



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun –Tiaret–
Faculté Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Infectiologie

Présenté par :

KASSI Halima Nawal

TAHAR Wissem

SALAH Aicha Houria

Thème

Détermination des effets in vitro des molécules à pouvoir antioxydant
sur les altérations métaboliques au niveaux des lymphocytes des patients
insuffisants rénaux avant la séance de dialyse

Soutenu publiquement le 06 / 07 /2023

Jury:

Président: Dr. ALI-NEHARI AEK

Encadrant: Dr. MEZOUAR Dj

Co-encadrant: Dr. BOUBAKEUR B

Examineur 1: Dr. KHADEM H

Grade

MCA

MCA

MCA

MCB

Année universitaire 2022-2023

Remerciements

Avant tout ; nous rendons grâce à dieu de nous avoir accordé santé, courage et patience afin d'accomplir ce modeste travail.

Nos vifs remerciements s'adressent :

À notre encadrante M^{lle} MEZOUAR Djamila et co-encadrante Madame BOUBAKEUR Badra pour leur disponibilités, leur encadrement, leur aide, leurs orientations et leurs conseils.

Merci à ceux qui prennent le temps d'évaluer et d'avoir accepté de juger ce travail ; membres de jury Monsieur ALI-NEHARI AEK et Madame KHADEM H

Un grand merci spécialement à les ingénieurs de laboratoire Biochimie ; microbiologie de la faculté S.N.V pour leurs aides et leurs conseils.

À Monsieur le chef de laboratoire hémodialyse; Monsieur BELKACEM ; Madame SAHARI M et Madame le chef de laboratoire de polyclinique TOUAHRIA Z.

Merci aussi à tous les patients participants dans notre étude.

Enfin, nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Merci pour votre attention et soutien.

Dédicaces

Avec tout mes sentiments de respect, avec l'expérience de ma reconnaissance, je dédie ma remise de diplôme et ma joie :

À l'homme mon précieux offre de dieu , qui doit ma vie , ma réussite et tout mon respect....mon chère père.

À la femme qui a souffre sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort de me rendre heureuse....mon adorable mère.

À mes chères sœurs et mon frère qui n'ont pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études que dieu les protèges et leurs offre la chance et le bonheur.

À mon âme sœur **TAHAR Wissem** et ma chérie **SALAH Aicha Houria** pour leurs soutien moral, ses patiences et ses compréhensions au long de ce travail.

À tout les membres de ma grande famille et tout ceux qui ont participés de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci

Halima

Dédicaces

Avec tous mes sentiments de respect je dédie ce travail

A mon prince père

A celui qui m'a fait une femme, aucun mot ne saurait exprimer la profonde gratitude ,ma Source de vie ,et d'affection, à mon support qui était toujours à mes côtés pour me soutenir et m'encourager

A ma princesse mère

A mon paradis, à la prunelle de mes yeux, à la source de ma joie et mon bonheur , ma lune et le fils d'espoir .tu n'as cessé de me soutenir et m'encourager durant toutes les années

*A mes adorables sœurs **Hadjer** et **Oumaima** et mon seul frère **Seifo***

*Sans oublier mes binômes **Halima** et **Aicha** pour son soutien moral ,sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet*

A tout ce qui ont participé à ma réussite et a tous qui m'aimes

Merci

Wissem

Dédicaces

Je dédie ce travail à mon cher père

*À mon espoir, ma modèle et ma force dans la vie, a celle que
j'aime et chéris, ma mère*

À mon épaule dans la vie et mes compagnons de route

Farouk et Zaki et Haythem

*À mes binômes **Halima et Wissem** pour son soutien moral, sa
patience et sa compréhension tout au long de ce projet*

À toute ma famille et mes amis qui m'ont aidé

Je vous dis merci du fond du mon cœur

Aicha

Liste des tableaux

Tableau 01 . Classification des stades de l'insuffisance rénale chronique.....	3
Tableau 02 . Différentes radicaux radicalaires impliqués dans le stress Oxydant.....	25
Tableau 03 . Caractéristiques de la population étudiée.....	26
Tableau 04. Effets des différentes molécules (vitamine C, huile essentielles) à différentes concentrations sur la prolifération des lymphocytes in vitro chez les patients insuffisants rénaux et les personnes saines.....	31
Tableau 05. Effets des différentes molécules (vitamine C, huile essentielles) à différentes concentrations sur les teneurs en MDA ($\mu\text{mol/l}$) in vitro chez les patients insuffisants rénaux et les personnes saines.....	33
Tableau 06. Effets des différentes molécules (vitamine C, huile essentielles) à différentes concentrations sur l'activité de SOD (mM/min/ml) in vitro chez les patients insuffisants rénaux et les personnes saines.....	35

Liste des figures

Figure 01. Illustration du principe de l'hémodialyse.....	6
Figure 02. Dialyse péritonéale.....	6
Figure 03. Equilibre stress antioxydants/oxydants.....	9
Figure 04. Origine et repenses cellulaire aux ROS.....	9
Figure 05. Pyramide des systèmes de défenses antioxydants.....	14
Figure 06. Teneurs plasmatiques en vitamine C chez les personnes malades et saines.....	27
Figure 07. Activité de la catalase érythrocytaire chez les personnes malades et saines.....	27
Figure 08. Activité de la superoxyde dismutase érythrocytaire et plasmatique chez les personnes malades et saines	28
Figure 09. Teneurs plasmatiques et érythrocytaires en MDA chez les personnes malades et saines.....	29
Figure 10. Teneurs plasmatiques et érythrocytaires en anion superoxyde chez les personnes malades et saines.....	30

Liste des abréviations

A.A : Acides aminés

ADH : Antidiuretic hormone

ADN : Acide désoxyribonucléique

A.g : Acides gras

Ang II : Angiotensin II

Cu : Cuivre

DFG : Débit de filtration glomérulaire

DPR : Débit plasmatique rénal

EER : Épuration extrarénale

EDTA : Ethylene diamine tetraacétic

EOA : Espèce active de l'oxygène

ERA : Espèce réactive de l'azote

ERO : Espèce réactive de l'oxygène

FRO : Formes oxygénées réactives

GPxs : Glutathione peroxydase

GSH : Glutathione réduit

HB : Hémoglobine

HDL : High density lipoprotein

HTA : Hypertension artérielle

IMC : Indice de masse corporelle

IR : Insuffisance rénale

IRC : Insuffisance rénale chronique

IRT : insuffisance rénale terminale

LDL : Low density lipoprotein

MDA : Malondialdéhydes

Min : Minutes

ND : Néphropathie diabétique

No : Monoxyde d'azote

O²⁻ : Anion superoxyde

OMS : Organisation mondiale de la santé

PMN : Neutrophiles polymorphonucléaires

RL : Radicaux libres

ROS : Reactive oxygene_species

RPMI : Roswel Park Medium Institute

SOD : Superoxyde dismutase

SO : Stress oxydant

Tr : Tours

UI : Unité international

Vit C : Vitamine C

Vit E : Vitamine E

Zn : Zinc

Table des matières

Remerciements.....	
Dédicaces.....	
Dédicaces.....	
Dédicaces.....	
Liste des tableaux.....	
Liste des figures.....	
Liste des abréviations.....	
Introduction.....	1

Chapitre I : Insuffisance rénale chronique

I.1 Insuffisance rénale chronique.....	2
I.1.1.Définition.....	2
I.1.2 Classification de l'insuffisance rénale chronique.....	2
I.1.3 Conséquences de l'insuffisance rénale chronique.....	3
I.1.3.1 Conséquences biologiques.....	3
I.1.3.2 Conséquences cliniques.....	3
I.1.4 Facteurs de risque de l'insuffisance rénale chronique.....	4
I.1.4.1 Hypertension artérielle.....	4
I.1.4.1.1 Mécanisme de l'Hypertension artérielle.....	4
I.1.4.2 Diabète.....	4
I.1.4.3 Tabagisme.....	5
I.2 Traitement de remplacement.....	5

Chapitre II : Stress oxydant et antioxydant

II.1 Stress oxydant.....	7
II.1.1 Définition.....	7
II.1.2 Différents types des radicaux libres.....	7
II.1.2.2.1 Radicaux libres primaires (radicalaires).....	7

II.1.2.2 Radicaux libres secondaires (non radicalaires)	8
II.1.2.3 Espèces réactives de l'oxygène.....	8
II.1.3 Principales cibles biologiques des espèces réactives oxygénées.....	10
II.1.3.1 Acide désoxyribonucléique (ADN).....	10
II.1.3.2 Protéines.....	10
II.1.3.3 Lipides.....	10
II.2 Défenses antioxydants.....	10
II.2.1 Systèmes de défenses antioxydants.....	10
II.2.2 Systèmes de défenses enzymatiques.....	11
II.2.2.1 Superoxyde dismutases (SOD)	11
II.2.2.2 Glutathion peroxydases (GPxs)	11
II.2.2.3 Catalase.....	11
II.2.3 Systèmes de défenses non enzymatiques.....	11
II.2.3.1 Glutathion réduit (GSH)	11
II.2.3.2 Vitamine C	12
II.2.3.3 Vitamine E	12
II.2.3.4 Caroténoïdes	12
II.2.3.5 Acide urique	12
II.3 Oligoéléments.....	13
II.3.1 Sélénium	13
II.3.2 Cuivre et Zinc	13
II.4 Stress oxydant dans l'insuffisance rénale chronique.....	14
II.4.1 Rôle de dialyse.....	14
II.4.2 Rôle de l'inflammation	14
II.4.3 Rôle de l'urémie.....	15
II.4.4 Rôle de glycation.....	15

Matériel et Méthodes

I Population étudiée.....	16
I.1 Recrutement des cas et des témoins.....	16
II Prélèvements sanguins et préparation des échantillons.....	16
II.1 Prélèvements sanguins.....	16
III Analyses biochimiques.....	16
III.1 Dosage du glucose	16

III.2 Bilan rénal.....	17
III.2.1 Dosage de l'urée	17
III.2.2 Dosage de la créatinine	17
III.2.3 Dosage de l'acide urique.....	17
III.3 Bilan lipidique	17
III.3.1 Dosage du cholestérol total	17
III.3.2 Dosage des triglycérides	18
III.3.3 Dosages des lipoprotéines de haute densité (HDL) et de basse densité (LDL)	18
IV Marqueurs de statut oxydant /antioxydant.....	18
IV.1 Statut oxydant.....	18
IV.1.1 Dosage de l'anion superoxyde	18
IV.1.2 Dosage de malondialdéhyde	18
IV.2 Marqueurs du statut antioxydant.....	19
IV.2.1 Dosage de la vitamine C	19
IV.2.2 Détermination de l'activité enzymatique de la catalase.....	19
IV.2.3 Dosage du superoxyde dismutase (SOD)	20
V Culture lymphocytaire	20
V.1 Isolement et incubation des cellules lymphocytaires	20
V.2 Préparation de la suspension cellulaire.....	20

Résultats et Interprétation

I Caractéristiques de la population étudiée.....	21
II Paramètres biochimiques chez les deux groupes	21
III Statu oxydant /antioxydante chez la population témoins et atteintes d'insuffisance rénale chronique comparaison.....	21
III.1 Marqueurs du statut antioxydant chez les personnes malades et saines	21
III.2 Marqueurs du statut oxydant chez les personnes malades et saines	21
IV Résultats de l'étude in vitro	35

Discussion

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Résumés

Introduction

Introduction

Les reins sont responsables de l'excrétion des toxines urémiques dans l'urine et de la régulation de plusieurs systèmes corporels tels que le volume intra et extracellulaire, l'équilibre acido-basique, le métabolisme phosphate-calcium ou l'érythropoïèse. Le débit de plasma filtré est d'environ 120 mL/min, dépend de l'hémodynamique systémique et rénale. **(Gueutin et al., 2011).**

Selon l'OMS; l'insuffisance rénale est la 12^{ème} cause de mortalité et la 17^{ème} cause de morbidité. C'est un dysfonctionnement irréversible des reins, cela peut être causé par une diminution de nombres et une réduction de la fonction de néphrons **(OMS, 2015).**

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est un terme qui comprend tous les degrés de dysfonctionnement rénal, allant des lésions à haut risque à l'insuffisance rénale chronique légère, modérée et grave **(Vaidya et Aeddula, 2022).**

Le stress oxydatif (OS) est un déséquilibre entre les molécules pro-oxydantes et la capacité antioxydante cellulaire **(Mena et al., 2009)**. Ce déséquilibre peut causer des dommages cellulaires, notamment des dommages à l'ADN, l'agrégation des protéines et un dysfonctionnement de la membrane **(Tian et Zinczuk, 2017)**. Le stress oxydatif est courant dans l'IRC et est un facteur de risque non conventionnel chez tous les patients cause la mort **(Locatelli et Hasselwander, 1998).**

Le stress oxydant et l'inflammation sont deux facteurs clés dans le déclenchement de différentes pathologies métaboliques. En effet, l'insuffisance rénale chronique est une pathologie associé à un stress oxydant et une inflammation accrue, ainsi la correction de différentes anomalies oxydatives freine le développement des complications graves liées à la maladie et augmente l'espérance de vie de la personne.

L'objectif de ce travail vise à déterminer les effets in vitro de la vitamine C et l'huile essentielle de *Thymus fontaneisii* sur les altérations métaboliques au niveau des lymphocytes des patients insuffisants rénaux avant la séance de dialyse afin de corriger ces anomalies et diminuer le risque de complications pendant la séance de dialyse. La deuxième partie de l'étude vise à évaluer le statut oxydant/antioxydant (MDA, SOD, O₂-, Catalase, vitamine C) chez des sujets insuffisants rénaux chroniques par comparaison avec des témoins sains.

CHAPITRE I :

**Insuffisance rénale
chronique**

I.1 Insuffisance rénale chronique (IRC)**I.1.1 Définition**

L'IRC est une succession d'anomalies structurelles et fonctionnelles d'au moins 3 mois (**K/DOQI, 2002**) correspondant à un dysfonctionnement irréversible entraînant une perte progressive du débit de filtration glomérulaire (DFG) (**Jungers et al., 2011**).

Les marqueurs de l'insuffisance rénale peuvent être des anomalies histologiques, morphologiques, ou biologiques : protéinurie (> 0.5 g), hématurie, albuminurie, leucocyturie. (**ANAES, 2002**).

I.1.2 Classification de l'insuffisance rénale chronique

La classification couramment utilisée aujourd'hui distingue 05 stades de l'IRC correspondant à des situations caractérisées par la présence de signes biologiques de néphropathie et/ou par une diminution de DFG.

Les deux premiers stades correspondent à la présence de symptômes de néphropathie sans altérations de la fonction rénale (stade 1) ou avec une réduction minimale du DFG (stade.2). Les deux autres, sont définies par une diminution modérée (stade.3) ou sévère (stade 4) du DFG uniquement, sans référence à la présence ou à l'absence d'albumine. La dernière phase (stade 5) correspond à l'insuffisance rénale terminale (IRT), cela nécessite un traitement de remplacement par dialyse ou par transplantation de rein (**Tableau 01**) (**Levey et al., 2011**).

Tableau 01. Classification des stades de l'insuffisance rénale chronique (Levey et al., 2011).

Stade	DFG (ml/min/1.73 m ²)	Type de l'IRC
1	>90	maladie rénale chronique avec DFG normal
2	60 - 89	maladie rénale chronique avec légèrement diminué
3	30 - 59	IRC modérée
4	15 – 29	IRC sévère
5	< 15	IRC terminale

I.1.3 Conséquences de l'IRC

I.1.3.1 Conséquences biologiques

- Acidose métabolique;
- Rétention azotée (acide urique, urée et créatinine);
- Troubles phosphocalcique : hyperphosphorémie, hyperparathyroïdie secondaire, hypocalcémie);
- Hyperfibrinémie;
- Hyperhomocystéinémie;
- Dyslipidémie (Jungers et al., 2011).

I.1.3.2 Conséquences cliniques

- Hypertension artérielle;
- Artériosclérose;
- Osteodystrophie rénale;

- Amylose à β_2 - microglobuline;
- Malnutrition, anémie;
- Troubles endocriniens (**Jungers et al., 2011**).

I.1.4 Facteurs de risques de l'insuffisance rénale chronique

I.1.4.1 Hypertension artérielle (HTA)

La relation entre HTA et IRC est peu compliquée ; d'une côté, l'HTA est un facteur de risque important d'une détérioration progressive et accélérée de l'IRC où elle est responsable d'environ 30% des cas de l'IRC (**Weisstuch et Dworkin, 1992**).

D'autre côté, l'HTA est une conséquence fréquente d'IRC, plus que 75% des patients avec IRC développent une HTA suite de l'évolution de la maladie (**Taylor et Francis, 2005**).

I.1.4.1.1 Mécanisme de l'HTA

Une augmentation excessive de la pression artérielle après la charge en sel, indiquant que l'insuffisance rénale (IR) nécessite une tension artérielle plus élevée pour éliminer la même quantité que chez les individus sains. Le DFG est diminué, puis une vasoconstriction rénale se produit et une activation probable au lieu d'une inhibition du système nerveux sympathique, l'hypertension est transférée là où elle induit aux artérioles et aux capillaires glomérulaires des dommages à long terme sur l'endothélium des capillaires et les membranes basales glomérulaires, induisant des dépôts hyalins avec une accélération de la glomérulosclérose et de protéinurie ce qui cause une détérioration de la fonction rénale. (**Davidson et al., 2006**).

I.1.4.2. Diabète

Le diabète est devenu la première cause d'IR dans les pays développés. La néphropathie diabétique (ND) se caractérise par un épaississement de la membrane basale glomérulaire et une expansion mésangiale, généralement associée à un dépôt de matrice extracellulaire (fibronectin, collagène de type.4), qui finit par un aspect classique de corps hyalins. Cliniquement, il existe une protéinurie de type glomérulaire sélective, d'installation lente, pouvant dans de rares cas prendre la forme d'un syndrome néphrotique. Selon la classification clinique de l'IR associée au diabète, proposé par Mogensen et Coll; le stade initial correspond à l'état d'hyperfiltration associé à une hyperglycémie aiguë. Le stade suivant (néphropathie latente), est caractérisé par une microglobulinurie qui est observé chez

les patients atteints de diabète de type 1, les deux stades sont réversibles. Finalement protéinurie, l'apparition progressive d'HTA dont l'évolution de la maladie sera également importante, à ce stade commence la diminution de la filtration glomérulaire, ce qui conduit presque inévitablement au stade final de l'IR pendant 10 à 15 ans. (Mogensen et al., 1983).

L'HTA est souvent pratiquée à une atteinte rénale, voire du diabète lui-même. Elle peut entraîner des lésions glomérulaires hypertensives, qui sont associées à l'hyperglycémie. L'interprétation de la microglobulinurie est également différente, car elle est considérée comme un signe de lésions endothéliales généralisées et marqueur important de risque cardiovasculaire. La dyslipidémie liée au diabète de type 2 en combinaison avec des facteurs de risque accélère le développement de l'athérosclérose rénale. (DCCT, 1995).

I.1.4.3 Tabagisme

C'est un facteur de risque qui augmente la progression de l'IR chez des patients atteints de maladie rénale primaire (El Housseini et al., 2009). Il a récemment été démontré que le tabagisme altère l'hémodynamique rénale et l'excrétion de protéine en l'absence de maladie rénale. L'effet du tabac sur l'hémodynamique intra-rénale est caractérisé par l'augmentation du tonus sympathique, augmentation de la résistance vasculaire rénale (angiotensine II), et effets toxiques tubulaires directs (Orth et Ritz, 2002).

La nicotine augmente la résistance vasculaires périphériques, provoque une augmentation de la pression artérielle, ce qui peut provoquer HTA, et induit une diminution de DFG et de débit plasmatique rénale (Orth et Hallan, 2008). Le tabagisme diminue la quantité d'urines par stimulation hypophysaire de la sécrétion de l'hormone antidiurétique (ADH) (Orth, 2002).

I.2 Traitement de remplacement

Le transport des solutés et de l'eau à travers la membrane du dialyseur implique deux mécanismes de base : la diffusion et l'ultrafiltration. L'hémodialyse effectue l'échange de solutés et d'eau à travers une membrane semi-perméable entre le sang du patient et la solution de dialyse (une composition voisine de celle d'un liquide extracellulaire normal) (Figure 01). (Jungers et al., 2011). Lors de la dialyse intracorporelle, le malade et le système de dialyse péritonéale forment une couche liquide de contact dont la membrane séparatrice est la séreuse péritonéale (Figure 02) (Shiao et al., 2008).

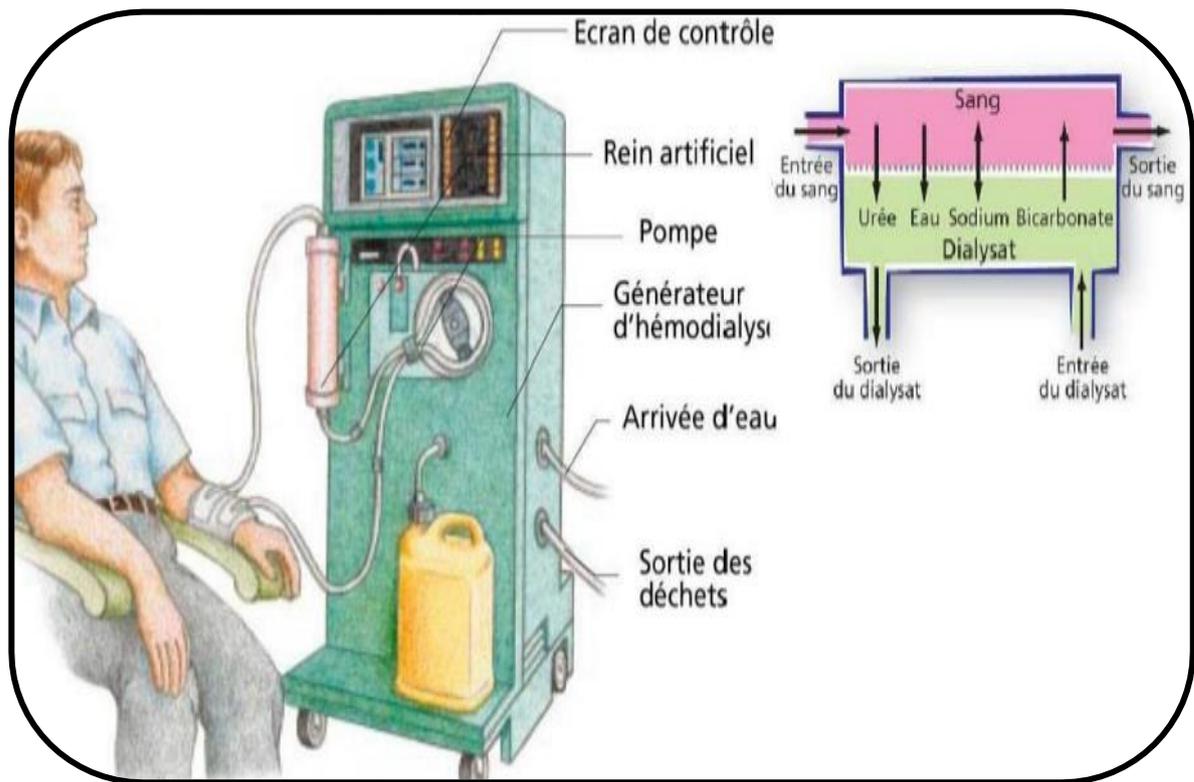


Figure 01. Illustration du principe de l'hémodialyse (source :Vidal.fr).

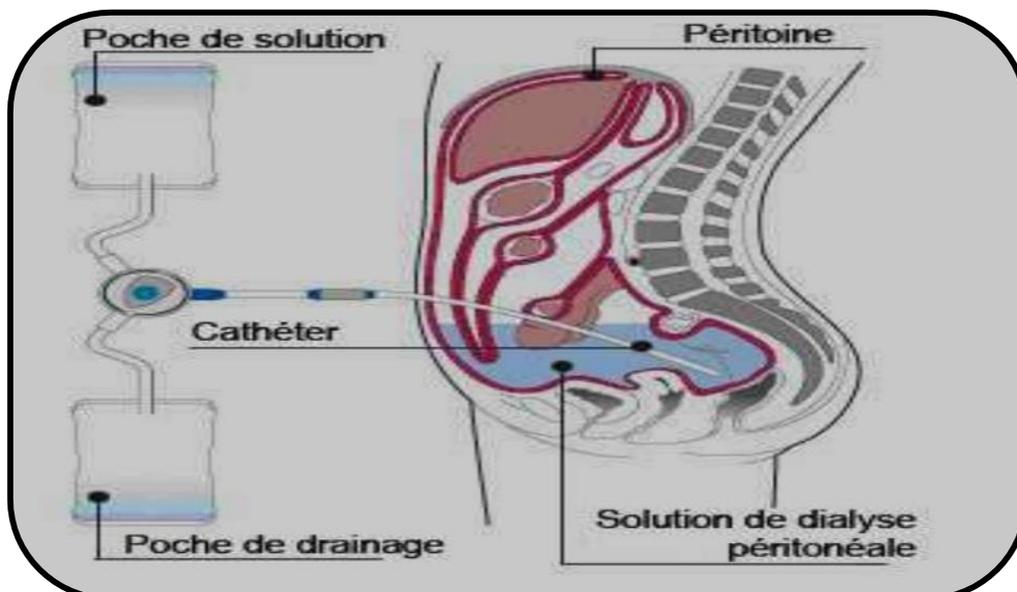


Figure 02. Dialyse péritonéale (Lioussifi et al., 2012).

CHAPITRE II :

Stress oxydant et antioxydant

II.1 Stress oxydant

II.1.1 Définition

Le SO est un sujet de débat intense. En fait, ce concept est adopté par la communauté des biologistes et des médecins. Il est Incriminé dans l'installation de la plupart des pathologies humaines (**Pincemail et al., 2002**).

Le SO se définit comme une altération du statut oxydant/antioxydant de la cellule. C'est la conséquence d'un déséquilibre de la production des radicaux libres et les capacités de défenses antioxydantes de la cellule, ce qui provoque des dommages irréversibles aux biomolécules formant la cellule (**Pincemail et al., 2002 ; Durackova et al., 2008**).

II.1.2 Radicaux libres (RL)

II.1.2.1 Définition

Un RL est une espèce chimique unique possédant un électron non apparié dans la couche externe, ce qui lui rend instables et très réactif aux molécules environnantes afin de capturer des électrons nécessaires et se stabiliser.

Une réaction en chaîne commence lorsqu'un RL attaque la molécule stable la plus proche, volant un électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre. Les radicaux libres peuvent avoir plusieurs sources ; exogènes comme les radiations UV, les rayonnements ionisants, les xénobiotiques, les pesticides ou certains médicaments ou par des processus cellulaires normaux endogènes à titre d'exemple la respiration mitochondriale. Le RL peut être dérivé de l'oxygène dans ce cas-là il est appelé espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou d'autres atomes tels que l'azote et il est nommé espèces réactives de l'azote (ERA) [30] (**Osborne et Fletcher, 1995**).

II.1.2.2 Différents types des radicaux libres

II.1.2.2.1 Radicaux libres primaires (radicalaires)

Ils sont obtenus à partir d'O₂ par des réactions de réduction comme l'anion superoxyde O₂^{•-} et le radical hydroxyle OH[•] ou à partir d'azote comme le monoxyde d'azote NO[•] (**Gueye, 2007**). (**Figure 04**).

II.1.2.2 Radicaux libres secondaires (non radicalaires)

Ces radicaux se forment lorsque des radicaux primaires réagissent avec certains composés biochimiques dans les cellules comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxyde d'azote ($ONOO^{\cdot}$). (**Petropoulous, 2003**).

II.1.2.3 Espèces réactives de l'oxygène

Ne sont pas des radicaux libres, ils possèdent un fort pouvoir oxydant car ils peuvent générer des radicaux libres, parmi eux, l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le peroxyde d'azote ($ONOOH$), ..etc (**Petropoulous, 2003**).

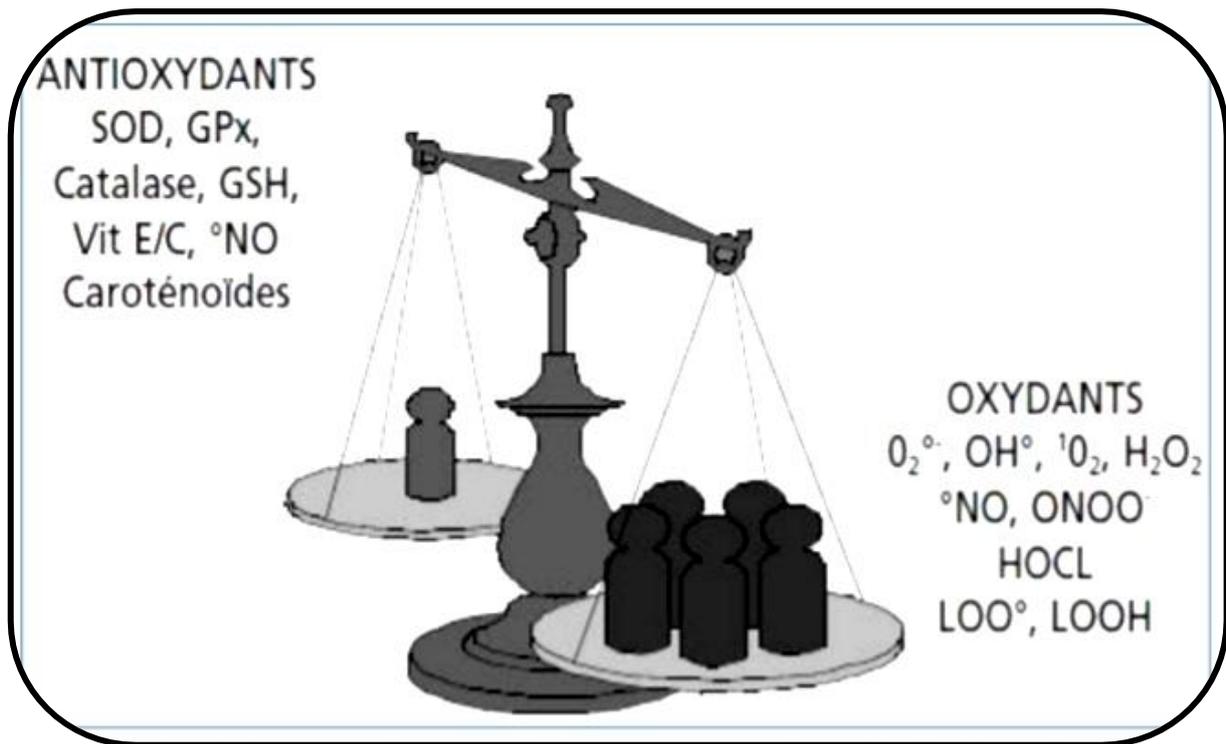


Figure 03. Equilibre oxydants/ antioxydants
 (<https://www.thierrysouccar.com/sante/info/les-radicaux-libres-quest-ce-que-cest-546>).

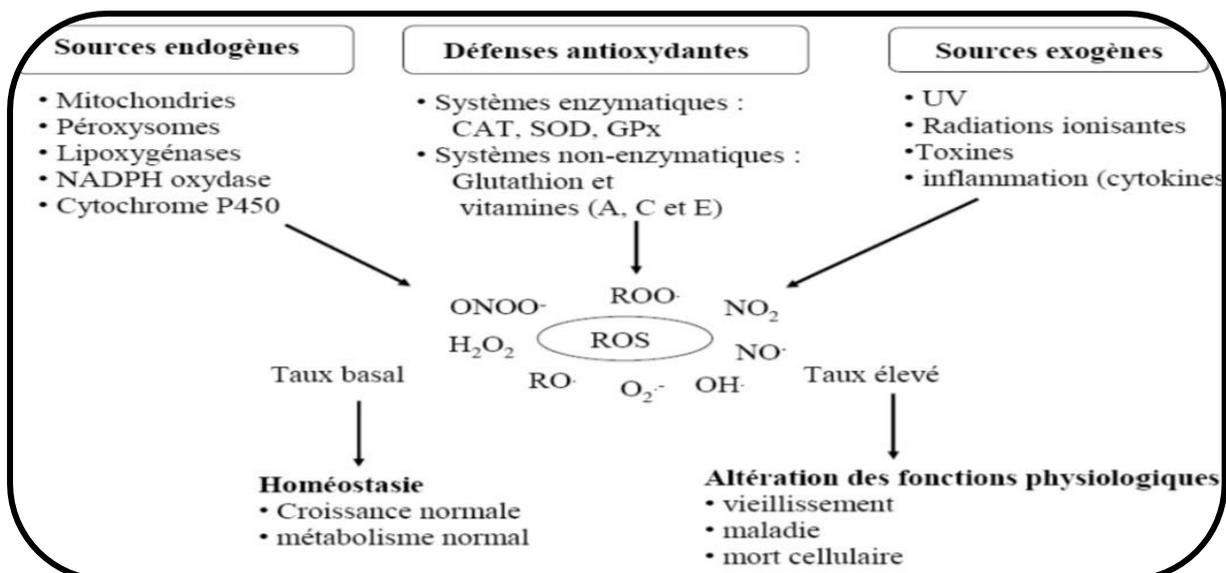


Figure 04. Origine et repenses cellulaire aux ERO (Petropoulos, 2003).

II.1.3 Principales cibles biologiques des espèces réactives de l'oxygène (ERO)

II.1.3.1 Acide désoxyribonucléique (ADN)

L'ADN est l'unité essentielle portant l'information génétique. C'est une molécule très sensible aux attaques des ERO, induisant la formation de nombreux dérivés par addition, oxydation ou fragmentation. Le radical hydroxyle réagit avec des additions de base aux doubles liaisons de l'ADN (**Hininger et Favier, 2000 ; Gardès et al., 2003**).

II.1.3.2 Protéines

La modification de la structure primaire, secondaire et tertiaire des protéines par les ERO est à la base de la formation de dérivés de protéines carbonyles via de multiples mécanismes, y compris la fragmentation et l'oxydation des acides aminés. Les protéines oxydées sont inactives et vulnérables à l'action des protéases (**Pincemail et al., 1999**).

II.1.3.3 Lipides

La peroxydation lipidique est un phénomène général qui se produit dans les membranes cellulaires et les lipoprotéines, ce qui conduit à des risques oxydatifs avec des conséquences favorisant l'installation de diverses pathologies. Les cibles de l'oxydation des lipides sont les acides gras polyinsaturés (**Cillard et Cillard, 2006**).

II.2 Défenses antioxydantes

II.2.1 Systèmes de défenses antioxydantes

Il a été démontré que les antioxydants jouent un rôle important dans la régulation de divers processus physiologiques et pathologiques. Il contribue principalement à la protection des cellules et des tissus contre les effets nocifs des ERO et autres RL. (**Figure 05**) (**Barber et Harris, 1994**).

Un antioxydant est toute substance qui, à de faibles concentrations par rapport à un substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat. (**Barber et Harris, 1994 ; Abuja et Albertini, 2001**).

Les antioxydants peuvent agir en réduisant les ERO, en les capturant pour former des composés stables, en séquestrant le fer libre ou en produisant du glutathion. (**Barber et Harris, 1994 ; Favier, 2003 ; Dan, 2008**).

II.2.2 Systèmes de défense enzymatiques

II.2.2.1 Superoxyde dismutases (SOD)

C'est l'une des premières lignes de défense contre le stress oxydatif, une métalloprotéine qui élimine de manière fiable l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ par dismutation et le convertit en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. Trois isoenzymes ont été rapportées chez l'homme : Cu/Zn-SOD1 cytosolique, Mn-SOD2 mitochondriale et Cu/Zn-SOD3, elles diffèrent par leur structure et leurs positions cellulaires. La SOD3 est sécrétée par les cellules musculaires lisses et représente le principal système antioxydant de la paroi artérielle. Son expression et sa sécrétion sont augmentées par des facteurs vasoactifs (histamine, endothéline 1, angiotensine II) et diminuées par l'homocystéine. (**Barber et Harris, 1994 ; Haleng et al., 2007**).

II.2.2.2 Glutathion peroxydases (GPxs)

La GPx est une sélénoprotéine (cinq isoformes) qui réduit les peroxydes au détriment de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH). Sa tâche principale est l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydatif sur les acides gras polyinsaturés. GPx est un bon reflet de cet épuisement, car il s'effondre en cas d'épuisement sévère du sélénium. Cependant, avec un apport suffisant en sélénium, les niveaux de GPx plafonnent. Par conséquent, le test GPx ne peut pas être utilisé comme marqueur de la toxicité du sélénium. Cependant, comme il est synthétisé dans le rein et le foie, d'autres facteurs tels que l'insuffisance rénale et la lyse des hépatocytes peuvent modifier sa concentration. (**Barber et Harris, 1994 ; Haleng et al., 2007**).

II.2.2.3 Catalase

Le rôle de la catalase, enzyme confinée dans le cytosol et les peroxysomes, est de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène et d'empêcher la formation de radicaux libres. La plupart des cellules aérobies contiennent cette enzyme. On le trouve en fortes concentrations dans le foie et les globules rouges. (**Barber et Harris, 1994 ; Adjélé et Salamatian, 2003**).

II.2.3 Systèmes de défenses non enzymatiques

II.2.3.1 Glutathion réduit (GSH)

Toute une gamme d'enzymes antioxydantes, telles que la glutathion peroxydase, la glutathion réductase, la thiorédoxine et la peroxirédoxine, sont au centre de leur activité. De plus, après

réaction avec les radicaux libres, d'autres antioxydants tels que les vitamines C et E et l'ubiquinone sont libérés. Enfin, le GSH possède ses propres propriétés antioxydantes. Après réaction avec l'OAE, il devient du glutathion oxydé (GSSG). Une faible valeur du rapport GSH/GSSG est considérée comme un excellent marqueur de la présence de stress oxydatif. (**Barber et Harris, 1994 ; Pincemail et al., 2009**).

II.2.3.2 Vitamine C

C'est un puissant antioxydant et aide à stopper la réaction en chaîne des radicaux libres. On le trouve dans la plupart des fruits et légumes frais. (**Barber et Harris, 1994 ; Boudion, 2010; Goussard, 1999**).

II.2.3.3 Vitamine E

La vitamine E est l'antioxydant le plus important de l'environnement lipidique (huiles, biomembranes, lipoprotéines) dans les problèmes de stress oxydatif, car elle est impliquée dans l'inactivation des formes réactives de l'oxygène. La chimie de la vitamine E est relativement complexe.

Le terme vitamine E correspond à deux grands groupes moléculaires, les tocophérols et les tocotriénols, contenant chacun 32 stéréoisomères. La biosynthèse de la vitamine E se produit dans les plantes, les algues et les champignons, mais pas chez les animaux. (**Barber et Harris, 1994 ; Claude, 2000 ; Cuvelier et al., 2003**).

II.2.3.4 Caroténoïdes

Avec la chlorophylle et les anthocyanes, les caroténoïdes sont les pigments les plus courants dans la nature. Ils font partie des micronutriments impliqués dans la défense de l'organisme contre les espèces réactives de l'oxygène. Ce sont principalement des piègeurs d'oxygène singulet, mais ils peuvent également neutraliser les radicaux libres. (**Barber et Harris, 1994 ; Rock, 2003**).

II.2.3.5 Acide urique

Le peroxy-nitrite est impliqué dans de nombreuses maladies humaines. Par conséquent, il existe un intérêt considérable pour les piègeurs potentiels de peroxy-nitrite. L'acide urique a été prétendu être un puissant piègeur de peroxy-nitrite et inhibiteur de la nitration de la tyrosine induite par le peroxy-nitrite.

La réaction rapide de l'acide urique avec les espèces oxydantes et les radicaux peroxyde indique que l'acide urique peut être un antioxydant physiologique soluble dans l'eau. C'est la même réaction avec les radicaux guanyle indiquant que l'acide urique fonctionne également comme antioxydant pour les bases de l'ADN. (Simic *et al.*, 1989 ; Barber et Harris, 1994 ; Witheman *et al.*, 2002).

II.3 Oligoéléments

II.3.1 Sélénium

Le sélénium est fondamental pour la santé humaine. C'est un oligoélément essentiel et le centre actif de nombreuses sélénoprotéines, principalement impliquées dans le système de défense antioxydant, le métabolisme thyroïdien et la fonction immunitaire. (Barber et Harris, 1994 ; Ducros et Favier, 2004).

II.3.2 Cuivre et Zinc

A des concentrations physiologiques, le cuivre et le zinc agissent comme antioxydants en étant deux cofacteurs responsables de l'activité favorable de la SOD. A forte concentration (>1,55 mg/l), le cuivre est un pro-oxydant très puissant, favorisant la formation d'EOA (réaction de Fenton) similaire au fer. Un autre cofacteur de la SOD, le zinc, est impliqué dans la synthèse de la métallothionéine antioxydante. Il joue également un rôle important dans le maintien d'une bonne immunité. De plus, il peut inhiber la production de (EOA) par le cuivre. L'étude du rapport de concentration du cuivre et du zinc (Cu/Zn) est d'un grand intérêt. Dans des conditions physiologiques, la valeur du rapport est proche de 1. Un déplacement vers le haut doit être interprété comme un signe de la présence d'un stress oxydatif (Barber et Harris, 1994 ; Pincemail *et al.*, 2009).

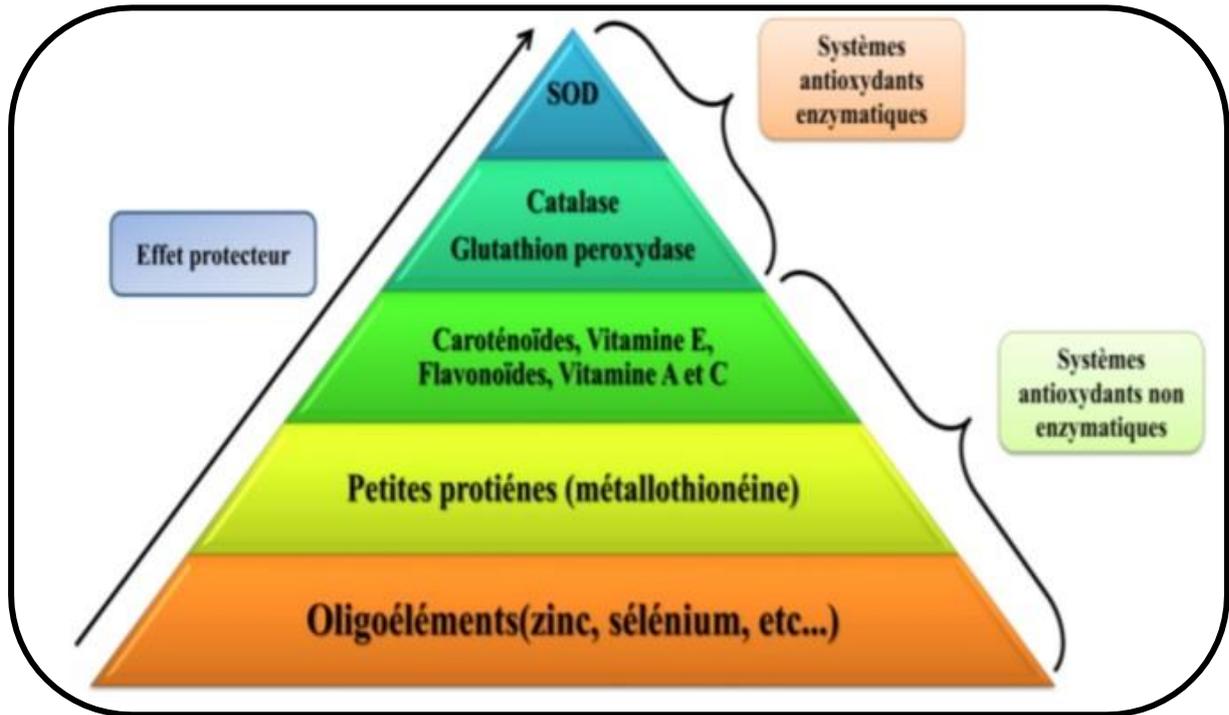


Figure 05. Pyramide des systèmes de défenses antioxydants (Barber et Harris, 1994).

II.4 Stress oxydant dans l'insuffisance rénale chronique

II.4.1 Rôle de dialyse

Le stress oxydatif contribue à la morbidité chez les patients hémodialysés. Au cours de l'insuffisance rénale le stress oxydant peut être le résultat des conditions urémiques, des membranes de dialyseur et la contamination bactérienne dans le dialysat.

Par ailleurs, les études ont démontré que l'urémie est la cause principale du stress oxydatif chez les patients hémodialysés (**Ward et al., 2003**).

II.4.2 Rôle de l'inflammation

Les données de la littérature montrent que les marqueurs de l'inflammation comme la protéine C-réactive sont très élevés chez les patients traités avec des techniques de dialyse par rapport à la population générale. L'inflammation chronique chez les patients dialysés est la conséquence des mécanismes secondaires de l'insuffisance rénale elle-même ou de son traitement (**Comb et al., 2003**).

II.4.3 Rôle de l'urémie

L'urémie induit une production accrue des espèces oxygénées réactives. Les neutrophiles polymorphonucléaires (PMN) des sujets IRC se trouvent dans un état constant de pré-activation pour la production d' $O_2^{\bullet -}$. D'autre part, le plasma des patients urémiques peut aider à stimuler le statut pro-oxydant de cette population. L'urémie aussi provoque la libération de H_2O_2 au cours du métabolisme. Cela altère la fonction endothéliale en modifiant la biodisponibilité du NO qui est un vasodilatateur endothéliale naturel et altère les LDL circulantes (**Morena et al., 2002**).

Matériel et Méthodes

I. Population étudiée

I.1 Recrutement des cas et des témoins

Il s'agit d'une étude de type cas-témoins portée sur deux groupes de personnes ; groupe atteint de l'IRC, au niveau du centre d'hémodialyse Salah Belkhouja de la wilaya de Tiaret, et un autre groupe volontaire sain considéré comme témoins.

Pour chaque personne choisie, l'âge, le poids, la taille et l'IMC sont notés.

Les manipulations sont réalisées au niveau du laboratoire de Biochimie et Microbiologie au sein du Département de Biologie, Faculté SNV, Université Ibn Khaldoun, Tiaret.

Toutes les personnes participant à l'étude donnent leur accord de participation après explication détaillée du but de l'étude.

II Prélèvements sanguins et préparation des échantillons

II.1 Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins sont accomplis avant la séance de dialyse, par prélèvement du sang de veine du pli coude sur des tubes EDTA et héparinés. Ces derniers sont centrifugés 3000 tr/min pendant 10 min afin de récupérer le plasma. Le culot restant est lavé avec l'eau physiologique 3 fois de suite, puis lysées par addition d'eau distillée froide glacée puis incubé pendant 15 min au réfrigérateur (4 C°), après les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 4000 tr/min pendant 15 min.

Finalement, le lysat érythrocytaire est récupéré afin de doser les paramètres érythrocytaires du statut oxydant/antioxydant, ensuite, on les conserve à température -20C° au sein du laboratoire de biochimie.

III Analyses biochimiques

III.1 Dosage du glucose

Le glucose plasmatique est dosé par le biais d'une méthode enzymatique colorimétrique (**Kits Spinreact, Ctra. Santa Coloma, Espagne**). Le glucose est oxydé en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène grâce à une enzyme qui est la glucose-oxydase. Le peroxyde d'hydrogène en présence de la peroxydase et du phénol, oxyde un chromogène (4-aminoantipyrine) incolore en formant un colorant rouge à structure quinonéimine. L'absorption du produit généré est mesurée à 505 nm et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du glucose.

III.2 Bilan rénal

III.2.1 Dosage de l'urée

L'urée plasmatique est quantifiée par une méthode colorimétrique basée sur l'utilisation du diacetylmonooxine et des ions Fe^{+3} (**Kits Spinreact, Ctra. Santa Coloma, Espagne**). L'urée réagit avec le diacetylmonooxine en présence d'ions Fe^{+3} et d'un réducteur, pour donner un complexe coloré en rose. L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la quantité d'urée présente dans l'échantillon. La lecture se fait à une longueur d'onde de 525 nm.

III.2.2 Dosage de la créatinine

En milieu alcalin, la créatinine forme avec le picrate un complexe coloré en jaune orange. La vitesse de développement de la coloration est mesurée à une longueur d'onde égale à 500 nm (**Kits Spinreact, Ctra. Santa Coloma, Espagne**).

III.2.3 Dosage de l'acide urique

L'acide urique est oxydé par l'uricase en allantoïne et peroxyde d'hydrogène ($2H_2O_2$) lequel, en présence de peroxydase (POD), 4-aminophénazone (4-AF) et 2-4 DichlorophénolSulfonate (DCPS), forme un composé rosacé. L'intensité de quinone-imine rouge formée est proportionnelle à la concentration d'acide urique présent dans l'échantillon testé. La lecture se fait à une longueur d'onde de 520 nm (**Kits Spinreact, Ctra. Santa Coloma, Espagne**).

III.3 Bilan lipidique

III.3.1 Dosage du cholestérol total

Le dosage du cholestérol total plasmatique est réalisé par une méthode enzymatique (**Kits SPINREACT, Ctra. Santa Coloma, Espagne**) sur le plasma. La réaction consiste à libérer le cholestérol de la liaison ester par la cholestérol-estérase, et d'oxyder le cholestérol libre non estérifié par la cholestérol-oxydase.

L'indicateur est une quinonéimine formée à partir de peroxyde d'hydrogène, de la 4-aminophénazone, sous l'action catalytique de la peroxydase. La concentration en quinonéimine colorée est mesurée à 505 nm, elle est proportionnelle à la concentration en cholestérol total.

III.3.2 Dosage des triglycérides

Les triglycérides plasmatiques sont dosés par une méthode enzymatique (**Kits Spinreact, Ctra. Santa Coloma, Espagne**), sur le plasma. Les triglycérides sont dosés après hydrolyse enzymatique par des lipases en glycérol et acides gras libres. L'indicateur est une quinonéimine formée à partir de peroxyde d'hydrogène, de la 4-aminoantipyrine et du 4-chlorophénol sous l'action catalytique de la peroxydase. Le taux des triglycérides est déterminé à une longueur d'ondes de 505 nm. La concentration en quinonéimine est proportionnelle à la concentration totale en triglycérides.

III.3.3 Dosages des lipoprotéines de haute densité (HDL) et de basse densité (LDL)

Le dosage des lipoprotéines de haute densité (HDL) plasmatiques est réalisé par méthode enzymatique après précipitation des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et de basse densité (LDL) selon le protocole donné par le **Kit SPINREACT Ctra. Santa Coloma, Espagne**). Les lipoprotéines VLDL et LDL plasmatiques sont précipitées par le réactif phosphotungstate en présence d'ions de magnésium. Après centrifugation, le surnageant contient les lipoprotéines HDL. Le taux de HDL cholestérol est déterminé à une longueur d'ondes de 505 nm. Le taux de LDL cholestérol est calculé selon la relation suivante :

$$\text{LDL} = \text{Cholestérol total} - \text{HDL} - (\text{TG}/5).$$

IV Marqueurs de statut oxydant /antioxydant

IV.1 Statut oxydant

IV.1.1 Dosage de l'anion superoxyde (Auclair et voisin, 1985)

Le dosage de l'anion superoxyde plasmatiques et érythrocytaires est basé sur la réduction de nitrobluetetrazolium (NBT) en monoformazon en présence des radicaux Superoxydes. La couleur jaune obtenue est mesurée à 550 nm.

IV.1.2 Dosage de malondialdéhyde (Draper et Hadley, 1990)

Le malondialdéhyde (MDA) plasmatique et érythrocytaire est mesuré selon une Méthode biochimique. Il représente le marqueur le plus utilisé en peroxydation, notamment par la simplicité et la sensibilité de la méthode de dosage. Après traitement par l'acide à chaud, les aldéhydes réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un produit de condensation chromogénique consistant en 2 molécules de TBA et une molécule de MDA. L'absorption intense de ce chromogène se fait à une longueur d'onde de 532 nm. La

Concentration du MDA est calculée en utilisant le coefficient d'extinction du complexe MDA-TBA ;

$$\varepsilon = 1,56.105 \text{ M}^{-1} \cdot \text{Cm}^{-1} \text{ à } 532 \text{ MDA-TB}$$

IV.2 Marqueurs du statut antioxydant

IV.2.1 Dosage de la vitamine C (Jacota et Dani, 1982)

La vitamine C plasmatique est dosée en utilisant le réactif de Folin et une gamme étalon D'acide Ascorbique. Après Précipitation Des Protéines Plasmatiques Par L'acide Trichloroacétique (TCA) et centrifugation, le surnageant est incubé en présence du réactif de Coloration Folin ciocalteau dilué. La vitamine C présente dans le plasma réduit le réactif de Folin donnant une coloration jaune. L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à La concentration en vitamine C à une longueur d'onde de 769 nm présente dans l'échantillon. La concentration est déterminée à partir du courbe étalon obtenu grâce à une solution d'acide Ascorbique.

IV.2.2 Détermination de l'activité enzymatique de la catalase (EC : 1.11.1.6) (Clairborne, 1985)

L'activité de la catalase érythrocytaire est déterminée en suivant la méthode de **Clairborne, 1985**. Cette technique se base sur la disparition de l'H₂O₂ à 25°C par la présence de la source enzymatique catalase. La réaction est contrôlée par une lecture continue du changement d'absorbance à 240 nm toutes les minutes pendant cinq minutes (lecture T₀ et T₅).

Calcule :
$$K = (2,303/T) \times \log A_0 / A_5$$

K : Concentration de vitesse de la réaction

T : Le temps d'intervalle (5 min)

A₀ : Absorbance à T₀

A₅ : Absorbance à T₅

$$\text{Activité catalase (UI/mg)} = K/n$$

n : mg de protéines en mg présentent dans le volume de l'échantillon utilise.

UI/mg de protéines : $\mu\text{mol d'H}_2\text{O}_2$ consommé/min/ml de protéines

IV.2.3 Dosage du superoxyde dismutase (SOD)

Le dosage de la superoxyde Dismutase (SOD) plasmatique et érythrocytaire est réalisé par la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Phénol (**Marklund, 1985**). Cette technique repose sur la capacité de l'inhibition de l'auto- oxydation du phénol par la SOD. La lecture se fait à 270 nm toutes les minutes pendant 5 minutes (DO0 à DO5). La concentration en SOD érythrocytaires et plasmatiques est exprimée en (mM/min/ml) et calculer par la méthode suivante :

$$\text{Activité SOD} = (50 \times Y / 5) \times 10 \dots\dots (\text{mM/min/ml})$$

V Culture lymphocytaire

V.1 Isolement et incubation des cellules lymphocytaires

L'isolement des cellules lymphocytaires a été fait à partir d'un prélèvement sanguin sur tube EDTA à partir des personnes témoins et des personnes atteintes d'IRC par centrifugation dans un gradient de saccharose à 2000 tours pendant 45 min.

La migration différentielle durant la centrifugation résulte en la formation de différentes couches contenant les différents types de cellules sanguines. Ainsi, les globules rouges et les granulocytes sédimentent complètement et se retrouvent dans le culot. Les lymphocytes se trouvent au-dessus de la couche de saccharose. Les lymphocytes sont récupérés et mis en suspension dans le milieu culture RPMI- 1640 supplémenté en glucose, sérum humain et quelques gouttes d'antibiotique.

V.2 Préparation de la suspension cellulaire

Afin de tester la viabilité des cellules isolées, 20 µl de suspension cellulaire sont prélevés dans un tube sec et complétés à 1 ml du RPMI-1640, une goutte de Giemsa est ajoutée pour visualiser les cellules lymphocytaires vivantes, la numération cellulaire est effectuée sur la chambre quadrillée de la cellule de Malassez couverte d'une lame. Par la suite, la suspension cellulaire est ajustée à une concentration précise et ainsi préparée pour effectuer les différentes incubations.

Les incubations sont réalisées de la façon suivante :

Dans chaque puit, 100 µl de suspension cellulaire sont déposés. Par la suite, les différentes molécules bioactives sont ajoutées sous un volume de 20µl. Les puits sont complétés à 200 µl (volume final) avec du RPMI-1640.

Les cultures sont réalisées sur des microplaques de 72 puits et les essais sont réalisés en triples.

Afin de déterminer les effets de différentes substances sur la fonction lymphocytaire *in vitro*, la vitamine C, l'huile essentielle de *Thymus fontaneisii* de la wilaya de Tissemsilt, seuls ou en combinaison et sont ajoutés et à différentes concentrations dans les puits contenant les cellules lymphocytaires. Les plaques sont ensuite mises à incuber pendant 24h à 37 °C, 5 % de CO₂ dans un incubateur.

La composition des puits est la suivante :

Puit 01 : 100 µl de suspension cellulaire + 100 µl de milieu basal RPMI-1640

Puit 02 : 100 µl de suspension cellulaire + 80 µl milieu basal RPMI-1640+ 20 µl d'insuline

Puit 03 : 100 µl de suspension cellulaire + 60 µl milieu basal RPMI-1640 + 20 µl d'insuline + 20 µl vitamine C à 50 µmol/l

Puit 04 : 100 µl de suspension cellulaire + 60 Milieu basal RPMI-1640 + 20 µl d'insuline + 20 µl vitamine C à 75 µmol/l

Puit 05 : 100 µl de suspension cellulaire + 60 milieu basal RPMI-1640+20 µl d'insuline + 20 µl vitamine C à 100 µmol/l

Puit 06 : 100 µl de suspension cellulaire + 60 µl milieu basal RPMI-1640 + 20 µl d'insuline + 20 µl d'huile essentielle de *Thymus fontanesii* à 25 µl/ml

Puit 07 : 100 µl de suspension cellulaire + 60 µl milieu basal RPMI-1640 +20 µl d'insuline + 20 µl d'huile essentielle de *Thymus fontanesii* à 12,5 µl/ml

Puit 08 : 100 µl de suspension cellulaire + 60 µl milieu basal RPMI-1640+20 µl d'insuline + 20 µl d'huile essentielle de *Thymus fontanesii* à 6,25 µl/ml

Puit 09 : 100 µl de suspension cellulaire + 60 µl milieu basal RPMI-1640+ 20 µl d'insuline + 20 µl d'huile essentielle de *Thymus fontanesii* à 3,125 µl/ml

Puit 10 : 100 µl de suspension cellulaire + 60 µl milieu basal RPMI-1640+20 µl d'insuline + 20 µl d'huile essentielle de *Thymus fontanesii* à 1,56 µl/ml

Puit 11 : 100 µl de suspension cellulaire + 60 µl milieu basal RPMI-1640+20 µl d'insuline + 20 µl d'huile essentielle de *Thymus fontanesii* à 0,78 µl/ml

Puit 12 : 100 µl de suspension cellulaire + 60 µl milieu basal RPMI-1640+20 µl d'insuline + 20 µl d'huile essentielle de *Thymus fontanesii* à 0,39 µl/ml

Puit 13 : 100 µl de suspension cellulaire + 40 µl milieu basal RPMI-1640+20 µl d'insuline + 20 µl vitamine C à 75 µmol/l + 20 µl d'huile essentielle de *Thymus fontanesii* à 25 µl/ml

Puit 14 : 100 µl de suspension cellulaire + 40 µl milieu basal RPMI-1640+20 µl d'insuline + 20 µl vitamine C à 75 µmol/l + 20 µl d'huile essentielle de *Thymus fontanesii* à 12,5 µl/ml

Puit 15 : 100 µl de suspension cellulaire + 40 µl milieu basal RPMI-1640+20 µl d'insuline + 20 µl vitamine C à 75 µmol/l + 20 µl d'huile essentielle de *Thymus fontanesii* à 6,25 µl/ml

Puit 16 : 100 µl de suspension cellulaire + 40 µl milieu basal RPMI-1640+20 µl d'insuline + 20 µl vitamine C à 75 µmol/l + 20 µl d'huile essentielle de *Thymus fontanesii* à 3,125 µl/ml

Puit 17 : 100 µl de suspension cellulaire + 40 µl milieu basal RPMI-1640+20 µl d'insuline +20 µl d'insuline + 20 µl vitamine C à 75 µmol/l + 20 µl d'huile essentielle de *Thymus fontanesii* à 1,56 µl/ml

Puit 18 : µl de suspension cellulaire + 40 µl milieu basal RPMI-1640+20 µl d'insuline +20 µl d'insuline + 20 µl vitamine C à 75 µmol/l + 20 µl d'huile essentielle de *Thymus fontanesii* à 0,78 µl/ml

Puit 19 : 100 µl de suspension cellulaire + 40 µl milieu basal RPMI-1640+20 µl d'insuline +20 µl d'insuline + 20 µl vitamine C à 75 µmol/l + 20 µl d'huile essentielle de *Thymus fontanesii* à 0,39 µl/ml

Après les différentes incubations, la détermination de la prolifération lymphocytaire a été faite par comptage des cellules sur lame en utilisant l'éosine.

Le reste des cellules lymphocytaires est lysé avec le tampon de lyse (NaOH). Après incubation pendant 10 min et centrifugation à 6000 tours pendant 5 min, le surnageant (lysât lymphocytaire) est récupéré et dilué dans le tampon PBS (0,01 M, pH = 7,2), le lysât

lymphocytaire servira au dosage des paramètres du statut oxydant/antioxydant intracellulaire (MDA, SOD).

Résultats et Interprétations

I Caractéristiques de la population étudiée

Les caractéristiques de la population étudiée, l'âge, la taille, le poids, le sexe et l'IMC ne présentent aucune variation significative chez les deux populations (**Tableau 02**).

II Paramètres biochimiques chez les deux groupes

Les résultats montrent des perturbations métaboliques des paramètres biochimiques représentées par une augmentation des teneurs en créatinine, urée, acide urique, cholestérol total, triglycérides chez les patients comparés aux témoins (**Tableau 03**). En revanche, les niveaux de HDL augmentent significativement chez les personnes malades par rapport aux témoins (**Tableau 03**).

III Statut oxydant /antioxydant chez la population témoins et atteintes d'insuffisance rénale chronique

III.1 Marqueurs du statut antioxydant chez les personnes malades et saines

Les teneurs plasmatiques en vitamine C ne montrent aucune modification significative entre les personnes malades et les personnes saines (**Figure 06**).

L'activité de la catalase diminue significativement chez les personnes malades comparées aux témoins (**Figure 07**). Tandis que, les activités de la superoxyde dismutase plasmatique et érythrocytaires sont similaires chez les deux groupes (**Figure 08**).

III.2 Marqueurs du statut oxydant chez les personnes malades et saines

Nos résultats indiquent que les teneurs plasmatiques et érythrocytaires en MDA sont similaires entre les deux groupes (**Figure 09**). Les taux érythrocytaire de l'anion superoxyde augmentent significativement chez les malades par rapport aux témoins. Tandis que les taux plasmatiques de l'anion superoxyde sont identiques entre les deux groupes (**Figure 10**).

Tableau 02. Caractéristiques de la population étudiée

Caractéristiques	Personnes saines	Personnes malades
Nombre	20	20
Age (ans)	37 ± 1	52 ± 1**
Taille (m)	1,69 ± 0,006	1,67 ± 0,005
Sexe (Femmes/hommes)	8/12	8/12
Poids (kg)	67,10 ± 0,92	66,70 ± 0,79
IMC (Kg/m²)	23,34 ± 0,25	23,84 ± 0,25

Chaque valeur correspond à la moyenne ± Écart type.

La comparaison de moyennes est faite par la loi de Student, après analyse de la variance.

Personnes malades comparées aux personnes saines.

IMC : incidence du masse corporelle, **IMC = Poids (Kg)/[Taille (m)]²**

Tableau 03. Paramètres biochimiques chez les deux groupes

Paramètres	Personnes saines	Personnes malades	Valeurs de référence
Créatinine (mg/l)	7,99 ± 0,20	23,16 ± 0,98***	5-14
Urée (g/l)	0,23 ± 0,01	2,12 ± 0,25**	0,10-0,55
Acide urique (mg/l)	31,01 ± 1,79	77,36 ± 1,10***	20-70
Glycémie (g/l)	0,74 ± 0,01	1,15 ± 0,07*	0,70-1,10
Cholestérol total (g/l)	1,33 ± 0,04	4,01 ± 0,34*	1,5-2,5
Triglycérides (g/l)	0,58 ± 0,02	4,64 ± 0,44**	0,40-1,60
HDL (g/l)	0,46 ± 0,03	1,30 ± 0,16*	> 0,30
LDL (mg/l)	0,75 ± 0,03	2,25 ± 0,33	<1,30

Chaque valeur correspond à la moyenne ± Écart type.

La comparaison de moyennes est faite par la loi de Student, après analyse de la variance.

Personnes malades comparées aux personnes saines : * P < 0,05 ; **P< 0,01 ; ***P< 0,001.

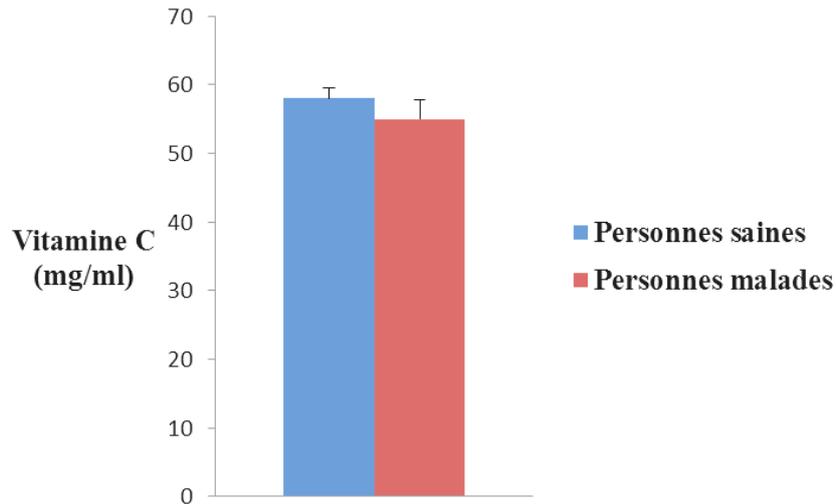


Figure 06. Teneurs plasmatiques en vitamine C chez les personnes malades et saines

Chaque valeur correspond à la moyenne \pm Écart type.

La comparaison de moyennes est faite par la loi de Student, après analyse de la variance.

Personnes malades comparées aux personnes saines.

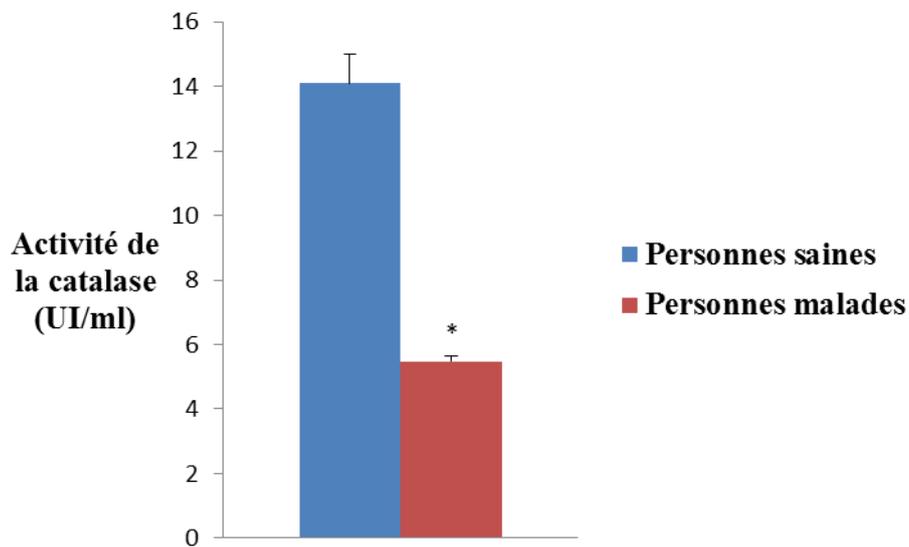


Figure07. Activité de la catalase érythrocytaire chez les personnes malades et saines

Chaque valeur correspond à la moyenne \pm Écart type.

La comparaison de moyennes est faite par la loi de Student, après analyse de la variance.

Personnes malades comparées aux personnes saines. * P < 0,05.

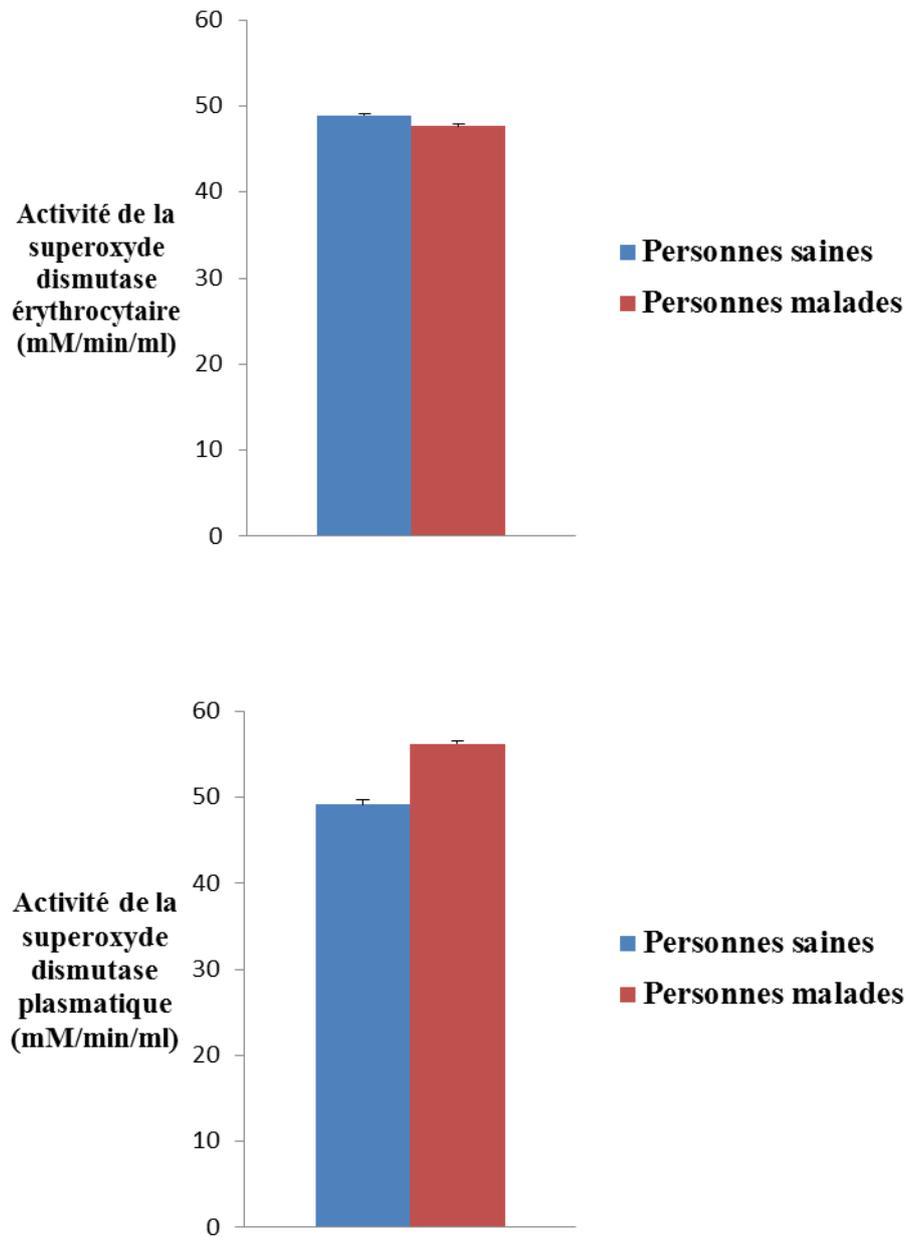


Figure08. Activité de la superoxyde dismutase érythrocytaire et plasmatique chez les personnes malades et saines

Chaque valeur correspond à la moyenne \pm Écart type.

La comparaison de moyennes est faite par la loi de Student, après analyse de la variance.

Personnes malades comparées aux personnes saines.

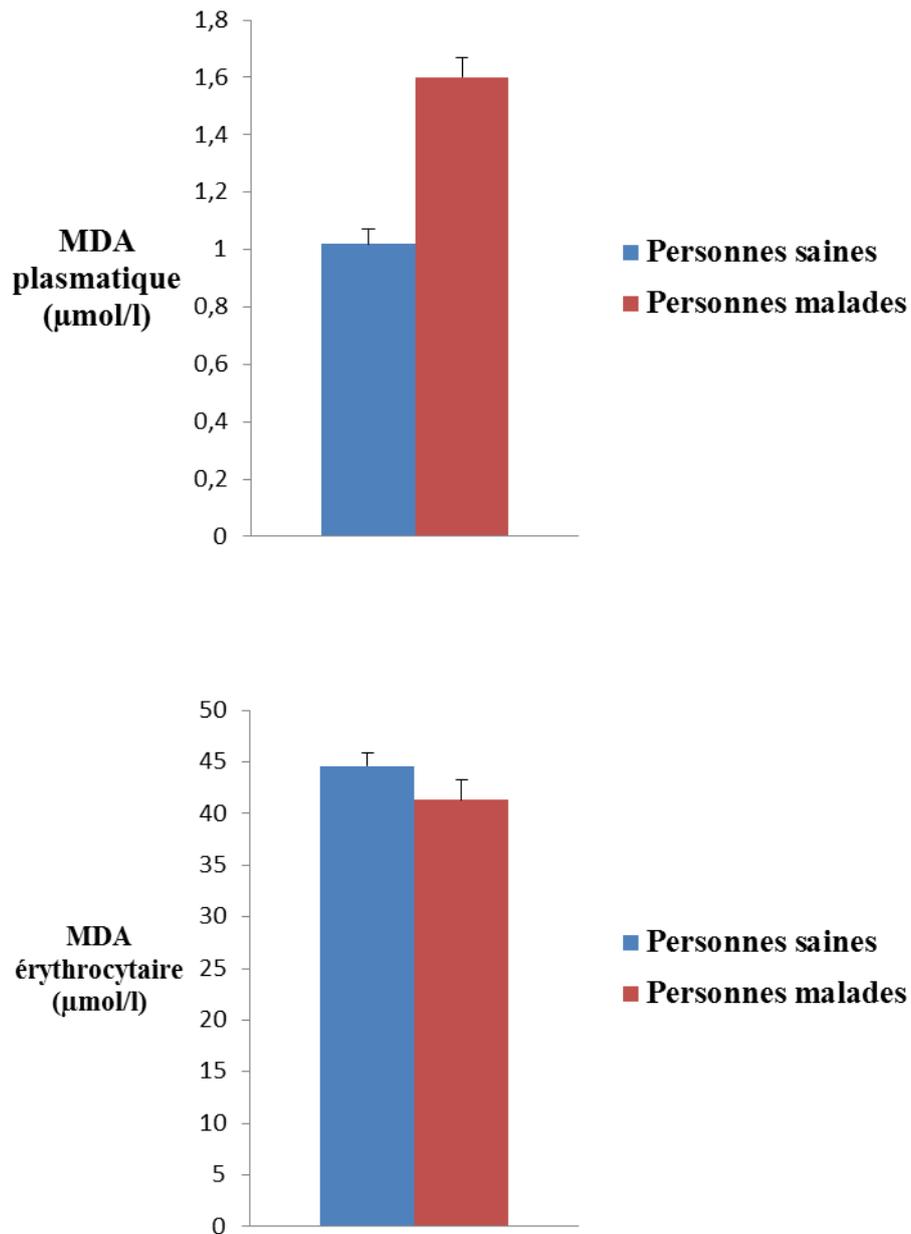


Figure 09. Teneurs plasmatiques et érythrocytaires en MDA chez les personnes malades et saines.

Chaque valeur correspond à la moyenne \pm Écart type.

La comparaison de moyennes est faite par la loi de Student, après analyse de la variance.

Personnes malades comparées aux personnes saines.

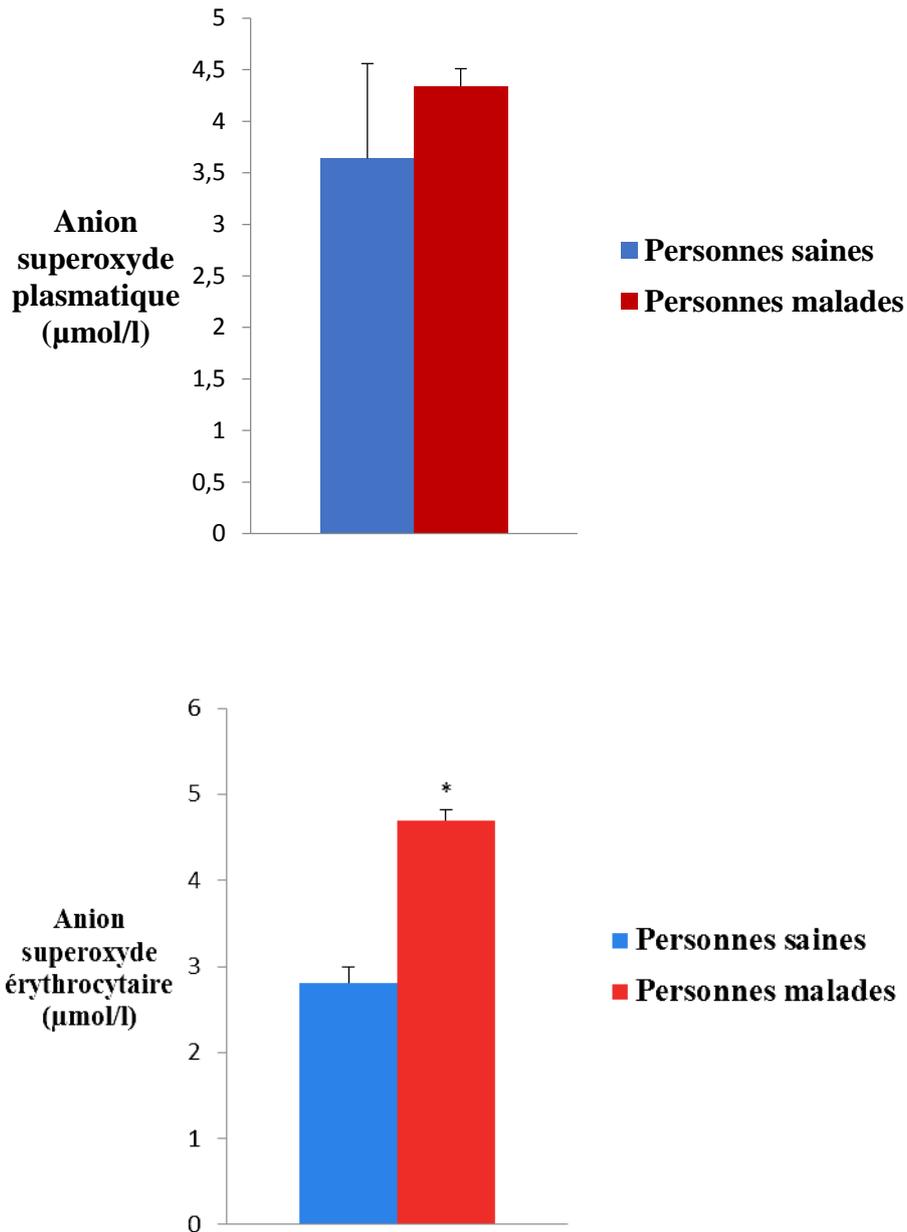


Figure 10. Teneurs plasmatiques et érythrocytaires en anion superoxyde chez les personnes malades et saines.

Chaque valeur correspond à la moyenne \pm Écart type.

La comparaison de moyennes est faite par la loi de Student, après analyse de la variance.

Personnes malades comparées aux personnes saines : * P < 0,05.

Tableau 04. Effets des différentes molécules (vitamine C, huile essentielles) à différentes concentrations sur la prolifération des lymphocytes in vitro chez les patients insuffisants rénaux et les personnes saines.

Incubations	Patients insuffisants rénaux	personnes saines (témoins)
Milieu basal	1180 ± 57	1425 ± 22
Insuline	3623 ± 115	1763 ± 4
Vitamine C (50µmol/l)	1614 ± 10	1678 ± 8
Vitamine C (75 µmol/l)	3853 ± 77	3490 ± 10 ^a
Vitamine C (100 µmol/l)	1748 ± 5	1852 ± 10
<i>Thymus fontaneisii</i> (0,39 µl/ml)	640 ± 141	480 ± 14
<i>Thymus fontaneisii</i> (0,78 µl/ml)	1110 ± 99	1020 ± 7
<i>Thymus fontaneisii</i> (1,56 µl/ml)	1080 ± 170	1300 ± 14
<i>Thymus fontaneisii</i> (3,125 µl/ml)	1430 ± 42	1780 ± 7
<i>Thymus fontaneisii</i> (6,25 µl/ml)	12590 ± 4257 ^a	1885 ± 7
<i>Thymus fontaneisii</i> (12,50 µl/ml)	1870 ± 42	1300 ± 21
<i>Thymus fontaneisii</i> (25 µl/ml)	2680 ± 141	1110 ± 71
<i>Thymus fontaneisii</i> (0,39 µl/ml) + Vitamine C 75 µmol/l	1150 ± 71	800 ± 21
<i>Thymus fontaneisii</i> (0,78 µl/ml) +	1400 ± 57	1120 ± 14

Vitamine C (75 µmol/l)		
<i>Thymus fontaneisii</i> (1,56 µl/ml) + Vitamine C (75 µmol/l)	1270 ± 42	1520 ± 14
<i>Thymus fontaneisii</i> (3,125 µl/ml) + Vitamine C (75 µmol/l)	1430 ± 42	1835 ± 11
<i>Thymus fontaneisii</i> (6,25 µl/ml) + Vitamine C (75 µmol/l)	2734 ± 218	2200 ± 71 ^b
<i>Thymus fontaneisii</i> (12,50 µl/ml) + Vitamine C (75 µmol/l)	1750 ± 42	1850 ± 7
<i>Thymus fontaneisii</i> (25 µl/ml) + Vitamine C (75 µmol/l)	1400 ±	1740 ± 28

Tableau 05. Effets des différentes molécules (vitamine C, huile essentielles) à différentes concentrations sur les teneurs en MDA ($\mu\text{mol/l}$) in vitro chez les patients insuffisants rénaux et les personnes saines.

Incubations	Patients insuffisants rénaux	personnes saines (témoins)
Milieu basal	$1,23 \pm 0,65$	$0,53 \pm 0,023$
Insuline	$0,58 \pm 0,25$	$0,25 \pm 0,014$
Vitamine C ($50\mu\text{mol/l}$)	$0,71 \pm 0,40$	$2,03 \pm 2,680$
Vitamine C ($75 \mu\text{mol/l}$)	$0,79 \pm 0,48$	$3,03 \pm 2,249$
Vitamine C ($100 \mu\text{mol/l}$)	$0,63 \pm 0,30$	$0,94 \pm 0,013$
<i>Thymus fontaneisii</i> ($0,39 \mu\text{l/ml}$)	$0,77 \pm 0,36$	$0,22 \pm 0,006$
<i>Thymus fontaneisii</i> ($0,78 \mu\text{l/ml}$)	$0,52 \pm 0,52$	$0,19 \pm 0,015$
<i>Thymus fontaneisii</i> ($1,56 \mu\text{l/ml}$)	$0,74 \pm 0,34$	$0,20 \pm 0,001$
<i>Thymus fontaneisii</i> ($3,125 \mu\text{l/ml}$)	$0,83 \pm 0,15$	$0,25 \pm 0,005$
<i>Thymus fontaneisii</i> ($6,25 \mu\text{l/ml}$)	$0,75 \pm 0,47$	$0,10 \pm 0,009$
<i>Thymus fontaneisii</i> ($12,50 \mu\text{l/ml}$)	$0,86 \pm 0,50$	$0,29 \pm 0,017$
<i>Thymus fontaneisii</i> ($25 \mu\text{l/ml}$)	$0,70 \pm 0,49$	$0,39 \pm 0,020$
<i>Thymus fontaneisii</i> ($0,39 \mu\text{l/ml}$) + Vitamine C ($75 \mu\text{mol/l}$)	$1,57 \pm 0,73$	$0,12 \pm 0,0004$
<i>Thymus fontaneisii</i> ($0,78 \mu\text{l/ml}$) + Vitamine C ($75 \mu\text{mol/l}$)	$1,53 \pm 0,52$	$0,03 \pm 0,001$
<i>Thymus fontaneisii</i> ($1,56 \mu\text{l/ml}$) +	$1,47 \pm 0,79$	$0,22 \pm 0,006$

Vitamine C (75 µmol/l)		
<i>Thymus fontaneisii</i> (3,125 µl/ml) + Vitamine C (75 µmol/l)	0,69 ± 0,51	0,36 ± 0,001
<i>Thymus fontaneisii</i> (6,25 µl/ml) + Vitamine C (75 µmol/l)	0,77 ± 0,29	0,10 ± 0,003
<i>Thymus fontaneisii</i> (12,50 µl/ml) + Vitamine C (75 µmol/l)	0,90 ± 0,48	0,06 ± 0,006
<i>Thymus fontaneisii</i> (25 µl/ml) + Vitamine C (75 µmol/l)	1,41 ± 0,85	0,18 ± 0,012

Tableau 06. Effets des différentes molécules (vitamine C, huile essentielles) à différentes concentrations sur l'activité de SOD (mM/min/ml) in vitro chez les patients insuffisants rénaux et les personnes saines.

Incubations	Patients insuffisants rénaux	personnes saines (témoins)
Milieu basal	40,81 ± 14,79	45.11 ± 0,12
Insuline	36,29 ± 22,77	52,26 ± 0,06
Vitamine C (50µmol/l)	53,74 ± 26,37	51,60 ± 3,74
Vitamine C (75 µmol/l)	51,85 ± 11,83	51,61 ± 2,40
Vitamine C (100 µmol/l)	48,02 ± 23,73	55,15 ± 0,40
<i>Thymus fontaneisii</i> (0,39 µl/ml)	50,46 ± 0,03	50,90 ± 0,15
<i>Thymus fontaneisii</i> (0,78 µl/ml)	57,84 ± 10,13	51,01 ± 0,71
<i>Thymus fontaneisii</i> (1,56 µl/ml)	62,08 ± 35,95	50,52 ± 0,73
<i>Thymus fontaneisii</i> (3,125 µl/ml)	60,28 ± 6,97	48,47 ± 0,66
<i>Thymus fontaneisii</i> (6,25 µl/ml)	52,51 ± 12,42	56,17 ± 0,61
<i>Thymus fontaneisii</i> (12,50 µl/ml)	46,26 ± 7,33	48,76 ± 0,43
<i>Thymus fontaneisii</i> (25 µl/ml)	45,33 ± 3,39	50,61± 0,71
<i>Thymus fontaneisii</i> (0,39 µl/ml) + Vitamine C (75 µmol/l)	35,61 ± 18,93	45,94 ± 0,08
<i>Thymus fontaneisii</i> (0,78 µl/ml) + Vitamine C (75 µmol/l)	37,76 ± 9,20	51,30 ± 0,42

<i>Thymus fontaneisii</i> (1,56 µl/ml) + Vitamine C (75 µmol/l)	32,16 ± 20,24	46,99 ± 0,01
<i>Thymus fontaneisii</i> (3,125 µl/ml) + Vitamine C (75 µmol/l)	37,31 ± 17,41	52,99 ± 0,01
<i>Thymus fontaneisii</i> (6,25 µl/ml) + Vitamine C (75 µmol/l)	50,86 ± 0,31	50,55 ± 0,78
<i>Thymus fontaneisii</i> (12,50 µl/ml) + Vitamine C (75 µmol/l)	53,61 ± 9,04	48,02 ± 0,03
<i>Thymus fontaneisii</i> (25 µl/ml) + Vitamine C (75 µmol/l)	36,50 ± 15,00	45,91 ± 0,13

IV Résultats de l'étude *in vitro*

En ce qui concerne la prolifération des cellules, la concentration en vitamine C qui l'augmente est celle de 75 µmol/l chez les malades et chez les témoins respectivement. Tandis que, les concentrations en huile essentielle (HE) de *Thymus fontaneisii* qui augmentent la prolifération des cellules chez les cas et témoins est celle de 6,25 µl/ml. La même concentration en HE induit une bonne prolifération en combinaison avec la vitamine C à 75 µmol/l (**Tableau 04**).

D'autre part, la concentration en vitamine C qui diminue les teneurs en MDA soit pour les malades ou les témoins est égale à 100 µmol/l. A propos d'HE, la concentration qui minimise les taux de MDA est celle de 6,25 µl/ml chez les témoins et celle de 0,78 µl/ml chez les malades. Quand on combine la vitamine C à l'HE, on trouve chez les deux groupes que vitamine C à 75 µmol/l et l'HE à 6,25 µl/ml diminue le MDA par rapport aux autres concentrations (**Tableau 05**).

A propos de l'enzyme SOD, le meilleur résultat est obtenu pour la vitamine C à une concentration égale à 50 µmol/l chez les malades et 100 µmol/l chez les témoins. Chez les malades une concentration en HE de 1,56 µl/ml et chez les témoins une concentration de 6,25 µl/ml augmentent l'activité de la SOD. L'association de la vitamine C à l'HE chez les

malades induit une augmentation de l'activité de SOD à 75 $\mu\text{mol/L}$ pour la vitamine C et de 12,5 $\mu\text{l/ml}$ pour l'HE. Par contre, chez les témoins les deux concentrations qui provoquent l'augmentation de l'activité de la SOD sont 75 $\mu\text{mol/l}$ pour la vitamine C et 3,125 $\mu\text{l/ml}$ pour l'HE (**Tableau 06**).

Discussion

Discussion

D'après les dernières données, 850 millions de personnes souffrent d'insuffisance rénale chronique dans le monde entier (**Polenakovic et al., 2021**). L'hypertension artérielle représente un facteur de risque primordial dans le développement l'IRC et sa progression vers le stade final, il a été reporté aussi que le risque de l'hypertension artérielle est plus élevé chez les hommes que les femmes (**Weldegiorgis et Woodward, 2020**). Dans notre étude l'hypertension est le facteur déclenchant de la maladie rénal.

L'IRC est un syndrome engendré suite à une réduction du nombre et de la fonction des néphrons actifs. L'altération de la fonction rénale est très critique en affectant les différentes voies métaboliques de l'organisme. L'IRC est responsable d'une gamme désordres comme l'ostéodystrophie, la progression rapide de l'athérosclérose et anémie.. (**Kandi, 2017**). D'autre part, l'accumulation de l'urée dans le sang provoque un état d'inflammation responsable de l'accentuation du phénomène de stress oxydant et l'adhésion cellulaire perméabilisation endothéliale chez les patients insuffisants rénaux (**Claro et al., 2018 ; da Cunha et al., 2020**).

La vitamine C est un antioxydant exogène majeur apporté exclusivement par l'alimentation. Elle inhibe la peroxydation lipidique et diminue le dysfonctionnement endothélial. Elle peut jouer à la fois le rôle d'un antioxydant et d'un pro-oxydant en présence des métaux de transition comme le fer ce qui augmente la production des espèces réactives. D'après la littérature, les personnes dialysées témoignent des valeurs plasmatiques faibles en vitamine C par rapport aux témoins à cause des pertes urinaires. La supplémentation orale est recommandée chez ces patients surtout durant la séance de dialyse (300 mg) (**Deicher et Hörl, 2003**). La supplémentation intraveineuse en vitamine C de l'ordre de 2g/jour est essentielle afin de rétablir les concentrations plasmatiques (**Honore et al., 2020**).

Les résultats de la présente étude montre que les teneurs en vitamine C sont similaires entre les deux groupes. Ceci peut être expliqué par la période au cours de laquelle l'étude est effectuée, celle de l'hiver qui connait une richesse en agrumes sur le marché.

Le MDA est le marqueur le plus utilisé pour évaluer la peroxydation lipidique. Dans notre étude, les teneurs plasmatiques en MDA montrent une augmentation qui n'est pas significatives chez les patients comparés aux témoins. Tandis que, les taux érythrocytaires de MDA sont semblables entre les deux groupes. Par contre, **Zhu et al. 2021** ont montré que les

niveaux sériques de MDA augmentent significativement chez les patients comparés aux témoins et sont corrélés positivement avec les concentrations en créatinine (**Zhu et al., 2021**).

La superoxyde dismutase est une enzyme antioxydante assurant la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et en oxygène moléculaire. Il existe trois isoformes de SOD ; SOD1 (CuZnSOD) se trouve dans les globules rouges, SOD2 (MnSOD) se trouve dans les mitochondries, SOD3 extracellulaire (Cu-Zn).

Selon les résultats que nous avons trouvés, les activités des superoxydes dismutases plasmatiques et érythrocytaires sont pareilles chez les deux groupes. Par contre, une autre étude effectuée par **Zhu et al. 2021** ont montré que l'activité de la superoxyde dismutase est significativement diminuée chez les patients insuffisants rénaux chroniques (**Zhu et al., 2021**). En effet, l'hyper-expression ou la diminution de la SOD est associée à la sévérité et la progression de la pathologie rénale vers des stades beaucoup plus graves (**Siomek et al., 2010; Brzoska et al., 2011**). Il a été suggéré que l'activité de la SOD peut être altérée par la dialyse par rapport aux malades non-dialysés (**Zhu et al., 2021**).

La catalase est une enzyme antioxydante présente dans le foie, les poumons et les reins. Elle convertit le peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène. Il a été confirmé que la diminution de l'activité de catalase est combinée à une réduction de la fonction rénale et une accélération progressive de la fibrose rénale (**Kobayashi et al., 2005**). Une étude a montré que l'activité de la catalase érythrocytaire diminue avec la progression de la pathologie et elle est plus faible dans les stades 3 et 4 (**Tbahriti et al., 2014**).

Le stress oxydant et l'inflammation sont les principaux facteurs responsables de la progression de l'insuffisance rénale chronique (**Morena et al., 2002; Popolo et al., 2013; Qian, 2017**).

Les cytokines pro-inflammatoires produites par les lymphocytes et les adipocytes comme l'interleukine-6 (IL-6), l'interleukine-1 (IL-1), et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) sont associées à la sévérité de l'insuffisance rénale chronique. Les études expérimentales ont prouvé que les cytokines pro-inflammatoires sont les facteurs clés de plusieurs complications au cours de la pathologie rénale comme la malnutrition, le score calcique coronaire, l'athérosclérose, la fibrillation auriculaire, l'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG), l'insuffisance cardiaque, et l'augmentation de la mortalité (**Stenvinkel et al., 1999 ; Shlipak et al., 2002 ; Gupta et al., 2012**), et l'insulino-résistance, le

dysfonctionnement endothélial, et les désordres du métabolisme minéral et osseux de l'IR (Clapp et al., 2004; Shoelson et al., 2006; Navarro-Gonzalez et al., 2011).

Il a été prouvé que la vitamine C *in vitro* améliore la différenciation et la prolifération des lymphocytes B et T en agissant sur les gènes et diminue l'apoptose de ces cellules (Molina et al., 2014). D'autres chercheurs ont montré que la supplémentation orale et intraveineuse en vitamine C de l'ordre de quelques grammes augmente la prolifération des lymphocytes chez des enfants asthmatiques et d'autres témoins sains (Anderson et al., 1980; Anderson et al., 1981; Anderson et al., 1980). En effet, l'exposition des lymphocytes à des substances toxiques altère leur fonction et la supplémentation en vitamine C restaure les réponses blastogènes des lymphocytes aux mitogènes (Heuser et Vojdani, 1997). Des études *in vitro* ont montré que la culture des cellules lymphocytaires en présence de la vitamine C diminue la production des cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- α l'interféron-gamma (IFN- γ) et augmente la synthèse des cytokines anti-inflammatoires comme IL-10 (Molina et al., 2014).

Conclusion

Conclusion

L'insuffisance rénale chronique est une maladie évolutive caractérisée par une détérioration de la fonction rénale au fil du temps. Les premiers stades de l'IRC (stades 2 et 3) présentent des lésions rénales et sont généralement asymptomatiques tandis que les stades les plus avancées (stades 4 et 5) nécessitent un traitement de l'urémie et de ses complications et éventuellement une thérapie de remplacement.

Cette étude vise à déterminer les effets *in vitro* de la vitamine C et l'huile essentielle de *Thymus fontaneisii* sur les altérations métaboliques au niveau des lymphocytes des patients insuffisants rénaux avant la séance de dialyse afin de corriger ces anomalies et diminuer le risque de complications pendant la séance de dialyse. D'autre part, une détermination des paramètres du statut oxydant/antioxydant est réalisée au niveau du plasma et du lysat chez les patients insuffisants rénaux et les personnes saines.

Les résultats obtenus du statut oxydant/antioxydant du plasma et du lysat indiquent que les patients atteints d'IRC présentent des teneurs élevées en anion superoxyde et une augmentation de l'activité de la SOD et une diminution de l'activité de catalase par rapport aux témoins.

En ce qui concerne l'étude *in vitro*, nos résultats indiquent que l'association de 6,25 µl/ml en huile essentielle et 75 µmol/l de vitamine C augmente la prolifération des lymphocytes. D'autre part, la concentration en vitamine C qui diminue les teneurs en MDA soit pour les malades ou les témoins est égale à 100 µmol/l. A propos de l'enzyme SOD, le meilleur résultat est obtenu pour la vitamine C à une concentration égale à 50 µmol/l chez les malades et 100 µmol/l chez les témoins.

Nous pouvons dire que la supplémentation en substances bioactives pourrait corriger les anomalies oxydatives au cours de l'insuffisance rénale et ainsi améliorer l'état de santé du patient.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

National kidney foundation. K/DOKI clinical practice guideline for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification (2002). *American journal of kidney disease* N° 39 (suppl 1):s1–246

Gueutin V, Deray G, Isnard-Bagnis C et al (2011). La physiologie renale. *J Pharma Clin* N° 30 (4) : 209-14

Organisation mondiale de la santé, 2015

Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé, Diagnostic de l'insuffisance rénale chronique chez l'adulte, 2002 (9)

El Housseini Y, Phan O, Burnier M et al (2009). Tabagisme et rein. *Rev Med Suisse* N° 5 : 457-62

Levey AS, de Jong PE, Coresh J et al. (2011). The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KADIGO Controversies Conference report. *Kidney Int* N° 80: 17-28

Levey AS, Eckhardt KU, Tsukamoto Y, et al. (2005). Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2005 N° 67 : 2089–100

Siomek A, Brzoska K, Sochanowicz B et al (2010). Cu,Zn-superoxide Dismutase Deficiency in Mice Leads to Organ-Specific Increase in Oxidatively Damaged DNA and NF-kappaB1 Protein Activity. *Acta Biochim. Pol.* N° 57 : 577-583

Shiao C C, Huang JW, Chien KL et al (2008) . Early initiation of Dialysis and late implantation of catheters adversely affect outcomes of patients on chronic Peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* N° 28 : 73-81

Jungers P, Joly D, Man NK et al (2011). *L'insuffisance rénale chronique (4° Éd) Prévention et traitement.* Médecine Sciences, 320P

Weisstuch, JM et Dworkin, LD (1992). Does essential hypertension cause end-stage renal disease?. *Kidney Int Suppl* N° 25 : 207–21

Taylor and Francis Group editors (2005). Battegay EJ, Lip GY, Bakris GL. Hypertension Principles and Practice.

Davidson MB, Hix JK, Vidt DG et al (2006). Association of impaired diurnal blood pressure variation with a subsequent decline In glomerular filtration rate. *Arch Intern Med* N° 166(8) : 846-52

Mogensen CE, Christensen CK, Vittinghus E (1983).The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes*, 32 Suppl 2: 64-78

Orth, SR et Ritz, E (2002). The renal risks of smoking: An Update. *Curropin Nephrol Hypertens* N° 11 : 483-8

Orth, SR et Hallan, SI (2008). Smoking:A risk factor for pro-Gression of chronic kidney disease and for cardiovascular morbidity and mortality in renal patients – absence of evidence or evidence of absence?. *Clin J Am Soc Nephrol* N° 3 : 226-36

Orth SR (2002). Smoking and the Kidney. *J Am Soc Nephrol* N°13 : 1663-72

Hélaridot D., Berl M., Rébillon M., Roussely B. (2006).Guide concours infirmier(e) anesthésiste Spécialisation santé 3^{ème} édition. Masson, p64.

Lacour B (2013). Physiologie du rein et bases physiopathologiques des maladies rénales, *Revue francophone des laboratoires* N° 451 (4) : 25-37

Borel J, Caron J, Chanard J, Gougeon J, Leutene M et al. (1984). *Comment prescrire et interpréter un examen de biochimie*, MAOINE 2^{ème} Ed : p 731-734

Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K et al (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et Métabolisme* N°16 : 233-239.

Durackova Z, Djrolo F, Hougbe H et al. (2008). *Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress*. Mitochondrial medicine. Gvozdjakova A (ed) : P 19-43

P.M. Gueye, (2007), Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge. Thèse pour le doctorat Sciences Pharmaceutiques. Université Louis Pasteur, Strasbourg.

Barber, D.Aet Harris, S.R. (1994). Oxygen free radicals and antioxidants:A review.*J.Am.Pharmacol* N° 534 : 26-35.

Abuja, P.M et Albertini, R (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica ChimicaActa* n° 306 : 1-17.

Favier A (2003). *Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique*. L'actualité Chimique : P108-115.

Dan Y (2008). Biological functions of antioxidants in plant transformation. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant* N° 44 : 149-161.

Mena S, Ortega A, Estrela J.M (2009). Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutat. Res* N° 674 : 36–44

Tian T, Wang Z, Zhang J (2017) Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2017, 4535194.

Zinczuk J, Zareba K, Kaminska J, Koper-Lenkiewicz O.M, Dymicka-Piekarska Vet al (2021). Association of Tumour Microenvironment with Protein Glycooxidation, DNA Damage, and Nitrosative Stress in Colorectal Cancer. *Cancer Manag. Res* N° 13 : 6329–6348

Locatelli F, Canaud B, Eckardt K.U, Stenvinkel P, Wanner C et al (2003). Oxidative stress in end-stage renal disease: An emerging threat to patient outcome. *Nephrol. Dial. Transplant* N° 18 : 1272–1280.

Hasselwander, O et Young, I.S (1998). Oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic. Res* N° 29 : 1–11

The Diabetes Control and Complications (DCCT) Research Group (1995). Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Kidney Int* N° 47 : 1703-1720

Polenakovic MH, Dohcev S, Rambabova-Bushljetik I, et al (2021). The importance of the World Kidney Day World Kidney Day - 11 March 2021 - living well with kidney disease. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)* N° 42 : 19-40.

Weldegiorgis, M, Woodward, M (2020). The impact of hypertension on chronic kidney disease and end-stage renal disease is greater in men than women: a systematic review and meta-analysis. *BMC Nephrol* N° 21 : 506

Vadakedath S Kandi V Dialysis: A review of the mechanisms underlying complications in the management of chronic renal failure. *Cureus* 2017 Aug9 (8): e1603 <https://doi.org/10.7759/cureus.1603> .

da Cunha RS, Santos AF, Barreto FC et al (2020). How do uremic toxins affect the endothelium? *Toxins* N° 12 : 412

Claro LM, Moreno-Amaral AN, Gadotti AC et al (2018). The impact of uremic toxicity induced inflammatory response on the cardiovascular burden in chronic kidney disease. *Toxins* N° 10 : 384

Honore, P.M., Spapen, H.D., Marik, P. et al. Dosing vitamin C in critically ill patients with special attention to renal replacement therapy: a narrative review. *Ann. Intensive Care* 10, 23 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13613-020-0640-6>

Zhu X, Zhang Y, Han J, et al (2021). Effects of Chronic Kidney Disease on levels of Oxidative Stress and Trace Elements. *Research Square* N° 1:1-12

Popolo A, Autore G, Pinto A et al (2013). Oxidative stress in patients with cardiovascular disease and chronic renal failure. *Free Radic. Res* N° 47: 346-356

Qian Q (2017). Inflammation: A Key Contributor to the Genesis and Progression of Chronic Kidney Disease. *Contrib. Nephrol* N° 191 : 72–83

Morena M, Cristol J.P, Senécal L et al (2002). Oxidative stress in hemodialysis patients: Is NADPH oxidase complex the culprit? *Kidney Int* N° 61 : 109-114

Gupta J, Mitra N, Kanetsky P.A et al (2012). Association between albuminuria, kidney function and inflammatory biomarker profile in CKD in CRIC. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol* N° 7 : 1938-1946

Shlipak M, Fried L.F, Crump C et al (2002). Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. *Circulation* N° 107 : 87-92

Stenvinkel P, Heimbürger O, Paulsen F et al (1999). Strong association between malnutrition, inflammation and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int* N° 55 : 1899-1911

Tbahriti HF, Messaoudi A, Kaddous A et al (2014). Le degré de l'insuffisance rénale chronique est associé aux taux de cytokines pro-inflammatoires, à l'hyperhomocystéinémie et au stress oxydant. *Annales de cardiologie et d'angéiologie* N° 63 :135-139

Molina N, Morandi A.C, Bolin A.P et al (2014). Comparative effect of fucoxanthin and vitamin C on oxidative and functional parameters of human lymphocytes. *Int. Immunopharmacol* N° 22 : 41-50

Anderson R, Oosthuizen R, Maritz R et al (1980). The effects of increasing weekly doses of ascorbate on certain cellular and humoral immune functions in normal volunteers. *Am. J. Clin. Nutr* N° 33 : 71-76

Anderson R (1981). Ascorbate-mediated stimulation of neutrophil motility and lymphocyte transformation by inhibition of the peroxidase/H₂O₂/halide system in vitro and in vivo. *Am. J. Clin. Nutr* N° 34 :1906-1911

Anderson R, Hay I, van Wyk H et al (1980). The effect of ascorbate on cellular humoral immunity in asthmatic children. *S. Afr. Med. J* N° 58 : 974-977

Heuser, G et Vojdani, A (1997). Enhancement of natural killer cell activity and T and B cell function by buffered vitamin C in patients exposed to toxic chemicals: The role of protein kinase-C. *Immunopharmacol. Immunotoxicol* N° 19 : 291-312 .

Petropoulos I. (2003). Stress oxydant et vieillissement modifications oxydatives des protéines au cours du vieillissement. Diderat. Paris p :5

<https://www.thierrysouccar.com/sante/info/les-radicaux-libres-quest-ce-que-cest-546>.

Gardès_Albert M, Bonnefont_Rousselot D, Abedinzadeh Z et al (2003). espèces réactives de l'oxygène, comment l'oxygène peut il devenir toxique. L'actualité chimique.

Hininger, I et Favier, A (2000). le stress oxydant. Laboratoire de Biologie du stress Oxydant. Faculté de Pharmacie. Grenoble.

Pincemail J, Le Goff C, Charlier C et al (2009). Évaluation biologique du stress oxydant. Université de Liège – CHU Sart Tilman (Liège, Belgique) (1) Département de Chirurgie Cardiovasculaire et CREDEC

Cillard, J et Cillard (2006). Mécanisme de la peroxydation lipidique et des antioxydations. Laboratoire de biologie cellulaire et végétale N° 13 : 24-29

Barber D.A., Harris S.R. (1994). Oxygen free radicals and antioxidants :A review. *J. Am. Pharmacol.* 534,26-35. Figure 5

Favier A. (2003). *Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique*. L'actualité.

Haleng J, Pincemail J, Defragne J O et al (2007). le stress oxydant. *Rev Med Liege* N° 10 : 628-638

Adjélé, W et Salamantian, L (2003). Les radicaux libres une question d'équilibre. Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines DESS IST.

Cuvelier C, Dotreppe O, Tstasse L (2003). Chimie, source alimentaires et dosage de la vitamine E. *Département des Productions Animales, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège B43* N° 147 : 315-324

Claude L.L (2000). rôle dans la prévention cardiovasculaire biodisponibilité. *Oléagineux, corps gras, lipides* N° 7(3) : 258-269

Rock E (2003). STRESS OXYDANT, MICRONUTRIMENTS ET. Université d#39;été de Nutrition : 17-19.

Simic M G, Jovanovic SV (1989). Antioxydation mechanisms of uric acid. *National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD (USA)* N° (15) :5788-5782

Whiteman M, Ketsawatsakul U, Halliwell B (2002). A reassessment of the peroxynitrite scavenging activity of uric acid. *Department of Biochemistry, Faculty of Medicine* N° 962 : 242-259

Ducros, V et Favier A (2004). Selenium metabolism. Département de biologie intégrée. Hôpital Michallon Grenoble.

Favier A (2003). Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique.

Ward A et Mcliesh Kenneth, R (2003). Oxydant stress in hemodialysis patients : What are the Determining Factors ? University of Louisville, Preston street.

Combe C, Cazin M.C, Vendrely B et al (2003). Les marqueurs inflammatoires chez les dialysés. Service de néphrologie, Centre hospitalier universitaire de Bordeaux.

Morena M, Martin_Mateo M, Cristol JP et al (2002). Stress oxydant, hémoincompatibilité et complications de la dialyse au long cours. *Laboratoire de biochimie; Service de néphrologie; Institut de formation et de recherche en dialyse* N° 23 : 201-208.

Miyata T, Sugiyama S, Saita A, Kurokawa K (2015). Reactive carbonyl compound related uremic toxicity ("carbonyl stress"). *Molecular and Cellular Nephrology, Institute of Medical Sciences and Department of Medicine* N° 59 : 25-31.

Annexes

Tableau A. Marqueurs du statut antioxydant

Marqueurs	Personnes saines	Personnes malades
Vitamine C (mg/ml)	58,00 ± 1,52	55,02 ± 2,74
Activité de la catalase (UI/ml)	14,10 ± 0,90	5,47 ± 0,18*
Activité de la superoxyde dismutase érythrocytaire (mM/min/ml)	48,88 ± 0,22	47,65 ± 0,29
Activité de la superoxyde dismutase plasmatique (mM/min/ml)	49,13 ± 0,55	56,16 ± 0,38***

Tableau B. Marqueurs du statut oxydant

Marqueurs	Personnes saines	Personnes malades
Malondialdéhyde plasmatique (µmol/l)	1,02 ± 0,05	1,60 ± 0,07
Malondialdéhyde érythrocytaire (µmol/l)	44,58 ± 1,25	41,33 ± 1,89
Anion superoxyde plasmatique (µmol/l)	3,64 ± 0,92	4,34 ± 0,17
Anion superoxyde érythrocytaire (µmol/l)	2,81 ± 0,18	4,70 ± 0,12*

Classification botanique de *Thymus fontanesii* (USDA)

Règne : Végétal

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Maliophytes

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Asterdae

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiacées/ Labiatae

Genre : *Thymus*

Espèce : *Thymus fontanesii*

Questionnaire

Nom :

Prénom :

Age :

Sexe :

Poids : Taille : IMC:

Boire l'eau : 1L 2L 3L 4-5L

Combien de fois utilisez vous les toilettes

1 fois/j 2 fois/j 3_4 fois/j

Malade avec l'insuffisance rénale :

Oui Non

Causes de l'insuffisance rénale :

Sous réserve d'une séance de Dialyse :

Prédialyse Dialyse péritonéale L'hémodialyse

Durée :

-De traitement : -De diagnostic :

Combien de fois par semaine (séance) :

1_2 séance/7j 3_4 séance/7j 5_6 séance/7j

Antécédents familiaux :

Oui Non

Stade de l'insuffisance rénale chronique :

D'autres maladies :

Anémie : Oui Non

Diabète : Oui Non

Hypertension artérielle : Oui Non

Prostatite : Oui Non

Des maladies hépatiques : Oui Non

Immunodéprimés :

Maladie de riches (gouttes) :

Tabagisme: Fumeur Non-fumeur

Ménopause :

Personnes stressés : Oui Non

Traitement de stress :

Résumé

Résumé

L'insuffisance rénale est une maladie qui touche des millions de personnes dans le monde. Bien que silencieuse et souvent asymptomatique, elle se caractérise par une perte partielle ou totale des fonctions rénales, entraînant une accumulation de déchets toxiques dans l'organisme. Le stress oxydant accru participe à la persistance d'un état inflammatoire chronique au cours de la pathologie.

L'objectif principal de notre étude est de corriger les anomalies oxydatives au niveau des lymphocytes des patients insuffisants par le biais des molécules à pouvoir antioxydant

(Vitamine C et huile essentielles de *Thymus fontaneisii*). La deuxième de l'étude vise à évaluer le statut oxydant/antioxydant (MDA, SOD, O²⁻, Catalase, vitamine C) chez des sujets insuffisants rénaux chroniques par comparaison avec des témoins sains.

Les résultats obtenus du statut oxydant/antioxydant du plasma et du lysat indiquent que les patients atteints d'IRC présentent des teneurs élevées en anion superoxyde et une augmentation de l'activité de la SOD et une diminution de l'activité de catalase par rapport aux témoins.

En ce qui concerne l'étude *in vitro*, nos résultats indiquent que l'association de 6,25 µl/ml en huile essentielle et 75 µmol/l de vitamine C augmente la prolifération des lymphocytes. D'autre part, la concentration en vitamine C qui diminue les teneurs en MDA soit pour les malades ou les témoins est égale à 100 µmol/l. A propos de l'enzyme SOD, le meilleur résultat est obtenu pour la vitamine C à une concentration égale à 50 µmol/l chez les malades et 100 µmol/l chez les témoins.

Nous pouvons dire que la supplémentation en substances bioactives pourrait corriger les anomalies oxydatives au cours de l'insuffisance rénale et ainsi améliorer l'état de santé du patient.

Mots clés :

Insuffisance rénale chronique, stress oxydant, étude *in vitro*, vitamine C, huile essentielle de *Thymus fontaneisii*.

Abstract

Kidney failure is a disease that affects millions of people around the world. Although silent and often asymptomatic, it is characterized by partial or total loss of kidney function, leading to an accumulation of toxic waste in the body. The increased oxidative stress contributes to the persistence of a chronic inflammatory state during the pathology.

The main objective of our study is to correct oxidative abnormalities in the lymphocytes of insufficient patients through molecules with antioxidant power (Vitamin C and essential oil of *Thymus fontaneisii*). The second part of the study aims to assess the oxidant/antioxidant status (MDA, SOD, O₂⁻, Catalase, vitamin C) in subjects with chronic renal failure by comparison with healthy controls.

The results obtained from the oxidant/antioxidant status of plasma and lysate indicate that patients with CKD exhibit elevated superoxide anion and increased SOD activity and decreased catalase activity compared to controls.

Regarding the *in vitro* study, our results indicate that the combination of 6.25 µl/ml of essential oil and 75 µmol/l of vitamin C increases lymphocyte proliferation. On the other hand, the vitamin C concentration which decreases the MDA levels either for patients or controls is equal to 100 µmol/l. Regarding the SOD enzyme, the best result is obtained for vitamin C at a concentration equal to 50 µmol/l in patients and 100 µmol/l in controls.

We can say that supplementation with bioactive substances could correct oxidative abnormalities during renal failure and thus improve the patient's state of health.

Key words :

Chronic renal failure, oxidative stress, *in vitro* study, vitamin C, essential oil of *Thymus fontaneisii*.

ملخص

الفشل الكلوي مرض يصيب ملايين الأشخاص حول العالم. على الرغم من أنه صامت وغالبا ما يكون بدون أعراض ، إلا أنه يتميز بفقدان جزئي أو كلي لوظائف الكلى ، مما يؤدي إلى تراكم النفايات السامة في الجسم. زيادة الإجهاد التأكسدي يساهم في استمرار حالة التهابية مزمنة أثناء علم الأمراض.

الهدف الرئيسي من دراستنا هو تصحيح التشوهات التأكسدية في الخلايا الليمفاوية للمرضى الذين يعانون من القصور الكلوي من خلال جزيئات ذات قوة مضادة للأكسدة (فيتامين س و زيت الزعتر الأساسي). يهدف الجزء الثاني من الدراسة إلى تقييم حالة الأكسدة / مضادات الأكسدة (المانوألدهيد ، سوبر أكسيد ديسميوتاز ، س2 - ، كاتالاز ، فيتامين س) عند الأشخاص الذين يعانون من الفشل الكلوي المزمن بالمقارنة مع الشواهد.

تشير النتائج التي تم الحصول عليها من حالة الأكسدة/مضادات الأكسدة للبلازما والمحللة إلى أن مرضى مرض الكلى المزمن لديهم تركيزات عالية من سوبر أكسيد ديسميوتاز وزيادة في نشاطه وانخفاض في نشاط الكاتالاز مقارنة بالشواهد.

فيما يتعلق بالدراسة المختبرية ، تشير نتائجنا إلى أن الجمع بين 6.25 μ / مل من الزيت الزعتر الأساسي و 75 μ / لتر من فيتامين سي يزيد من تكاثر الخلايا الليمفاوية. من ناحية أخرى ، فإن تركيز فيتامين (س) الذي يقلل من محتويات مدا إما للمرضى أو الضوابط يساوي 100 μ مول/لتر. فيما يتعلق بإيزيم سوبر أكسيد ديسميوتاز ، يتم الحصول على أفضل نتيجة لفيتامين (س) بتركيز يساوي 50 μ مول/لتر في المرضى و 100 μ مول/لتر في الشواهد.

يمكننا القول أن المكمل بالمواد النشطة بيولوجيا يمكن أن يصحح التشوهات التأكسدية أثناء الفشل الكلوي وبالتالي يحسن الحالة الصحية للمريض.

الكلمات المفتاحية :

الفشل الكلوي المزمن ، الإجهاد التأكسدي ، دراسة في المختبر ، فيتامين س ، زيت الزعتر الأساسي.