% lower concentration of IL-2 in the culture medium than if the cells were cultured in the absence of fatty acids. More than that, both ω -6 and ω -3 fatty acids can inhibit IL-1, IL-2 and TNF production in human lymphocyte *in vitro* and *in vivo*, and this action does not seem to be mediated by the formation of eicosanoids from PUFAs [22] whereas other studies indicated that under normal conditions most eicosanoids are derived from arachidonic acid (C20:4n-6). However, when high levels of n-3 PUFA are consumed in the diet, less AA-derived eicosanoids are produced, however, those produced from EPA are usually less biologically potent than those formed from arachidonic acid. Thus, an n-3 PUFA capable of inducing changes in the amounts and types of different eicosanoids produced will have a significant influence on the functioning of immune and inflammatory cells [5,26].

Another mechanism of effect PUFAs on cells was marked when simultaneous treatment of cells with arachidonic acid and alloxan offered significant protection to the cells; then AA prevented the development of alloxan-induced diabetes also reported the anti-oxidant status to normalcy. This suggests that one mechanism by which AA is able to prevent alloxan-induced diabetes is by enhancing the anti-oxidant status. Further, PUFAs and AA can also contribute to their beneficial action [28].

On the other hand, the tested fatty acids demonstrated a major impact on the fatty acid composition of different PL fractions of lymphocyte membrane but these fractions were different in their response to each fatty acid examined. For instance, the addition of DHA to culture media was accompanied with a predominant composition of DHA in PL.

In presence of EPA, EPA was preferentially incorporated in PL membrane, a difference that may be attributed to the greater specificity of lecithin-cholesterol acyl transferase (LCAT) to EPA than DHA [14].

The proportions of linoleic acid and α -linolenic acid in the lymphocyte membrane incubated with n-3 PUFA or with AA were not significantly changed in both healthy and diabetic subjects. These may be returned to the inhibitory effect of n-3 PUFA on n-6 PUFA and inverse or the absence of insulin which activates Δ -5 and Δ -6 for

metabolism C18:2 and C18:3 to their PUFA. These observations suggest that n-3 PUFA might inhibit the further metabolism of linoleic acid. DHA is known to inhibit Δ -6 desaturase, the enzyme responsible for further metabolism of linoleic acid [29].

Also, the determination of the fatty acid composition of different phospholipid tissues and plasma of experimental diabetic rats showed a correlation between the decrease of Δ -5 and Δ -6 desaturase activities and a decrease of arachidonic acid and an increase of linoleic acid proportions that were normalized by insulin injection [19].

The activities of Δ -6 desaturase and Δ -5 desaturase, which are necessary for desaturation of linoleic acid and α -linolenic acid to their respective metabolites are depressed in experimental diabetes and in human with type 1 and 2 DM. In this context, it is interesting to note that insulin can augment the activity of Δ -6 desaturase activity. Thus decreased levels of various PUFAs in DM may be due to a defect in the activities of desaturases, increased peroxidation by free radicals (because PUFAs may form substrates for peroxidation), or perhaps increased eicosanoid formation (increased use of substrate and PUFAs) [22].

The competition between n-6 and n-3 fatty acids existing at different steps of their biosynthesis, esterification in the lipids, selected incorporation in tissues and functions whereas α -linolenic acid is rapidly oxidized. So, it would very sparingly contribute to the formation of high PUFA in spite that it is a much better substrate for the Δ -6 desaturase than linoleic acid [19].

In previous reports, n-3 PUFAs have demonstrated a beneficial effect on insulin sensitivity in rats. In humans, the studies have shown an association between the proportion of n-3 PUFA in skeletal muscle membrane phospholipids and increased insulin sensitivity [14].

Also, our results showed a notable increased proportion of AA, EPA and DHA in control phospholipid fractions than those of diabetic. Similar results have been reported by other workers in NIDDM [30].

Moreover, the proportion of EPA was significantly higher in EPA group with a little enhance of DHA in same group, whereas the concentration in DHA adding was significantly higher in DHA only.

The proportion of ARA was higher significantly in PL membrane incubated with ARA but low in the PL membrane incubated with EPA or DHA adding. These results were in accordance with those of Peterson et al.

Finally, PUFAs influence immune cell function by modulation of eicosanoid synthesis; generally speaking, the n-3 metabolites are attributed with anti-inflammatory effects whereas the n-6 metabolites with pro-inflammatory effect [18], alteration of intracellular signaling pathways, regulation of transcription factor activity, and altered antioxidant status.

Overall, different and diverse biological effects of PUFAs are exist, these effects might be exerted through different mechanisms.

5. Conclusion

The results of this study demonstrate an altered fatty acid composition of PL membrane lymphocyte in DM2 patients.

There is evidence that long-chain fatty acids of both the ω -6 and ω -3 series are required for normal membrane structure.

Our results do not allow to conclude which fatty acid pattern is optimal for type 2 diabetics because of competition between the n-6 and n-3 pathways for the enzymes responsible for elongation and desaturation.

However, phospholipid changes in lymphocytes membranes depend on many factors which affect the modulation of the immune response by fatty acids, such as the type and concentration of fatty acids, cell types, serum used in vitro cultures and so on.

Finally, we suggest that optimum health may require raising the levels of both ω -6 and ω -3 fatty acids and not either one at the expense of other.

Acknowledgment

The authors would like to thank Faten Al-Haj Ahmad for her technical assistance in samples GC injections.

References

- [1] R.F. Grimble, Symposium on "Evidence-based nutrition" Nutritional modulation of immune function, *Proc. Nutr. Soc.* 60 (2001) 389–397.
- [2] J.M.P. Pöschl, K. Paul, M. Leichsenring, et al., Effects of dietary supplementation of saturated fatty acids and of n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids on plasma and red blood cell membrane phospholipids and deformability in Weanling Guinea pigs, *Lipids* 34 (1999) 467–473.
- [3] J.-P.G. Poisson, S. Cunnane, Long-chain fatty acid metabolism in fasting and diabetes: relation between altered desaturase activity and fatty acid composition, *J. Nutr. Biochem.* 2 (1991) 60–70.
- [4] L.S. Harbige, Dietary n-6 and n-3 fatty acids in immunity and autoimmune disease, *Proc. Nutr. Soc.* 57 (1998) 555–562.
- [5] P.H.C. Calder, Effects of fatty acids and dietary lipids on cells of the immune system, *Proc. Nutr. Soc.* 55 (1996) 127–150.
- [6] L.A. Horrocks, Y.K. Yeo, Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA), *Pharmacol. Res.* 40 (1999) 211–225.
- [7] G. Freyburger, H. Gin, A. Heape, H. Juguelin, M.R. Boisseau, C. Cassagne, Phospholipid and fatty acid composition of erythrocytes in type I and type II diabetes, *Metabolism* 38 (1989) 673–678.
- [8] E. Berlin, S.J. Bhatena, J.T. Judd, P.P. Nair, D.Y. Jones, P.H.R. Taylor, Dietary fat and hormonal effects on erythrocyte membrane fluidity and lipid composition in adult women, *Metabolism* 38 (1989) 790–796.
- [9] D.A. Hughes, A.C. Pinder, Z. Piper, E.K. Lund, N-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) modulate the expression of functionally associated molecules on human monocytes, *Biochem. Soc. Trans.* 23 (1995) 303S.
- [10] D.N. McMurray, C.H.A. Jolly, R.S. Chapkin, Effects of dietary n-3 fatty acids on T cell activation and T cell receptor-mediated signaling in a murine model, *J. Infect. Dis.* 182 (2000) S103–S107.
- [11] J. Hopkins, I. McConnell, J.D. Pearson, Lymphocyte traffic through antigen-stimulated lymph nodes: role of prostaglandin E₂ as a mediator of cell shutdown, *Immunology* 42 (1981) 225–231.
- [12] C. Watala, Z. Józwiak, The phospholipids composition of erythrocyte ghosts and plasma lipoproteins in diabetes type 1 in children, *Clin. Chim. Acta* 188 (1990) 211–220.
- [13] F. Driss, P.H. Darcet, N. Delhaye, F. Mendy, Effect of eicosapentaenoic acid on red filterability and fatty acid composition, *Clin. Hemorheol.* 8 (1988) 679–685.
- [14] H.M. Vidgren, J.J. Agren, U. Schwab, T. Rissanen, O. Hanninen, M.I.J. Uusitupa, Incorporation of n-3 fatty acids into plasma lipid fractions, and erythrocyte membranes and platelets during dietary supplementation with fish, fish oil, and docosahexaenoic acid-rich oil among healthy young men, *Lipids* 32 (1997) 697–705.
- [15] A. Igal, N.T. De Gómez Dumm, Influence of dietary n-3 fatty acids on the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in STZ-diabetic rats, *Nutr. Biochem.* 6 (1995) 269–274.
- [16] V. Salomaa, J. Ahola, J. Tuomilehto, et al., Fatty acid composition of serum cholesterol esters in different degrees of glucose intolerance: a population-based study, *Metabolism* 39 (1990) 1285–1291.
- [17] D. Kagi, B. Ledermann, K. Bürki, R.M. Zinkernagel, H. Hengartner, Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo, *Annu. Rev. Immunol.* 14 (1996) 207–232.
- [18] T. Decsi, H. Minda, R. Hermann, et al., Polyunsaturated fatty acids in plasma and erythrocyte membrane lipids of diabetic children, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 67 (2002) 203–210.
- [19] R.R. Brenner, Hormonal modulation of Δ 6 and Δ 5 desaturases: case of diabetes, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 68 (2003) 151–162.
- [20] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [21] E.G. Bligh, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911–917.
- [22] Y. Suresh, U.N. Das, Long-chain polyunsaturated fatty acids and chemically induced diabetes mellitus: effect of ω -6 fatty acids, *Nutrition* 19 (2003) 93–114.
- [23] F.-Y. Chang, M.-F. Shiao, Decreased cell-mediated immunity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus, *Diab. Res. Clin. Pract.* 28 (1995) 137–146.
- [24] W.A. Kaye, M.N.S. Adri, J.S. Soeldner, et al., Acquired defect in interleukin-2 production in patients with type 1 diabetes mellitus, *Engl. J. Med.* 315 (1986) 920–924.
- [25] S.N. Meydani, S. Endres, M.M. Woods, et al., Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women, *J. Nutr.* 121 (1991) 547–555.
- [26] P.C. Calder, Dietary fatty acids and the immune system, *Lipids* 34 (1999) S137–S140.

- [27] A. Denys, A. Hichami, N.A. Khan, Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid modulate MAP kinase enzyme activity in human T-cells, *Mol. Cell Biochem.* 232 (2002) 143–148.
- [28] Y. Suresh, U.N. Das, Protective action of arachidonic acid against alloxan-induced cytotoxicity and diabetes mellitus, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 64 (2001) 37–52.
- [29] L.D. Peterson, N.M. Jeffery, F. Thies, P. Sanderson, E.A. Newsholme, P.C. Calder, Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids alter rat spleen leukocyte fatty acid composition and prostaglandin E2 production but have different effects on lymphocyte functions and cell-mediated immunity, *Lipids* 33 (1998) 171–180.
- [30] U.N. Das, Essential fatty acid metabolism in patients with essential hypertension, diabetes mellitus and coronary heart disease, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 52 (1995) 387–391.

RESUME

Le but de ce travail reste d'étudier les effets du diabète sucré sur le métabolisme des lipides, glucides et protéines chez une population jordanienne de diabétiques insulino-dépendants (DID), non insulino-dépendants (DNID) aussi témoins.

Notre résultats ont montré une augmentation significative des teneurs sériques en glucose et HbA_{1c} chez les diabétiques de type 1 et type 2. De plus, les concentrations sériques en insuline, cholestérol (CT), triglycérides (TG) sont augmentés chez les DNID tandis que les protéines sériques totales (PT) et l'insuline montrent une diminution significative chez les DID.

Les altérations de la composition des lipoprotéines chez les diabétiques sont caractérisés par une augmentation des TG- PT- masse des VLDL, CT- TG des LDL, TG des HDL₂ et HDL₃, avec une diminution des CT- PL- PT -masse des HDL₂ et PT des HDL₃ chez les DNID. Concernant les DID, il y a une augmentation en CT- PL- masse des LDL, TG- HDL₃ et une diminution en PT des LDL, PL- PT- masse-HDL₂ et PT des HDL₃ en comparant aux témoins.

D'autre part, pour approfondir nos connaissances sur les altérations cellulaires associés au diabète et de déterminer les effet des acides gras polyinsaturés (DHA, EPA, AA) sur la lymphoprolifération, la sécrétion d'IL2 et la composition en acides gras des phospholipides, triglycérides et esters de cholestérol membranaires des lymphocytes T; les lymphocytes sont incubés in vitro avec et sans mitogène (con A), insuline et AGPI n-3 (DHA et EPA) et/ou AGPI n-6 (AA).

Les résultats obtenus montre que con A et l'insuline augmentent significativement la prolifération des lymphocytes T tandis que les acides gras polyinsaturés tel EPA, AA, DHA ; inhibent la réponse proliférative à des degrés différents : 47%, 37% et 19%, chez les témoins, 3%, 29% et 13% pour les DNID et 26%, 18% et 9% chez les DID. Cependant, la concentration d'IL-2 produite en présence des DHA, EPA or AA est significativement réduite par 35%, 32% et 39% chez les témoins tandis que 16%, 15% et 23%, respectivement chez les diabétiques de type 2 et 21%, 18% et 26% chez les diabétiques de type 1.

De plus, les acides gras utilisé montre un impact majeur sur la composition des différents fractions lipidiques de la membrane des lymphocytes T. mais ces fractions donnent un comportement différente pour chaque acides gras testé. Aussi, on observe que la Con A augmente le taux des AGPI au niveau des différentes fractions membranaires des lymphocytes stimulés chez les diabétiques et les témoins par rapport aux cultures initiales. De plus, l'addition d'un acide gras au milieu de culture enrichit les différentes factions lipidiques de PL, TG et EC à cet acide. On note aussi que l'addition d'EPA au milieu de culture diminue la proportion d'acide arachidonique dans la membrane plasmique montrant une compétition entre les deux séries de n-3 et n-6.

En plus, l'analyse de la composition en acides gras des phospholipides membranaires d'érythrocytes ne montre aucune différence significative en somme des acides gras saturés chez tous les groupes. Par contre, une augmentation significative d'acide oléique a été noté chez les DNID comparé aux témoins. Ainsi, une diminution significative des EPA et DHA a été observés chez les diabétiques comparé aux témoins avec une diminution d'AA chez les DNID.

Enfin, nos résultats mettent en évidence les effets du diabète de type 1 et type 2 à différentes niveau de l'organisme et les possibilités de les traité par l'ensemble des acides gras polyinsaturés de série n-3 et n-6.

Mots clés: Diabète sucré – DID- DNID- Lipoprotéines- Lymphocyte T- AGPI- Lymphoprolifération- IL-2 – composition en acides gras membranaires – Erythrocyte- Jordanie.