



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique
جامعة البليدة 1
Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologies

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique

Option

Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Thème

**Etude histopathologique et immunohistochimique de
dysfonctionnement hépatique nutri-induit sur un modèle animal
murin « *Psammomys obesus* ».**

Présenté par

Melle Bataoui Nouheida et Mr. Semmad Sidahmed.

Devant le Jury :

<i>Mme CHELGHOUM H.</i>	<i>GRADE</i>	<i>MCB</i>	<i>USDB 1</i>	<i>Président (e)</i>
<i>Mme DJAZOULI ALIM.</i>	<i>GRADE</i>	<i>Pr</i>	<i>USDB 1</i>	<i>Examineur (ice)</i>
<i>Mme BENAZOUZ F.</i>	<i>GRADE</i>	<i>MAA</i>	<i>USDB 1</i>	<i>Promotrice</i>
<i>Mme SIHALI O.</i>	<i>GRADE</i>	<i>MCA</i>	<i>USTHB</i>	<i>Co-Promotrice</i>
<i>Mme HADJI A.</i>	<i>GRADE</i>	<i>MA</i>	<i>CHU Douera</i>	<i>Co-promotrice</i>

Session 2020 / 2021

REMERCIEMENTS

Le présent travail n'est pas seulement le fruit de nos propres efforts, mais aussi la contribution de plusieurs acteurs.

On exprime nos remerciements tout d'abord à Madame CHELGHOUM H qui nous fait l'honneur de présider notre jury de mémoire fin d'études, ainsi qu'à Madame DJAZOULI ALIM pour avoir accepté d'évaluer et examiné ce travail et pour l'attention qu'elles ont su y porter.

On désire exprimer toute notre reconnaissance envers notre promotrice Mme BENAZOUZ Fella pour avoir accepté d'encadrer ce travail et dont les pertinences remarques et contributions ont été d'un apport capital. Qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde gratitude pour sa disposition et son amabilité.

On remercie vivement Mme SIHALI Ouahiba, notre co-promotrice de nous avoir accueilli au sein de laboratoire de biochimie et modalisation moléculaire, de l'université des sciences et technologies Houari Boumediene (USTHB), de son aide, soutien, sa disponibilité, gentillesse et patience tout au long de notre stage. Dont sa sympathie, sa simplicité et sa rigueur au travail fait fuir toutes les appréhensions qui pourraient habiter le novice que nous somme dans l'environnement qui est celui de la recherche.

On désire aussi remercie notre co-promotrice Mme HADJI ADILE pour ses conseils, encouragements lors des difficiles moments et de nous avoir guidée et soutenu dans la réalisation de cette étude.

On tient à remercier Mr BELARBI de nous avoir accueilli au niveau de son laboratoire d'anatomopathologie du CHU Douera, et pour nous avoir permis de réaliser ce travail de recherche.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire d'anatomopathologie de CHU Douera Mr CHETTI, Mr ELARBI, Mme FOUZIA, et bien particulièrement Mr KHEROUBI HAKIM pour leur bon accueil comme des membres de l'équipe, d'avoir transmis leurs passion, expériences et multiples connaissances des techniques de laboratoire et leurs réponses à nos questions et lacunes.

Un merci bien particulier pour tous ceux qu'ils nous ont fait des obstacles, qui nous ont dit NON et on ne peut pas le faire. C'est à cause d'eux qu'on a réussi.

DÉDICACES

Je dédie du profond de mon cœur ce mémoire :

A ma mère AFTTAHI FATIMA qui n'a pas cessé de nourrir l'ambition de me conduire au succès et de me protéger et m'encourager et de prier pour moi. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments et mon éternelle gratitude.

A mon père BATAOUI MOHAEMD pour ses conseils et son soutien moral et physique.

« Chère parents que Dieu vous préserve et vous procure santé et longue vie ».

A ma chère sœur RAWNEK et mon frère ROKENEDDINE et ainsi que mes cousines RATIL, SAFA et MARWA qui n'ont cessé de m'encourager .Je vous remercié pour vos nombreuses faveurs, soutien, et toute l'ambiance dont vous m'avez entouré.

A toutes mes chères tantes plus particulièrement FELLA et YAMINA sans oublier HAFIDHA BOUSSIADA et SAMIA CHOUMANE et ZINEB BAHAR pour leurs conseils et leur soutien moral, pour leurs incessants encouragements tout au long de mon étude, Je vous souhaite beaucoup de joies et de bonheur.

A madame SIHALI OUAHIBA qui m'a poussée et m'a encouragée et m'a conseillée et m'a aidée tout au long de ma réalisation de ce travail

A SARAH HAMADOUCHE la personne la plus proche et mon amie d'enfance en souvenir des bon moments passés ensemble, de ton soutien moral tout au long de ma vie et de mon étude merci d'être avec moi.

A FERIEL, GHANIA, ZOLA, FELLA et RAYANE et AYOUB mes aimables amis, collègues d'étude qui m'ont accompagnaient durant cette étape de ma vie et qui m'ont donné la force pour poursuivre.

A tous ceux qui m'aiment ; et ceux que j'aime.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

NOUHEIDA BATAOUI.

DÉDICACES

Je dédie ce modeste travail :

A mon père SEMMAD BELKACEM qui a fait de moi un homme pour ses prières pour moi et son soutien et encouragement.

A ma mère TIYEB F/Z pour ses conseils et son soutien moral

A mon frère SEMMAD RAFIK pour son encouragement Je te remercié pour tes nombreuses faveurs, soutien et pour d'être à mes côtés.

A mes collègues avec qui je partage joyeux et coquins souvenirs, qui m'ont accompagnaient tout au long mon étude.

A ma très chère amie et mon binôme NOUHEIDA qui m'a soutenue tout au long de mes études.

SIDAHMED SEMMAD.

RESUME

Le foie est un organe majeur dans le métabolisme, parmi les étiologies les plus fréquentes qui mènent à un dysfonctionnement hépatique, le diabète de type 2 (DT2). Cela signifie que l'hyperglycémie qui représente une conséquence majeure de l'insulinorésistance entraînant une stéatose hépatique non alcoolique, et évoluer vers la stéatohépatite, la fibrose, la cirrhose voir les carcinomes hépatocellulaires.

L'objectif de notre étude est de mettre en évidence l'effet du régime hypercalorique (RHC) sur l'induction du diabète de type 2 (DT2) chez un modèle murin « *Psammomys obesus* », suivre le développement des altérations hépatiques tissulaires, cellulaires et moléculaires dues à l'évolution du diabète, de vérifier leur susceptibilité vis-à-vis de la stéatose hépatique non alcoolique et de son évolution.

L'induction du diabète de type 2 durant 9 mois de RHC a été exploitée par des analyses biochimiques et hormonaux, études histologiques et immunohistochimiques.

Nos résultats ont montré qu'à partir des 3 premiers mois du régime hypercalorique les *Psammomys obesus*, présentaient une augmentation du poids corporel, obésité, une hyperglycémie, une hyperinsulinémie et une dyslipidémie. Aux niveaux cellulaires, nous avons observé des hépatocytes chargés de vacuoles lipidiques et une surexpression de l'E-cadhérine et une faible expression de CD3. Au 6ème mois du RHC, un infiltrat inflammatoire lobulaire et portal a été noté. Au 9ème mois du RHC, une perte d'architecture cellulaire et une installation d'une fibrose portale ont été observées. L'expression de CD3 étaient inversement corrélée à l'expression d'E-cadhérine cette corrélation pourrait traduire les complications du DT2 et prévoir la progression du dysfonctionnement hépatique vers une stéatohépatite.

Le *Psammomys obesus* apparaît comme un excellent modèle aux recherches expérimentales afin d'extrapoler sur l'homme toutes ces modifications fonctionnelles et structurales dans le but de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

Mots clés: *Psammomys obesus*, diabète de type 2, résistance à l'insuline, E-cadhérine, fibrose, stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD).

ABSTRACT

The liver is a major organ in metabolism, among the most common etiologies that lead to liver dysfunction, type 2 diabetes (T2DM). This means that hyperglycemia, which is a major consequence of insulin resistance leading to non-alcoholic fatty liver disease, and progressing to steatohepatitis, fibrosis, cirrhosis or even hepatocellular carcinomas.

The objective of our study is to highlight the effect of the high caloric diet (HD) on the induction of type 2 diabetes (T2DM) in a mouse model "*Psammomys obesus*", to follow the development of hepatic tissue, cellular and molecular alterations due to in the course of diabetes, to check their susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease and its course.

The induction of type 2 diabetes during 9 months of HD has been exploited by biochemical and hormonal analyzes, histological and immunohistochemical studies.

Our results showed that from the first 3 months of the high calorie diet *Psammomys obesus* presented increased body weight, obesity, hyperglycemia, hyperinsulinemia and dyslipidemia. At the cellular level, we observed hepatocytes loaded with lipid vacuoles and overexpression of E-cadherin and low expression of CD3. In the 6th month of RHC, an inflammatory lobular and portal infiltrate was noted. At month 9 of RHC, loss of cellular architecture and installation of portal fibrosis were observed. The expression of CD3 was inversely correlated with the expression of E-cadherin, this correlation could reflect the complications of T2DM and prevent the progression of hepatic dysfunction to stéotohepatitis.

Psammomys obesus appears to be an excellent model for experimental research to extrapolate all these functional and structural modifications to humans in order to find new therapeutic targets.

Keywords: *Psammomys obesus*, Type 2 diabetes, Insulin resistance, E-cadherin, Fibrosis, Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).

ملخص

يعد الكبد عضوًا رئيسيًا في عملية التمثيل الغذائي ، ومن بين أكثر المسببات شيوعًا التي تؤدي إلى ضعف الكبد ، ومرض السكري من النوع 2. وهذا يعني ارتفاع السكر في الدم ، وهو نتيجة رئيسية لمقاومة الأنسولين و الذي يؤدي إلى مرض الكبد الدهني غير الكحولي ، ويتطور إلى التهاب الكبد الدهني أو التليف أو تليف الكبد أو حتى سرطان الخلايا الكبدية.

الهدف من دراستنا هو تسليط الضوء على تأثير النظام الغذائي المفرط في السعرات الحرارية على تحريض مرض السكري من النوع 2 في جردان الرمل ، لمتابعة تطور الأنسجة الكبدية ، والتغيرات الخلوية والجزيئية بسبب مرض السكري ، للتحقق منها القابلية للإصابة بمرض الكبد الدهني غير الكحولي ومساره .

تم استغلال تحريض مرض السكري من النوع 2 خلال 9 أشهر من فرط السعرات الحرارية من خلال التحليلات الكيميائية الحيوية والهرمونية والدراسات النسيجية والكيميائية المناعية.

أظهرت نتائجنا أنه من الأشهر الثلاثة الأولى من اتباع نظام غذائي عالي السعرات الحرارية لوحظ عند فئران الرمال زيادة في وزن الجسم ، والسمنة وارتفاع السكر في الدم وفرط أنسولين الدم وخلل شحميات الدم. على المستوى الخلوي ، لاحظنا وجود خلايا كبدية محملة بفجوات دهنية وإفراط في التعبير عن جزيء التصاق خلايا "الكادرين" وتعبير منخفض لمجموعة التمايز 3. في الشهر السادس من فرط السعرات الحرارية، لوحظ وجود التهاب بابي كبدي. في الشهر 9 من ارتفاع السعرات الحرارية، لوحظ فقدان العمارة الخلوية وتليف بابي كبدي. ارتبطت تعبير التمايز العنقودي 3 عكسيًا بتعبير الكادرين ؛ يمكن أن يعكس هذا الارتباط مضاعفات النوع 2 من مرض السكري ويمنع التقدم من الخلل الوظيفي الكبدي إلى التهاب الكبد الدهني.

تبين أن فئران الرمل نموذج ممتاز للبحث التجريبي لاستقراء كل هذه التعديلات الوظيفية والهيكلية للإنسان من أجل إيجاد أهداف علاجية جديدة.

الكلمات المفتاحية: جردان الرمل. مقاومة الأنسولين داء السكري من النوع 2 ،الكادرين ، التليف. مرض الكبد الدهني غير الكحولي.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AG	Acide gras
ATGL	Activateur Triglycéride Lipase
AJ	Jonction Adhérente
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
CD	Cluster de différenciation
CHC	Carcinome hépatocellulaire
DT2	Diabète Type 2
EP	Espace porte
FID	Fédération Internationale du Diabète
GSK	Glycogène Synthase Kinase
Glut	Glucose transportor
HD	High caloric diet
IL-6	Interleukine 6
IL8	Interleukine 8
IL10	Interleukine 10
IS	Insulinorésistance
INSR	Insulin Receptor
IMC	Indice de Masse Corporelle
IRS	Insulin Receptor Substrate
JNK	c-Jun N-terminal kinases
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MEC	Matrice Extra Cellulaire
NAFLD	Non Alcoholic Fatty Liver Disease
NASH	Non-Alcoholic SteatoHepatitis
NF-kB	Necrosis Factor kappa B
NKT	Natural killer T cells
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PDK-1	Pyruvate dehydrogenase kinase 1
PKC	Protein Kinase C
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
RE	Réticulum endoplasmique
REG	Réticulum Endoplasmique Granuleux
RHC	Régime Hypercalorique
RI	Récepteur de l'insuline
RN	Régime Naturel
ROS	Reactive Oxygen Species
TG	Triglyceride
TNF	Tumor Necrosis Factor
VCL	Veine Centro lobulaire
VLDL	very low-density lipoprotein

LISTE DES FIGURES

Figure01 : Anatomie et vascularisation du foie.....	3
Figure02 : Structure des lobules hépatiques circulation lobulaire.....	4
Figure03 : Localisation des cellules hépatiques.....	6
Figure04 : Sort du glucose hépatique.....	7
Figure05 : Régulation du métabolisme glucido-lipidique par les conditions nutritionnelles...9	
Figure06 : Signalisation insulinique hépatique.....	10
Figure07 : Mécanisme pathophysiologique du SM.....	11
Figure08 : Pathogénèse de la stéatose hépatique.....	14
Figure09 : Complexes cadhérine-caténine et leur rôle dans la régulation des principales voies de signalisation intracellulaire.....	16
Figure10 : La voie de signalisation Hippo-Yap.....	17
Figure11 : Interaction Ecadhérin au cours de la tumorigénèse.....	18
Figure12 : Psammomys obesus.....	19
Figure13 : Plante de famille Chénopodiacee.....	20
Figure14 : Automate de circulation.....	25
Figure15 : Différentes étapes de confection des blocs.....	22
Figure16 : Différentes étapes de confection et étalement des lames.....	27
Figure17 : Appareil de coloration HE « DAKO COVER STAINER ».....	24
Figure18 : Evolution du poids corporel (g) en fonction de la durée de RHC.....	31
Figure19 : Valeurs moyennes du glucose sanguin (g/l) chez les rats de sable témoins et expérimentaux.....	32
Figure20 : Valeurs moyennes de triglycéride plasmatique chez Psammomys témoins et expérimentaux.....	33
Figure21 : Valeurs moyennes du cholestérol plasmatique chez les rats de sable témoins et expérimentaux.....	33
Figure22 : Valeurs moyennes de l'insulinémie plasmatique chez Psammomys obesus témoins et expérimentaux.....	34
Figure23 : Coupe histologique du foie de Psammomys obesus témoin coloré a Hématoxyline-éosine(HE) et Periodic Acid Shiff (PAS). Observé au microscope photonique GX100 et GX400.....	36
Figure24 : Coupe histologique du foie de Psammomys obesus coloré après 3mois a Hématoxyline-éosine(HE). Observé au microscope photonique GX100 et GX400.....	38
Figure25 : Coupe histologique du foie de Psammomys obesus coloré arés 6mois a Hématoxyline-éosine(HE) et Trichrome de Masson (TM). Observé au microscope photonique GX100 et GX400.....	40
Figure26 : Coupe histologique du foie de Psammomys obesus après 9mois de RHC coloré a Hématoxyline-éosine(HE) et à Trichrome de Masson. Observé au microscope photonique GX100 (A) et GX400 (B,C,D).....	42
Figure27 : Coupe immunohistologique du foie de Psammomys obesus témoin marquée par l'anticorps monoclonal CD3. . Observé au microscope photonique GX100 (A, B).....	44
Figure28 : Coupe immunohistologique du foie de Psammomys obesus témoin marquée par l'anticorps monoclonal CD3. . Observé au microscope photonique GX100 (A) et GX400 (B).....	44
Figure29 : Coupe immunohistologique du foie de Psammomys obesus après 6mois de RHC marquée par l'anticorps monoclonal CD3. . Observé au microscope photonique GX100 (A) et GX400 (B).....	46
Figure30 : Coupe immunohistologique du foie de Psammomys obesus après de 9mois de RHC marquée par l'anticorps monoclonal CD3. Observé au microscope photonique GX100 (B) GX400 (A).....	46

Figure31 : Coupe immunohistologique du foie de Psammomys obesus témoin marquée par l'anticorps monoclonal E cadhérine. Observé au microscope photonique GX100 (A) et GX400 (B).....	48
Figure32 : Coupe immunohistologique du foie de Psammomys obesus après 3mois de RHC marquée par l'anticorps monoclonal E cadhérine. Observé au microscope photonique GX100 (A) et GX400 (B).....	48
Figure33 : Coupe immunohistologique du foie de Psammomys obesus après 6mois de RHC marquée par l'anticorps monoclonal E cadhérine. Observé au microscope photonique GX100 (A) et GX400 (B).....	50
Figure34 : Coupe immunohistologique du foie de Psammomys obesus après 9mois de RHC marquée par l'anticorps monoclonal E cadhérine. Observé au microscope photonique GX100 (A, B).....	50
Figure01 : Méthode de marquage à la streptavidine-biotine (LSAB)(VECTOR LABORATORIES).....	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Matériel utilisé.....	64
Tableau II: Définition du Syndrome Métabolique.....	65
Tableau III: Composition centésimale des régimes alimentaires naturels et hypercaloriques.....	65
Tableau IV : Valeurs moyennes du poids corporel (g) chez Psammomys obesus témoins et rendus diabétiques par un régime hypercalorique.....	66
Tableau V: Valeurs moyennes du glucose sanguin (g/l) chez les rats des sable témoins.....	66
Tableau VI : Valeurs moyennes des triglycérides chez les rats des sable témoins et expérimentaux.....	67
Tableau VII : Valeurs moyennes du cholestérol total plasmatique chez Psamommys témoins et expérimentaux.....	67
Tableau VIII : Valeurs moyennes de l'insulinémie plasmatique chez Psammomys obesus témoins et expérimentaux.....	68

SOMMAIRE

Introduction	01
Chapitre I : Rappels bibliographiques	03
I.1 Structure et physiologie du foie	03
I.1.1 Anatomie et vascularisation du foie	03
I.1.2 Cytologie du foie	05
I.1.3 Physiologie du foie	06
I.1.3.1 Métabolisme glucidique	07
I.1.3.1.1 Absorption du glucose	07
I.1.3.1.2 Gluconéogenèse et le flux glycolytique	08
I.1.3.1.3 Synthèse et dégradation du glycogène	08
I.1.3.1.4 Libération de glucose	08
I.1.3.2 Métabolisme lipidique	08
I.1.3.3 Signalisation hépatique de l'insuline	09
I.2 Syndrome métabolique et obésité	10
I.2.1 Syndrome métabolique	11
I.2.1.1 Définition	11
I.2.1.2 Pathophysiologie du Syndrome Métabolique	11
I.2.1.2.1 Insulino résistance	12
I.2.1.2.2 Inflammation	12
I.2.2 Obésité	12
I.2.3 Diabète de type 2	12
I.3 Pathologies associées au syndrome métabolique : maladie hépatique non alcoolique (NAFLD)	13
I.3.1 Définition	13
I.3.2 Pathogénèse de NAFLD	13
I.3.3 Stéatohépatite non alcoolique	14
I.3.4 Fibrose	14
I.3.5 Cirrhose	14
I.4 E –cadhérine molécule de jonction adhérente	15
I.4.1 Structure et fonction	16
I.4.2 Organisation structurale et association avec le cytosquelette d'actine	18
I.4.3 E-cadhérine et inhibition du contact	18
I.4.4 E-cadhérine et la tumorigenèse	18
Chapitre II : Matériel et méthodes	19
II.1 Matériel	19
II.1.1 Matériel biologique	19
II.1.1.1 Modèle expérimental et son biotope: <i>Psammomys obesus</i>	19
II.1.1.2 Anticorps	20
II.1.2 Matériel non biologique	20
II.1.2.1 Protocole expérimental	20
II.1.2.1.1 Elevage des animaux	20
II.1.2.1.2 Répartition des lots et régime alimentaire	20

II.1.2.1.3	Techniques opératoires	21
II.1.2.1.4	Techniques analytiques	21
II.2	Méthodes d'études	22
II.2.1	Techniques histologiques	23
II.2.1.1	Fixation	23
II.2.1.2	Circulation	23
II.2.1.3	Inclusion et confection du bloc de paraffine	24
II.2.1.4	Confection et étalement des coupes	25
II.2.1.5	Coloration	26
II.2.1.5.1	Déparaffinage	27
II.2.1.5.2	Hydratation	27
II.2.1.5.3	Coloration topographique et histochimique	27
II.2.1.5.3.1	L'Hémalinéosine (HE)	27
II.2.1.5.3.2	Periodic Acid Schiff	27
II.2.1.5.3.3	Trichrome de Masson	28
II.2.1.5.4	Montage des coupes	28
II.2.1.5.5	Observation des coupes et acquisition des images	28
II.3	Technique d'immunohistochimie	28
II.3.1	La technique	29
II.3.2	Les étapes	30
Chapitre III : Résultats et discussion		31
III.1	Résultats	31
III.1.1	Poids corporel	31
III.1.2	Résultats des paramètres biochimiques	32
III.1.2.1	Dosage de la glycémie	32
III.1.2.2	Dosage des lipides plasmatiques : triglycérides et cholestérol total	33
III.1.2.3	Dosage de l'insuline plasmatique	34
III.2	Résultats histologiques	35
III.2	Discussion	51
Conclusion et perspectives		56
Références bibliographiques		57
Annexe		64

Introduction

INTRODUCTION

Le diabète de type 2 (DT2) représente actuellement un problème de santé publique selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2021) 1,5 million de décès ont été directement provoqués par le diabète en 2019, tandis que 2,2 millions de décès étaient attribuables à l'hyperglycémie en 2012. Selon la Fédération Internationale du Diabète (FID, 2018), l'épidémie mondiale du diabète a explosé pour toucher en 2017, 425 millions de personnes, soit 8,8 % de la population adulte. Plus de 90% d'entre eux avaient le diabète de type 2.

Le diabète de type 2 est une maladie multifactorielle caractérisée par une réduction progressive de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose. Cette déficience relative de la sécrétion d'insuline est une condition fondamentale pour la progression de l'insulinorésistance asymptomatique au pré diabète et, plus tard, au diabète de type 2. Cependant, l'interaction avec un mode de vie sédentaire, un bilan calorique positif chronique ou l'obésité, est souvent nécessaire pour la progression de la maladie. Le développement de la résistance à l'insuline a lieu dans plusieurs organes, notamment les muscles squelettiques, le foie, le cœur et les tissus adipeux (Grenier-Larouche et al., 2017).

Le diabète induit des modifications métaboliques qui contribuent à l'apparition des altérations fonctionnelles et structurales hépatiques, bien que de nombreux travaux ont trouvé que chez les patients atteints de diabète type 2, il y avait une prévalence élevée d'une stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD); qui est actuellement considéré comme une complication méconnue du diabète type 2 (Bril et Cus, 2016).

La stéatose hépatique non-alcoolique du foie (NAFLD) peut se développer à une maladie plus agressive, la stéatohépatite non-alcoolique (NASH) caractérisée par une inflammation pouvant mener à une fibrose progressive et à la cirrhose (Lanthier, 2020).

Il n'est pas encore clair si l'une de ces conditions provoque l'autre (Diabète type 2 ↔ NAFLD), ou si les deux sont les conséquences d'un autre processus. Afin d'étudier le développement de ces complications hépatiques, un recours à des modèles expérimentaux est nécessaire.

Dans ce contexte, nous nous sommes posé la problématique suivante:

-Psammomys obesus, représente-il un modèle bien établi du diabète de type 2 et d'obésité; partage-t-il les mêmes caractéristiques du syndrome métabolique humaine, et les complications hépatiques associées?

-L'hyperglycémie chronique, contribue-t-elle à l'apparition des complications hépatiques?

-Existe-il une corrélation entre ces altérations hépatiques et l'expression de CD3 (lymphocytes T), E cadhérine (adhésion cellule-cellule)?

Dans le but de répondre à nos questions, nous avons tracé les objectifs suivants: l'induction d'un diabète type 2 chez les rats de sable *Psammomys obesus*, par régime hypercalorique; mettre en évidence le dysfonctionnement métabolique par le dosage des paramètres biochimiques aux cours de l'évolution et l'ancienneté du diabète type2; définir par une étude histologique les degrés d'altérations du parenchyme hépatique; voir les différents degrés de la gravité de l'atteinte hépatique; le marquage de certains molécules liés à la réaction inflammatoire et d'adhésion cellulaire .Pour contribuer à la compréhension des mécanismes moléculaires du diabète type 2 et les complications hépatiques qui y sont lui associées.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I.1 Structure et physiologie du foie

I.1.1 Anatomie et vascularisation du foie

Le foie est l'organe le plus volumineux représentant environ 2% à 3% de poids du corps situé dans l'hypochondre droit et s'étend vers l'hypochondre gauche et protégé par la cage thoracique et enveloppé d'une capsule conjonctive dite la capsule de Glisson (Abdelmisih, 2010).

De point de vue anatomique, le foie est constitué d'une multitude d'unités structurales et fonctionnelles appelées lobules hépatiques. Ces dernières sont de forme hexagonales et traversés en leur centre par la veine centro-lobulaire et ils sont délimités par une ramification de l'artère hépatique, de la voie biliaire et de la veine porte (LeCluyse et al., 2012)(Fig.01).

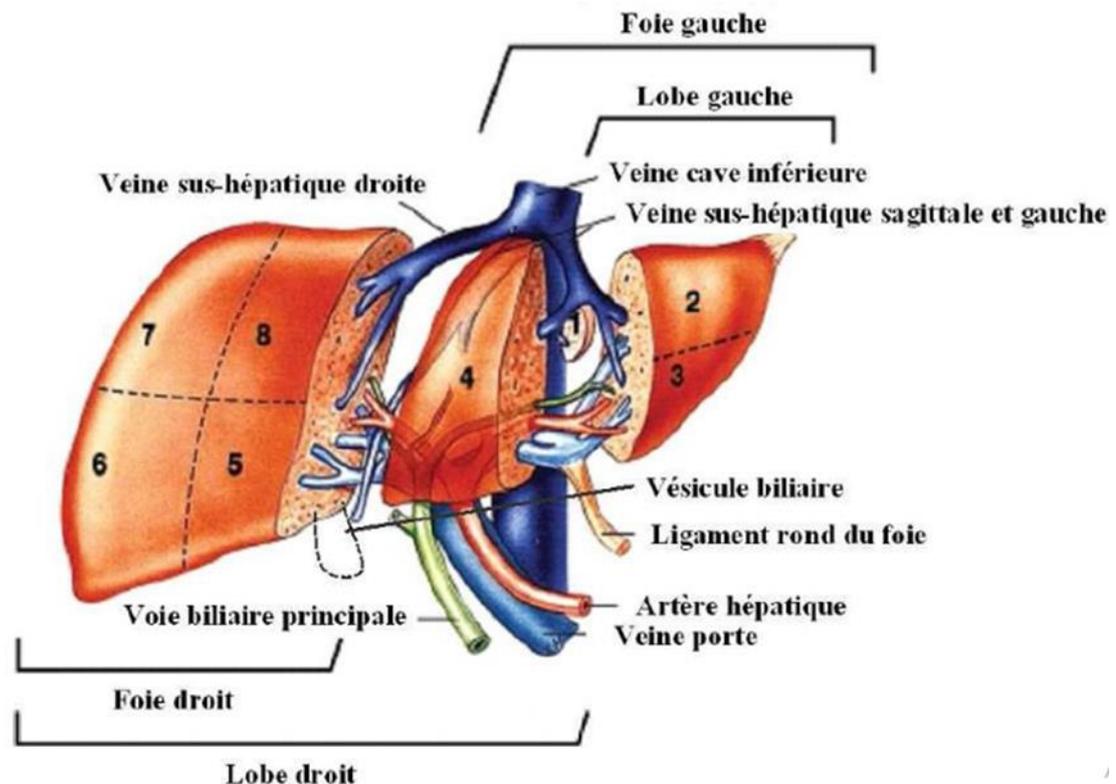


Figure 01 : Anatomie et vascularisation du foie (Walter et al., 2008).

Le lobule hépatique est le siège d'un drainage de bile incessant dans le sens contraire de la circulation sanguine. Le foie reçoit 25% du flux sanguin au repos. Il est perfusé à la fois par le système veineux qui atteint le foie par la veine porte qui véhicule la sang du tube digestif et de la rate au foie dont l'apport en sang veineux contribue pour 75% du flux sanguin hépatique total et aussi par le système artériel via l'artère hépatique qui fournit l'oxygène nécessaire aux multiples activités hépatiques (Bohlen, 2003 ; Sherlock et Dooley, 1997) (Fig. 02).

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Les hépatocytes ont deux pôles fonctionnels : le pôle biliaire au niveau duquel est excrétée la bile et le pôle vasculaire au niveau de l'espace de Disse, siège du transport bilatéral des substances entre les hépatocytes et le sang. Les deux pôles fonctionnels sont pourvus de nombreuses microvillosités augmentant la surface d'échanges (**Sherlock et Dooley, 1997**)

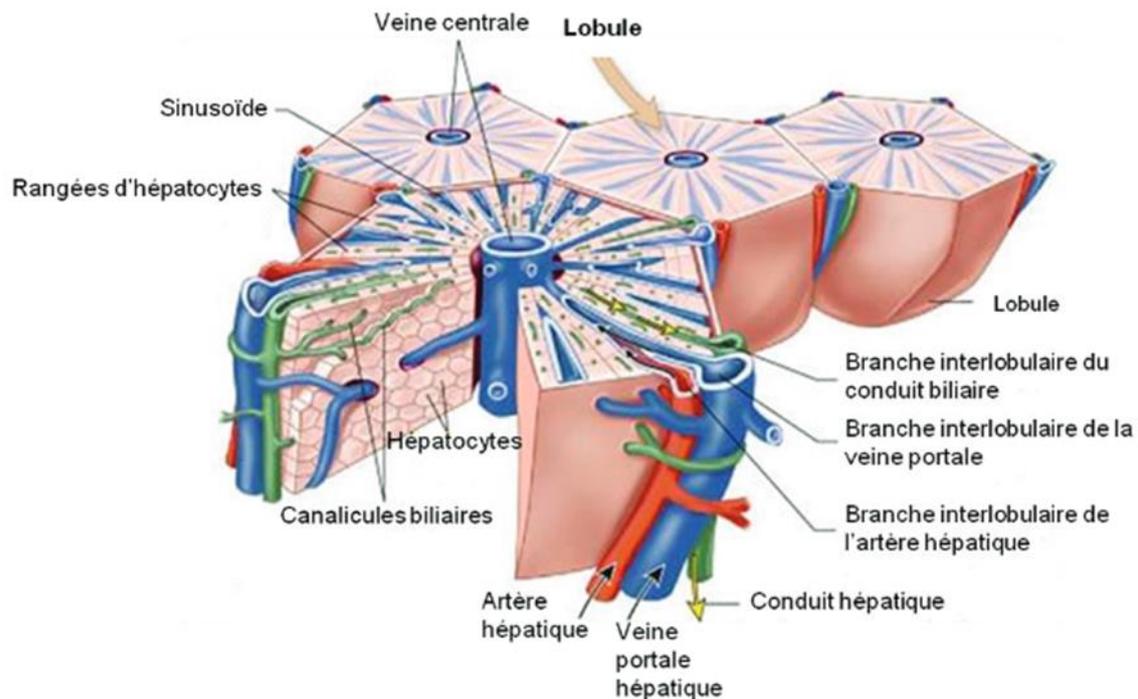


Figure 02 : Structure des lobules hépatiques et circulation lobulaire (Patton et al., 2014).

Les lobules hépatiques sont constitués en grande majorité (60%) par les hépatocytes, devant les cholangiocytes qui constituent les canaux biliaires, les cellules endothéliales sinusoidales, les cellules stellaires (réserve et réparation), les cellules de Kupffer (macrophages) et enfin les cellules à granulation (lymphocytes) (**LeCluyse et al., 2012**).

Ils comportent:

-les travées de Remak qui sont des travées cellulaires d'hépatocytes, elles sont rayonnantes à partir du centre du lobule occupé par une veine, la veine centrolobulaire.

-Les capillaires radiés ou capillaires sinusoides sont de gros capillaires ayant la même orientation que les travées de Remak (**Desmet, 1994**).

I.1.2 Cytologie du foie

Le foie est caractérisé par une hétérogénéité cellulaire, en effet, il est constitué par des cellules parenchymateuses, des hépatocytes et des cellules mésenchymateuses (**Fig. 03**).

I.1.2.1 Hépatocytes

Les hépatocytes sont des cellules polyédriques de 20µm de long sur 30µm de large environ, représentant 80% de la population cellulaire du foie humain. Elles sont pourvues de plusieurs faces. Elles comportent un noyau rond ou ovalaire central mais 15 à 20% des cellules sont binucléées. Chaque noyau contient un ou plusieurs nucléoles et une fine chromatine, les mitoses sont très rares: 1 pour 10 000 hépatocytes. La durée de vie moyenne minimale d'un hépatocyte est de l'ordre de 150 jours. Le cytoplasme hépatocytaire contient de très nombreuses mitochondries, de réticulum endoplasmique granuleux (REG) et le réticulum endoplasmique lisse (REL), l'appareil de Golgi, des lysosomes et d'abondants grains de glycogène (**Goldblatt et Gunning, 1984**) (**fig.03**).

I.1.2.2 Cellules sinusoidales

Les cellules endothéliales sinusoidales occupent 6% du tissu hépatique et forment les sinusoides. C'est à ce niveau que le sang artériel et portal se mélange, fournissant l'oxygène et les nutriments aux différentes cellules constituant le foie (**Bohlen, 2003 ; Couvald et al., 1993**) (**fig.03**).

I.1.2.3 Cellules de Kupffer

Ce sont des macrophages résidant dans le foie, plus exactement localisée au niveau de la lumière sinusoidale, au contact des cellules endothéliales (**Dixon et al., 2013**) (**fig.03**).

I.1.2.4 Cellules étoilées ou stellaires

Egalement appelées cellules de Ito situées dans l'espace de Disse sous la barrière endothéliale (**Friedman, 2008 ; Blaner et al., 2009**) (**fig.03**).

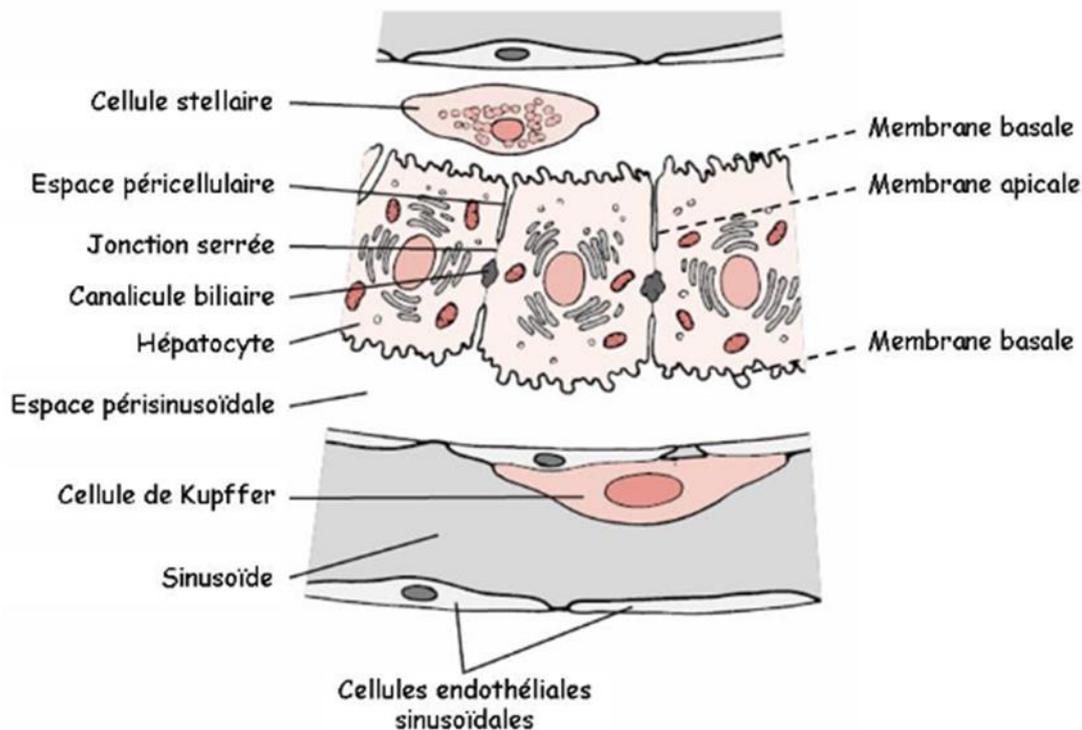


Figure 03 : Localisation des cellules hépatiques (Tso et McGill, 2003).

I.1.3 Physiologie du foie

Le foie joue plusieurs rôles y compris la détoxification des médicaments et des toxiques, ainsi que la synthèse et sécrétion de la bile sont l'une des principales fonctions du foie (Young et al.; 2017) ainsi que la protection contre les antigènes de l'intestin ainsi, faibles taux d'endotoxines bactériennes par l'intervention des cellules de Kupffer. (Ju et Tacke, 2016). Le rôle majeur du foie est de maintenir l'homéostasie énergétique glucido-lipidique par sa capacité de métaboliser le glucose et les acides gras. Lors de l'alimentation, le foie passe par deux états : à l'état de nourrit, il capte et stocke le glucose sous forme de glycogène via la glycogénogenèse ou sous forme de triglycérides via la lipogenèse et l'estérification. Les acides gras qui proviennent de l'alimentation sont transportés jusqu'au foie par les chylomicrons, ils sont estérifiés et stockés dans les gouttelettes lipidiques.

À l'état du jeûne, le foie produit du glucose pour maintenir une glycémie comprise entre 0,70 g/l à 1,10 g/l, soit par l'utilisation de ses réserves de glycogène, soit par la production de novo de glucose (néoglucogénèse). De plus, les acides gras provenant de l'hydrolyse des triglycérides hépatiques ou ceux libérés par la lipolyse du tissu adipeux et captés par le foie sont utilisés, d'une part, pour fournir des corps cétoniques aux organes gluco-dépendants via la bêta-oxydation, et d'autre part, pour la synthèse des VLDL qui transportent les triglycérides dans le sang (Foufelle et al., 2005 ; Trefts et al., 2017).

I.1.3.1.2 Gluconéogenèse et flux glycolytique

Les composés de carbone-3, tels que le pyruvate et le lactate, peuvent subir une oxydation supplémentaire dans le cycle de l'acide tricarboxylique ou servir comme substrats pour la synthèse de novo du glucose, c'est-à-dire du glucose-6-phosphoneogenèse, et du glycogène, donc c'est la voie indirecte ou gluconéogénique de la synthèse du glycogène (**Roden et Bernroider, 2003**).

I.1.3.1.3 Synthèse et dégradation du glycogène

La dégradation du glycogène, c'est-à-dire la glycogénolyse, nécessite l'action concertée du glycogène phosphorylase et de l'enzyme de déramification bifonctionnelle pour libérer le glucose-1-phosphate, qui est en équilibre avec le glucose-6-phosphate (Fig. 04). La synthèse du glycogène et la glycogénolyse peuvent être simultanément actives, ce qui entraîne un cycle de glycogène considéré comme négligeable uniquement à jeun (**Roden et Bernroider, 2003**).

I.1.3.1.4 Libération de glucose

La glucose-6-phosphatase est une enzyme exprimée seulement par les reins et le foie qui catalyse la déphosphorylation du glucose-6-phosphate et représente l'étape ultime avant la libération de glucose libre dans les veines hépatiques, la glucose-6-phosphoneogenèse dans ces tissus peut entraîner la libération de glucose par ces tissus. (**Roden et Bernroider, 2003**).

I.1.3.2 Métabolisme lipidique

Le foie est essentiel à l'absorption digestive et effectue l'absorption, la synthèse, le conditionnement et la sécrétion des lipides et des lipoprotéines. Lorsque les glucides sont abondants, le foie utilise non seulement le glucose comme principal carburant métabolique, mais convertit également le glucose en acides gras (novo lipogenèse). Les hépatocytes obtiennent également des acides gras de la circulation sanguine avec du cholestérol pour produire des esters de cholestérol. Après un repas, les acides gras sont resynthétisés en TAG et sécrétés dans le système lymphatique intestinal sous forme de chylomicrons dont ils sont ensuite extraits des restes de chylomicrons par la lipoprotéine lipase au niveau du foie. Ces acides gras sont ensuite transportés dans les hépatocytes via un certain nombre de protéines de transport (par exemple les protéines de transport des acides gras 2, 4 et 5 et CD36) (**Rui, 2014 ; Trefts et al., 2017**).

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

À jeun, le foie est capable d'utiliser les acides gras comme source d'énergie interne par le biais de voies oxydatives (beta oxydation), mais peut également fournir de l'énergie à d'autres organes à partir des produits cétoènes substrat énergétique lors d'un jeûne extrême ou consommant des niveaux extrêmement faibles de glucides alimentaires.

La libération de cétones par le foie empêche la formation excessive d'intermédiaires du cycle de l'acide tricarboxylique et pourrait ainsi protéger le statut oxydatif. Pendant les périodes d'alimentation, le foie est capable de fournir des substrats lipidiques pour le corps (Rui, 2014). De plus, de sa fonction vis-à-vis des molécules de graisse classiques, le foie est également essentiel pour l'homéostasie du cholestérol dans le corps. Le cholestérol peut être absorbé par l'intestin ou synthétisé de novo dans le foie. Le cholestérol est une molécule requise pour le maintien de la fluidité et l'assemblage des membranes cellulaires (Trefts et al., 2017).

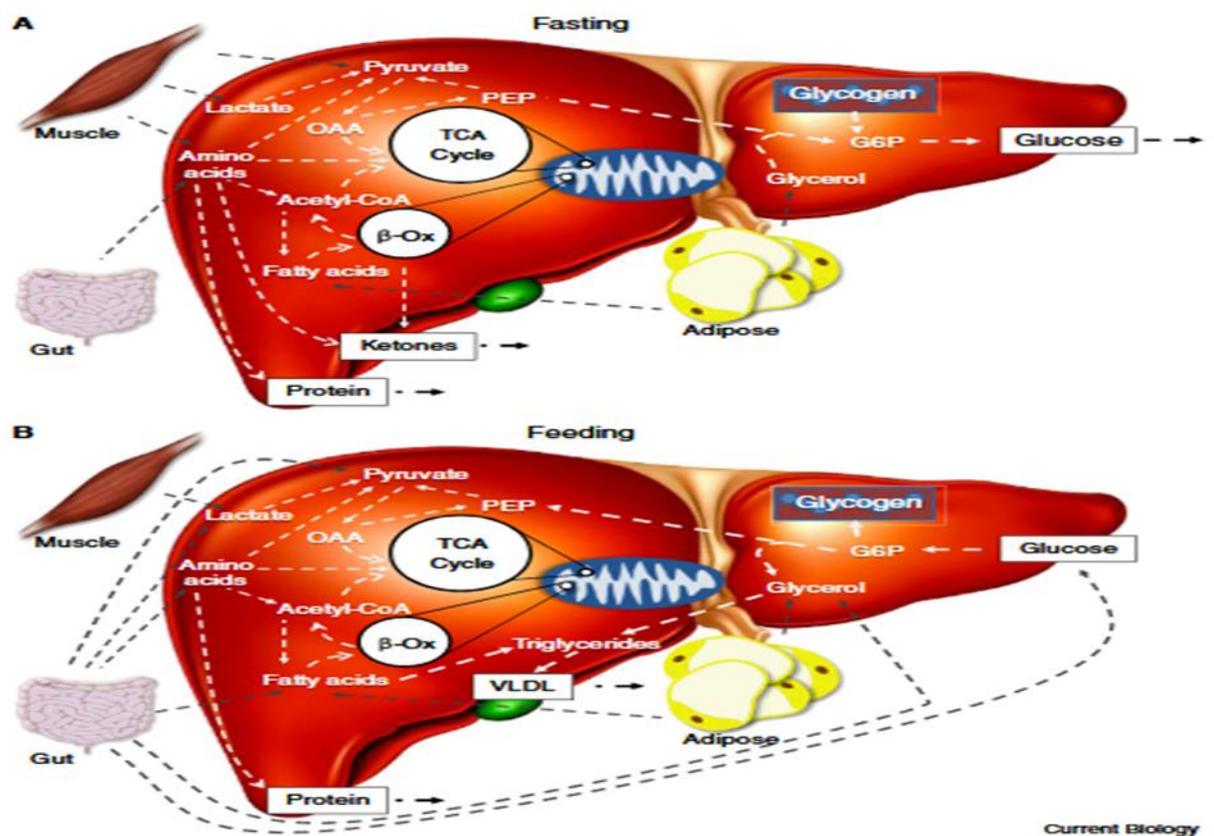


Figure 05 : Régulation du métabolisme glucido-lipidique par les conditions Nutritionnelles (Trefts et al., 2017).

I.1.3.3 Signalisation hépatique de l'insuline

L'insuline joue un rôle majeur dans le métabolisme énergétique qu'il soit glucidique ou lipidique, entrée de glucose, synthèse de glycogène et lipogénèse, inhibition de la glycogénolyse, de la néoglucogénèse et de la lipolyse, ces effets résultent d'une cascade de transmission du signal qui commence par la fixation de cette hormone sur son récepteur cytoplasmique INSR (insulin receptor). Les deux voies principales d'activation sont celles de

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

l'AKT (ou PKB Protein Kinase B) qui est impliquée en priorité dans les effets métaboliques, et la voie des MAP (Mitogen Activated Protein)-kinases, impliquée en priorité dans les effets nucléaires, la croissance et la différenciation (Capeau, 2003 ; Pertersen et Shulman, 2018 ; Capeau, 2003)(Fig. 06).

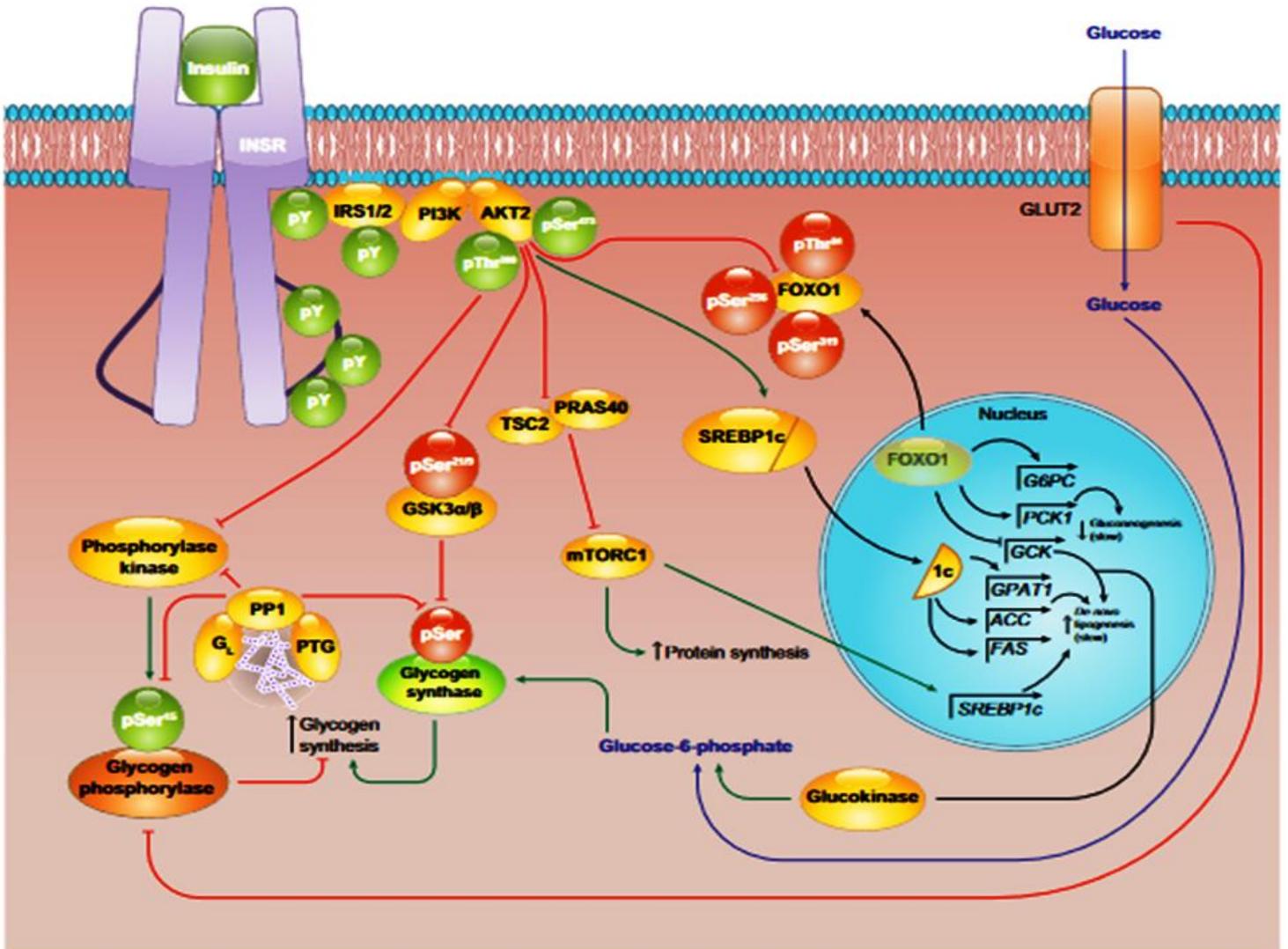


Figure 06 : Signalisation insulínique hépatique (Pertersen et Shulman, 2018).

Les cercles verts et les flèches représentent les événements d'activation; les cercles rouges et les flèches représentent les événements inhibiteurs. IRS, substrat du récepteur de l'insuline; GSK3, glycogène synthase kinase 3; PI3K, phosphoinositide-3-kinase; PP1, protéinphosphatase 1; GPAT, glycérol-3-phosphate acyltransférase; G6PC, glucose-6-phosphatase; PCK1, phosphoénol-pyruvate carboxykinase; SREBP1csterolregulatoryelementbindingprotein 1c;FAS, synthase d'acide gras.

I.2 Syndrome métabolique et obésité

La première définition internationalement reconnue du syndrome métabolique(SM), également appelé «syndrome de résistance à l'insuline», «syndrome X» a été créée par le groupe de consultation sur le diabète de l'Organisation mondiale de la santé en 1998. Ils ont

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

défini le SM comme la présence d'une résistance à l'insuline (hypoglycémie à jeun, tolérance au glucose altérée ou diabète de type 2) de plus, des facteurs de risque suivants: obésité (rapport taille-hanches ou indice de masse corporelle), hyperlipidémie (hypertriglycéridémie, cholestérol à lipoprotéines de basse haute densité [HDL]) et hypertension ou micro albuminurie (Rochlani et al., 2017).

I.2.1 Syndrome métabolique

I.2.1.1 Définition

Le syndrome métabolique a fait l'objet de nombreuses définitions depuis sa description originale. Il fait intervenir des facteurs comme : l'obésité viscérale, l'hyperglycémie, l'hypertriglycéridémie, le faible taux d'HDL-cholestérol et l'hypertension artérielle (Alberti et al., 2009 ; Han et Lean, 2015) (Tab. I. Annexe 1).

I.2.1.2 Pathophysiologie du Syndrome Métabolique

Les mécanismes pathophysiologiques du SM sont complexes. L'adiposité viscérale s'est avérée être un déclencheur principal pour la plupart des voies impliquées dans le SM, soulignant ainsi l'importance d'un apport calorique élevé en tant que facteur causal majeur. De tous les mécanismes proposés, la résistance à l'insuline, l'activation neurohormonale et l'inflammation chronique semblent être les principaux acteurs de l'initiation, de la progression et de la transition du SM (Rochlani et al., 2017) (Fig.07).

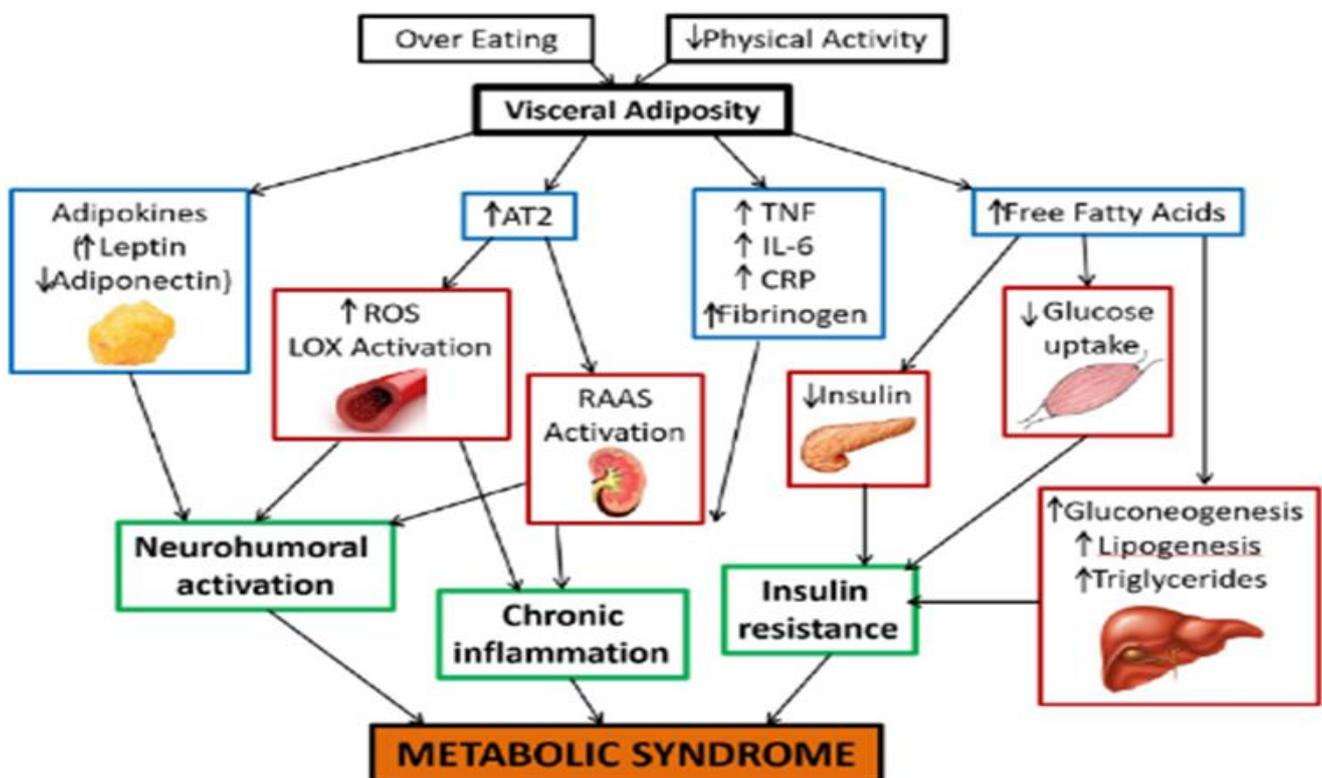


Figure 07 : Mécanismes pathophysiologiques du SM (Rochlani et al., 2017).

I.2.1.2.1 Insulino résistance

L'insuline augmente l'absorption du glucose dans les muscles et le foie et inhibe la lipolyse et la gluconéogenèse hépatique. La résistance à l'insuline induit l'augmentation des AG libres qui sont principalement dérivés des réserves de triglycérides dans le tissu adipeux, libérées par l'action de l'AMP cyclique lors de la lipolyse. Ce processus est inhibé par l'insuline via un mécanisme proposé de réduction de l'activité de l'AMPc. Dans le contexte de la résistance à l'insuline, où les effets de l'insuline sont réduits, le taux de lipolyse augmentera, entraînant une augmentation de la production d'acides gras. Cela potentialisera le cycle négatif d'inhibition des propriétés antilipolytiques de l'insuline, conduisant à une lipolyse supplémentaire.

Les AG libres inhibent l'activation de protéine kinase dans le muscle entraînant une réduction de l'absorption du glucose. Ils sont également lipotoxiques pour la cellule bêta du pancréas, entraînant une diminution de la sécrétion d'insuline. La résistance à l'insuline contribue également au développement de l'hypertension en raison de la perte de l'effet vasodilatateur de l'insuline et de la vasoconstriction causée par les AG libres d'autre part elle entraîne également une augmentation de la viscosité sérique, l'induction d'un état pro thrombotique et la libération de cytokines pro-inflammatoires à partir du tissu adipeux qui contribuent à un risque accru de maladies cardiovasculaires (**Rochlani et al., 2017 ; McCracken et al., 2018**).

I.2.1.2.2 Inflammation

L'inflammation est une réaction du système immunitaire à une agression externe ou interne déclenchée par des médiateurs chimique et caractérisée par l'infiltration leucocytaire. L'obésité et la résistance à l'insuline conduisent à une activation accrue des cascades de signalisation en aval qui provoquent la fibrose tissulaire. Les macrophages envahissent l'excès de tissu adipeux, entraînant la libération de cytokines (**Grundy, 2016 ; McCracken et al., 2018 ; Pertersen et Shulman, 2018**).

I.2.2 Obésité

Elle se définit comme une accumulation anormale ou excessive de graisse **corporelle** (**OMS, 2004**). L'indice de masse corporelle (IMC) est l'indice le plus utilisé pour évaluer la corpulence d'un individu, Il correspond au poids en kilogrammes divisé par le carré de la taille exprimée en mètre carré (kg/m²). Un indice supérieur à 30 étant considéré comme un signe d'obésité chez l'adulte. Pour un indice situé entre 25 et 29,9, on parle de surpoids (**OMS, 2006**).

I.2.3 Diabète de type 2

Le diabète de type 2 est un état pathologique caractérisé par une hyperglycémie chronique ainsi que diverses comorbidités, telles que les maladies cardiovasculaires, l'obésité,

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

la micro angiopathie et l'insuffisance rénale dont la pathogénèse et l'étiologie sont très complexes, résultant d'interactions entre facteurs génétiques et facteurs environnementaux (OMS, 2006).

L'hyperglycémie diabétique est causée par une diminution de la sensibilité à l'insuline, entraînant une production excessive d'insuline, et les thérapies actuelles augmentent la sensibilité à l'insuline ou introduisent de l'insuline exogène. Malheureusement, ces traitements ne peuvent actuellement pas assurer un contrôle glycémique à long terme ou inverser les progrès (Huang *et al.*, 2018).

I.3 Pathologies associées au syndrome métabolique : maladie hépatique non alcoolique (NAFLD)

I.3.1 Définition

La stéatose hépatique non alcoolique ou NAFLD (No Alcoholic Fatty Liver Disease) est une manifestation hépatique du syndrome métabolique et un facteur de risque de diabète de type 2, de dyslipidémie et d'hypertension (Manne *et al.*, 2018).

Le terme NAFLD rassemble un large éventail de résultats histologiques, allant de la simple accumulation intra-hépatocytaire d'acides gras libres qui peut être associée à différents degrés d'inflammation appelée stéatohépatite non alcoolique [NASH], jusqu'à nécrose et fibrose, cirrhose. Comme d'autres causes de maladie hépatique chronique, la NAFLD augmente le risque de carcinome hépatocellulaire (CHC). La théorie la plus récente du « distinct hit » décrit la stéatose hépatique pure et la NASH comme deux affections distinctes avec l'obésité viscérale et la résistance à l'insuline comme causes sous-jacentes (Ministrini *et al.*, 2020).

L'accumulation de triglycérides (TG) dans le cytoplasme des hépatocytes, qui résulte d'un déséquilibre entre l'acquisition des lipides (l'absorption des AG et la lipogenèse de novo) et leur élimination. La stéatose peut induire une inflammation entraînant une stéatohépatite non alcoolique (NASH) qui peut évoluer vers une fibrose avancée, cirrhose ou un carcinome hépatocellulaire (Manne *et al.*, 2018 ; Kořínková *et al.*, 2020).

I.3.2 Pathogénèse de NAFLD

Plusieurs mécanismes complexes interviennent dans la pathogénèse de la NAFLD et induisent la stéatose, une augmentation de l'apport en graisses en raison d'un régime riche en graisses ou d'un excès de lipolyse dans les tissus adipeux, qui augmentent le niveau d'acides gras libres ; d'une augmentation de la lipogenèse de novo dans le foie, d'une altération de l'oxydation hépatique des acides gras et / ou d'une altération de la synthèse ou de la sécrétion des lipoprotéines de très basse densité (VLDL) et une augmentation de la lipogenèse de novo (production des TG) (Mezale *et al.*, 2017) (Fig. 08).

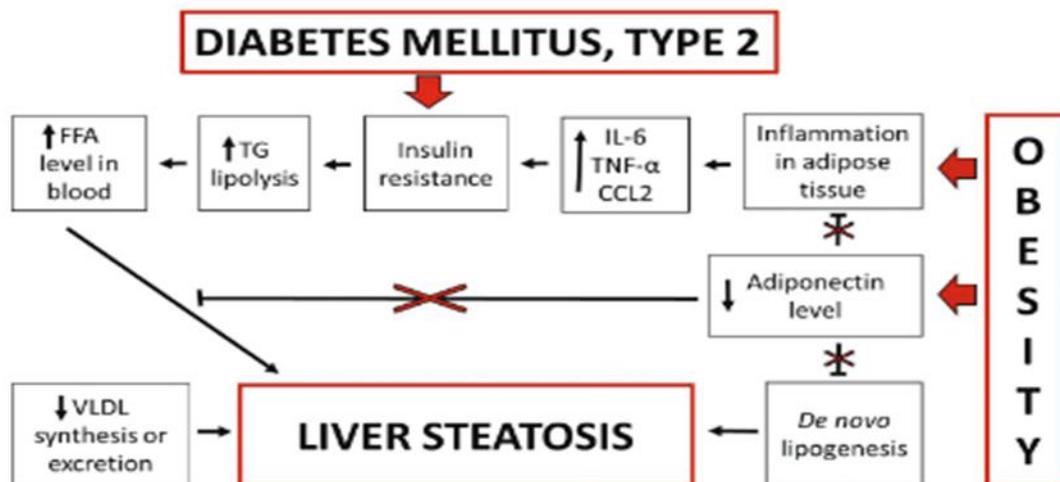


Figure 08 : Pathogénèse de la stéatose hépatique (Mezale et *al.*, 2017).

Abréviations: FFA, free fatty acids; TG, triglycerides; IL, interleukin; TNF, tumour necrosis factor; CCL2, CC motif chemokine ligand 2; VLDL, very low density lipoproteins

I.3.3 Stéatohépatite non alcoolique (NASH)

La NASH, la forme la plus sévère de la maladie, est caractérisée par une stéatose, une inflammation hépatique et un ballonnement hépatocellulaire et peut inclure divers degrés de fibrose (Manne et *al.*, 2018).

I.3.4 Fibrose

Lors d'une lésion hépatique chronique il y aura la génération d'une inflammation chronique entraînant une réponse anormale de cicatrisation, dont L'architecture du foie est perturbée par la présence d'une cicatrice fibreuse. La source de collagène dans des conditions pathologiques est les cellules étoilées. Dans ces conditions, afin de former une matrice extracellulaire, les cellules étoilées hépatiques sont activées et transformées en un phénotype de type myofibroblaste (Lo et Kim, 2017 ; Aydin et Akcali, 2018). La fibrose hépatique est un processus réversible mais pas lorsqu'elle est dans un stade avancé (Aydin et Akcali, 2018).

I.3.5 Cirrhose

La cirrhose hépatique est un trouble hépatique terminal caractérisé par un remplacement progressif de l'architecture hépatique fonctionnelle par du tissu fibrotique non fonctionnel (McCormick et Jalan, 2018).

L'accumulation locale de tissu fibreux, isole les lobules hépatiques normaux, cela empêche le contact et les échanges métaboliques entre les hépatocytes et les sinusoides sanguins, perturbant l'architecture normale du foie, qui est progressivement remplacé par des nodules anormaux entourés de tissu fibreux conduisant à une perte de fonction hépatique progressive (Martinez-Esparza, 2015).

I.4. E-cadhérine molécule de jonction adhérente:

Les jonctions cellule-cellule sont importantes pour maintenir la polarité et l'intégrité des cellules et des tissus. En général, les animaux vertébrés possèdent trois systèmes de jonction intercellulaire : les jonctions lacunaires, qui servent de canaux intercellulaires qui permettent le transfert direct cellule-cellule d'ions et de petites molécules ; jonctions serrées, déterminant cellulaire primaire de la fonction de barrière épithéliale ; jonctions d'ancrage, qui comprend des desmosomes et des jonctions adhérentes (AJ) qui s'associent au cytosquelette cortical pour médier le comportement des cellules et des tissus (**Tian et al., 2011**).

Parmi les molécules structurelles constitutives qui s'assemblent pour former AJ, les jonctions d'ancrage à base de cadhérine/caténine organisent et attachent des microfilaments pour maintenir les propriétés adhésives cellulaires et intégrer la signalisation intra- et intercellulaire, y compris la régulation des fonctions nucléaires et des voies de transcription (**Tian et al., 2011**).

L'E-cadhérine est l'une des molécules les plus importantes dans l'adhésion cellule-cellule dans les tissus épithéliaux. Il est localisé à la surface des cellules épithéliales dans des régions de contact cellule-cellule appelées jonctions adhérentes (**Pecina-Šlaus, 2003**).

I.4.1 Structure et fonction:

La glycoprotéine E-cadhérine est composée de trois domaines structurels majeurs : un domaine transmembranaire unique, relié à un domaine cytoplasmique, et un domaine extracellulaire essentiel pour l'adhésion avec E-cadhérine de la cellule adjacente ainsi que pour le bon repliement et l'homo/hétéro dimérisation des protéines. comprenant cinq domaines répétés en tandem appelés EC1-EC5, qui sont exclusifs aux cadhérines. Le domaine extracellulaire de la E-cadhérine est essentiel pour l'adhésion de cellule à cellule, Le domaine cytoplasmique de la E-cadhérine interagit avec les caténines (α , β , p120 caténine) ancrées au cytosquelette d'actine, créant des complexes cadhérine-caténine. La conformation de l'E-cadhérine n'est stable que lorsque Ca^{2+} se lie à ses motifs extracellulaires hautement conservés et chargés négativement. Sa stabilisation au niveau de la membrane cellulaire et son fonctionnement précis se produisent par association à la p120-caténine cytoplasmique. L'E-cadhérine forme une jonction adhérente avec son partenaire de liaison, la β -caténine et les filaments d'actine. Ce complexe est essentiel pour inhiber la motilité des cellules épithéliales individuelles et pour fournir une architecture tissulaire homéostatique. (**Pecina-Šlaus, 2003 ; Luo et al., 2016**).

Les cadhérines peuvent être endocytosées de manière constitutive et recyclées à la surface cellulaire, la β -caténine, internalisée avec la E-cadhérine, s'accumule dans le compartiment de recyclage endocytaire périnucléaire (ERC) lors de la dissociation de AJ. (**Tian et al., 2011**).

I.4.2 Organisation structurale et association avec le cytosquelette d'actine

Les domaines extracellulaires des cadhérines s'engagent dans l'interaction trans homophile dépendante du Ca^{2+} avec des molécules de cadhérine identiques sur une cellule adjacente, tandis que leurs queues cytoplasmiques se lient à p120- et β - (ou son homologue γ) caténine protéines. À son tour, la β -caténine interagit avec la α -caténine, qui contient un domaine de liaison à l'actine et relie physiquement les complexes AJ au cytosquelette d'actine. L'interaction entre le cytosquelette d'actomyosine et les AJ est fortement régulée par les forces mécaniques et Rho- famille de petites GTPases). Cette régulation est nécessaire pour une bonne morphogenèse des tissus et est très dynamique, facilitant non seulement le couplage mais aussi le détachement des complexes cadhérine-caténine du cytosquelette d'actomyosine, permettant la séparation cellule-cellule, le tri cellulaire et la migration cellulaire. (Klezovitch et Vasioukhin, 2015) (Fig.09).

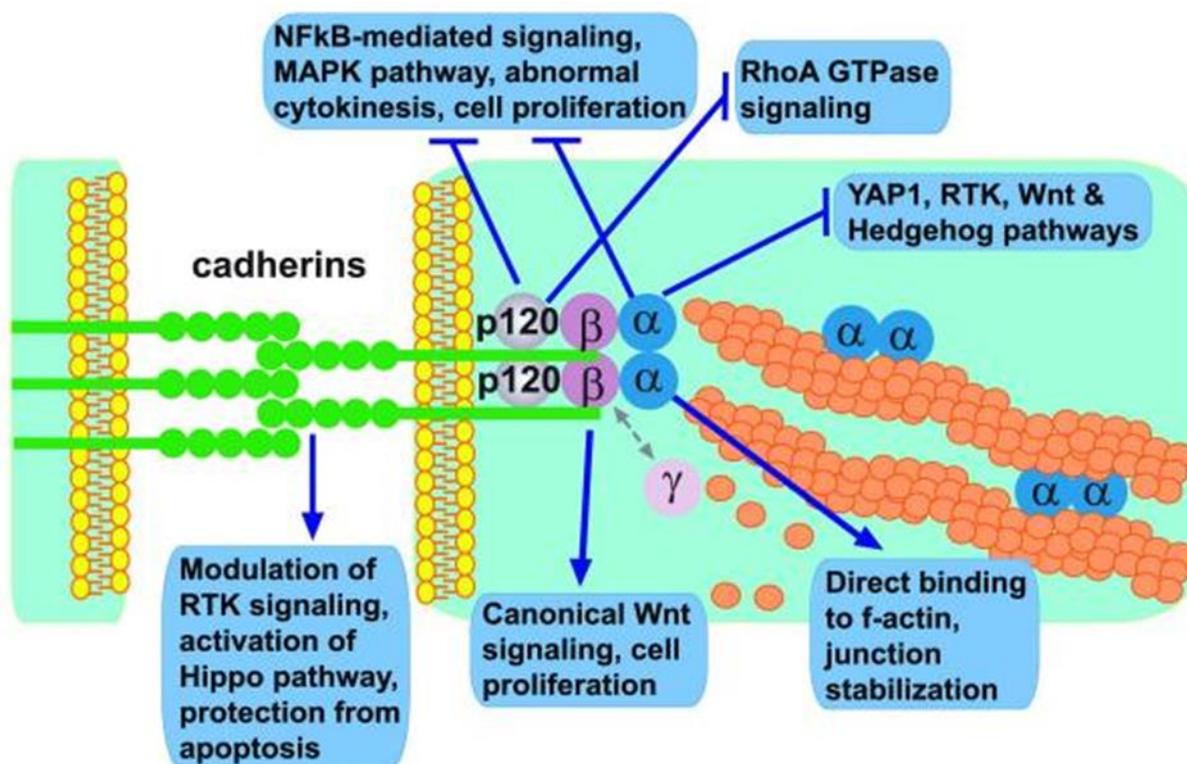


Figure 09 : Complexes cadhérine-caténine et leur rôle dans la régulation des principales voies de signalisation intracellulaire. Le diagramme représente les membres protéiques des jonctions adhérentes regroupées au niveau des membranes plasmiques de deux cellules juxtaposées et résume leurs rôles individuels dans le réseau complexe de voies de signalisation intracellulaires. MAPK, mitogen-activated protein kinase; NF κ B, nuclear factor-kappa-B; RTK, receptor tyrosine kinase; YAP1, yes-associated protein 1 (Klezovitch et Vasioukhin, 2015).

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I.4.3 E-cadhérine et inhibition du contact :

Plusieurs mécanismes de la façon dont l'E-cadhérine et les AJ (jonction adhérente) affectent l'inhibition de contact ont été proposés. Le complexe cadhérine peut recruter les composants centraux du complexe de silençage induit par l'ARN (RISC) et de multiples ARN messagers et micro-ARN matures via PLEKHA7 .Ils peuvent également réguler le Wnt/ β -caténine, le TGF-, la signalisation des cellules souches et l'expression des ARNm MYC, JUN et SOX2, jouant ainsi un rôle important dans le maintien de l'homéostasie épithéliale.

La voie de signalisation Hippo-Yap a été impliquée dans l'inhibition par contact de la croissance médiée par l'E-cadhérine et d'autres protéines de jonction cellulaire. La voie Hippo est une voie d'inhibition de la croissance hautement régulée impliquée dans le contrôle de la taille des organes, le développement et la régénération des tissus, ainsi que dans l'initiation et la progression du cancer (Mendonsa *et al.*, 2018) (Fig.10).

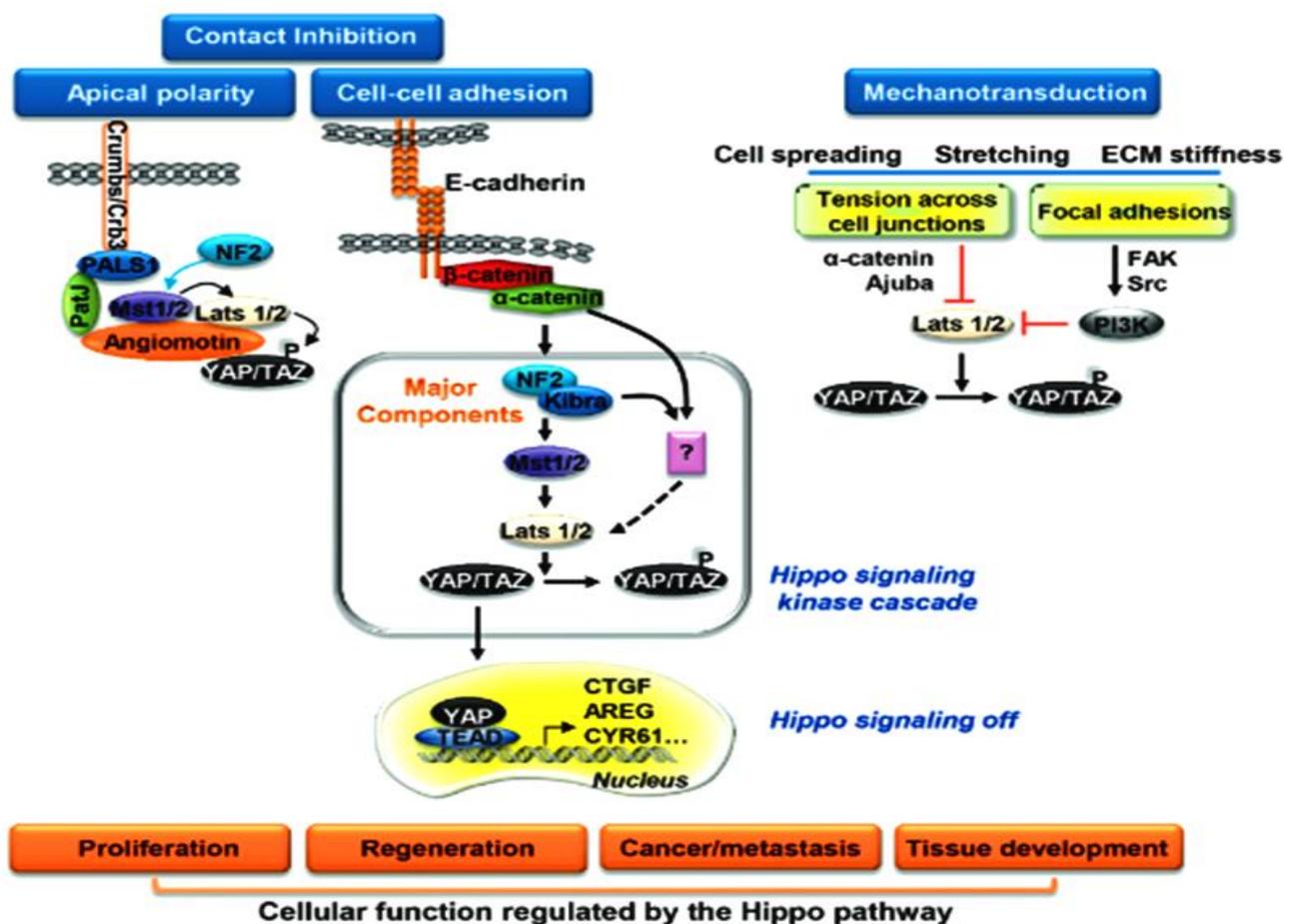


Figure 10 : La voie de signalisation Hippo-Yap. Cette voie est activée lors de l'adhésion cellulaire médiée par l'E-cadhérine, la formation de jonctions serrées et de complexes de polarité apicale tandis que le stress mécanique inhibe la voie. L'activation conduit à une inhibition de la croissance au contact des cellules. Lorsqu'ils sont activés, les composants de la voie forment un complexe aux jonctions où Mst phosphoryle Lats qui phosphoryle ensuite YAP. Le YAP phosphorylé est retenu dans le cytoplasme et la croissance cellulaire est

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

inhibée. Lorsque la signalisation Hippo est inactivée, le complexe se dissocie, empêchant la phosphorylation ultérieure de Lats et YAP. YAP se transfère ensuite vers le noyau, se lie aux TEAD et active l'expression des gènes cibles et la prolifération cellulaire (Mendonça *et al.*, 2018).

I.4.4 E-cadhérine et la tumorigénèse :

La perte d'E-cadhérine en elle-même est insuffisante pour stimuler la voie de signalisation suivante en raison du mécanisme de diminution de la β -caténine qui est médié par la voie de signalisation Wnt (figure 11A). Dans ce processus de dégradation, la glycogène synthase kinase (GSK) phosphoryle la β -caténine et induit son ubiquitination et sa dégradation dans le protéasome 26 S pour maintenir le faible niveau de β -caténine dans le cytoplasme, ainsi que dans le noyau cellulaire. Une fois que les protéines Wnt se lient à Frizzled, la voie de signalisation est activée. La protéine échevelée se lie alors, entraînant un échec de la dégradation du complexe et bloque les effets de dégradation de la caséine kinase 1 α et GSK3 sur la β -caténine. Ainsi, la β -caténine s'accumule dans le cytoplasme et est transloquée vers le noyau, où elle inhibe de manière compétitive un suppresseur du facteur des cellules T/facteur d'amplification lymphoïde (TCF/LEF) et pourrait activer les gènes sensibles à Wnt. L'E-cadhérine joue également un rôle dans la progression du cancer lui-même, en partie par les voies PI3K-AKT et MEK-ERK. L'intégrine fonctionne comme une molécule d'adhésion cellule-cellule et son interaction avec la P-cadhérine augmente la migration (Yu *et al.*, 2019) (Fig.11).

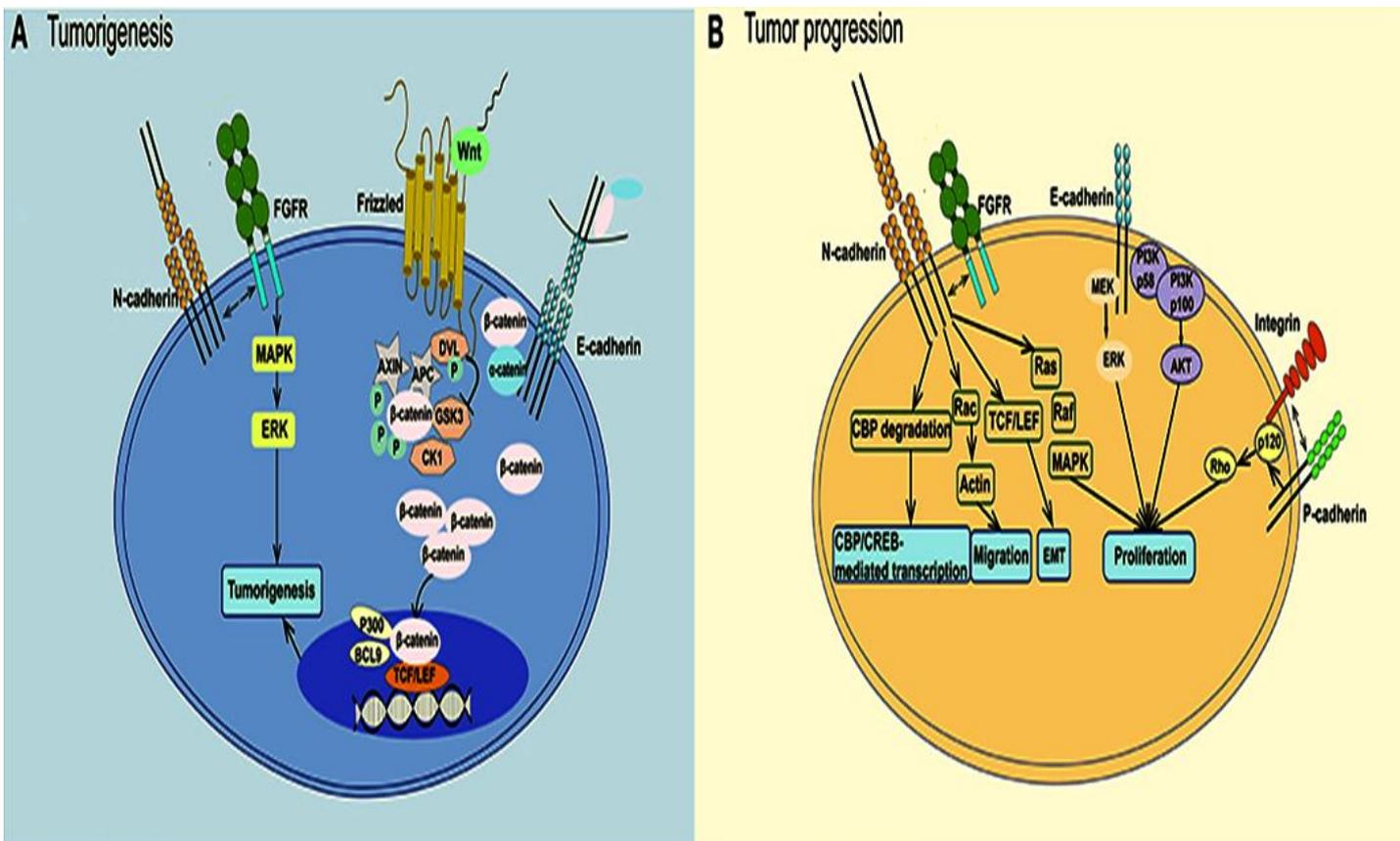


Figure 11 : Interaction d'E-cadhérine au cours de la tumorigénèse. (Yu *et al.*, 2019).

MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

Ce travail consiste à analyser les hépatocytes comparativement aux témoins chez un animal modèle murin d'obésité, de diabète de type 2 et d'insulino résistance : « *Psammomys obesus* » nutri induit. Dans ce contexte, nous avons évalué le développement de DT2 et ses complications particulièrement l'inflammation, la fibrose et les altérations moléculaires des jonctions hépatocytaires.

Notre stage a duré 02 mois, de Avril jusqu'au Juin 2021. Toute la partie expérimentale a été réalisée au niveau de :

*Laboratoire de Nutrition et Métabolisme à l'USTHB au Faculté de la Biologie, pour les sacrifices des animaux et le dosage de certains paramètres pondéraux et biométaboliques.

*Laboratoire de cytologie et Anatomopathologie de l'hôpital universitaire Djillali Bounaama, Douera-Alger, pour la réalisation des coupes histologiques et l'immunohistochimie par les bio-marquages de l'inflammation (anti CD3) et les molécules d'adhésion (anti E-cadhérines).

II.1 Matériel

II.1.1 Matériel biologique

II.1.1.1 Modèle expérimental et son biotope: *Psammomys obesus*

Nous avons choisi comme modèle expérimental le rat des sables *Psammomys obesus* décrit pour la première fois par CRETZCHMAR en 1828 (*Psammomys obesus cretzenschman*).

Classification phylogénique des *Psammomys obesus*



Figure 12 : *Psammomys obesus* (photo originale).

Règne: animaux
Phylum: cordés
Sous phylum: vertébrés
Classe: mammifères
Sous classe: Theria
Infraclasse: Eutheria
Ordre: rongeurs
Sous ordre: Myomorpha
Famille: Muridae
Sous famille: Gerbillidae
Espèce: *Psammomys obesus*

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

Psammomys obesus sont des rongeurs déserticoles du nord de l'Afrique, strictement diurne, qui vivent dans des conditions climatiques drastiques, avec de la nourriture restreinte, cet animal ne développent jamais de maladies métaboliques, se nourrit des plantes halophiles de la famille des Chénopodiacées pauvres en calories (0,4 Kcal/g) et riches en sels minéraux (chlorure de sodium notamment). Ce modèle murin présente un métabolisme bien adapté à une alimentation hypocalorique, connu sous le nom «Métabolisme économe» est activé lorsque l'apport en nutriments est élevé. (El-aoufi et al., 2007; Zoltowska et al., 2004).



Figure 13 : Plante de famille de Chénopodiacées (photo originale).

II.1.1.2 Anticorps

Dans le but d'évaluer le statut inflammatoire et poursuivre l'évolution de la stéatose vers la cirrhose de notre tissu d'intérêt, le foie. Nous avons utilisé différents anticorps :

-L'anti E-Cadhérine est un anticorps monoclonal avec une concentration de 200 µl Fourni dans une solution saline tamponnée au phosphate 10 mM avec 0,05 % de BSA et 0,05 % d'azoture de sodium. (Van Roy et Berx, 2008). C'est est un marqueur immunohistochimique idéal pour la détection des adhésions cellulaires dont une diminution de l'expression de l'E-Cadhérine est associée à un potentiel métastatique. Une coloration positive de ce marqueur représente un signe de présence d'adhésion cellulaire.

-L'anti CD3 est un anticorps monoclonale avec une concentration de 200 µl . La spécificité de l'antigène CD3 pour les lymphocytes T et son apparition à tous les stades du développement des cellules T en fait un marqueur idéal pour la détection des lymphocytes T normaux et des néoplasmes T (lymphomes et leucémies). Il est un marqueur immunohistochimique idéal pour les cellules T dans les coupes de tissus. Cet anticorps réagit à un anticorps présent dans les thymocytes précoces. La coloration positive de ce marqueur peut représenter un signe d'engagement précoce vers la lignée cellulaire T (Sutti et al.,2014).

L'emploi de cet anticorps est indiqué, après les diagnostics différentiels des maladies, pour faciliter l'identification des lymphocytes T et des néoplasmes associés dans le contexte de gammes d'anticorps (Fiche technique de CD3).

II.2 Matériel non biologique

La réalisation de notre étude a nécessité l'utilisation d'un ensemble d'appareillages et de réactifs (Tab. II. Annexe 1).

II.2.1 Protocole expérimental

II.2.1.1 Elevage des animaux

Les rats de sable ont été répartis dans des cages individuelles en plastique équipées d'une litière renouvelée 3 fois par semaine, munies de deux ouvertures qui permettent à l'animal d'entrer et de sortir et de recréer les conditions naturelles de son terrier, la température de laboratoire est réglée 24 à 26°C.

II.2.1.2 Répartition des lots et régime alimentaire

Notre étude a porté sur 62 *Psammomys* adultes mâles dont le poids corporel varie entre 93g et 79g. Après une période d'adaptation de 15 JOURS, les rats ont été répartis en deux lots :

A- Lot témoin : il comporte 24 *Psammomys* qui continuent à recevoir un régime naturel à base d'une plante de la famille des Chénopodiacées jusqu'au moment de sacrifice.

B- Lot traité : il comporte 38 *Psammomys* soumis au régime hypercalorique à base de régime standard de laboratoire sous forme de cookies pendant une période de 9 mois avec de l'eau salée NaCl à 0.9%, « ad libitum », nécessaire pour ajuster sa balance hydrique en particulier pour la réabsorption rénale de l'eau métabolique contre l'élimination du sodium.

La composition en nutriments du RN et standard de laboratoire RHC se diffère. (Tab III. Annexe01)

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

II.2.1.3 Techniques opératoires

II.2.1.3.1 Contrôle du poids corporel

Afin de contrôler l'évolution du poids corporel, les animaux ont été pesés de façon régulière tous les 3 mois pendant un RHC de 9 mois en comparaison avec le lot témoin nourrit par une plante halophile.

II.2.1.3.2 Prélèvement sanguin

Pour l'analyse de certains paramètres biochimiques, des prélèvements sanguins ont été effectués tous les 3 mois de la période d'expérimentation sur l'animal vigile par des ponctions au niveau du plexus rétro-orbital de l'œil, à l'aide d'une pipette pasteur préalablement héparinée. Le sang est prélevé sur des tubes héparines pour l'évaluation des différents paramètres biochimiques (Glucose, Cholestérol, TG et Insuline). Le plasma total subit une centrifugation à 3000 tour/min pendant 10 min dans une centrifugeuse réfrigérée à 4°C. Le plasma obtenu est stocké à -25° C jusqu'au moment des dosages.

II.2.1.3.3 Prélèvement des organes

Au cours de 9 mois de l'expérimentation, les animaux ont été sacrifiés à l'intervalle de 3 mois (0 mois, 3 mois, 6 mois et 9 mois) après anesthésie par le chloroforme, le foie a été prélevé puis lavé par l'eau physiologique et rapidement plongés dans le fixateur formaldéhyde à 10% pour l'étude histopathologiques et immunohistochimiques.

II.2.1.4 Techniques analytiques

Afin de déterminer le stade de développement du syndrome métabolique, des dosages des principaux paramètres biochimiques métaboliques (glycémie, cholestérol total, triglycérides et insuline) ont été effectuées, les méthodes utilisées sont les méthodes colorimétriques enzymatiques et immunologiques.

II.2.1.4.1 Méthodes de Dosage des paramètres biochimiques

II.2.1.4.1.1 Dosage du glucose

La méthode GOD-POD utilisé pour le dosage de la glycémie et le test colorimétrique enzymatique de TRINDER (kits Eurobio), le glucose sanguin est dosé par la méthode enzymatique à la glucose oxydase et la densité optique des essais et des standards est lue par un automate contre le blanc à 505nm ; la concentration du glucose :DO échantillon /DO standard est donnée en g/L du plasma par le même programme.

II.2.1.4.1.2 Dosage des triglycérides

Les triglycérides plasmatiques ont été dosés par la méthode enzymatique colorimétrique GPO-PAP de FOSSATI par des kits Biomaghreb, après dosage, la densité optique est lue contre 505 nm par le même automate.

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

II.2.1.4.1.3 Dosage du cholestérol total

La méthode de dosage du cholestérol total a été le test colorimétrique FASCE (kits Biomaghreb)

II.2.1.4.1.4 Dosage de l'insuline

L'insulinémie a été déterminée par la méthode immunologique ELISA chez un laboratoire privé.

II.2.1.5 Etude statistique

Le test utilisé dans le cadre de notre travail est le test de Student. Pour chaque série d'analyse, la moyenne et l'écart type sont calculés. Les paramètres statistiques sont donnés par les relations suivantes:

$$\text{Moyenne} = \frac{\sum xi}{N}$$

xi : est la valeur individuelle
 N : effectif

La variance δ^2 : est la moyenne des carrés des écarts types entre les valeurs de l'échantillon et la moyenne arithmétique.

$$\delta^2 = \frac{\sum (xi-m)^2}{N-1}$$

Ecart type $\sqrt{\delta^2}$

Erreur standard à la moyenne

$$\text{ESM} = \frac{\text{écart type}}{\sqrt{N}}$$

$$T = \frac{m1 - m2}{\delta^2 \sqrt{1/N1 + 1/N2}}$$

m : moyenne

Pour une ddl de $(N1+N2)-2$ et à 5% d'erreur, la valeur de T pour la comparaison entre 2 moyennes nous donne le degré de signification P lu sur la table de Student, la différence entre deux moyenne:

- Peu significative si $P < 0,05$ (*)
- Significative si $P < 0,01$ (**)
- Très significative si $P < 0,001$ (***)

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

- Très hautement significative si $P < 0,0001$ (****)

II.2 Méthodes d'études

II.2.1 Techniques histologiques

Nous avons réalisés les différentes étapes de la technique histologique depuis le sacrifice des animaux jusqu'au montage des lames selon la procédure suivante :

II.2.1.1 Fixation

Dans notre étude, nous avons réalisé une fixation chimique par le formol dilué à 10 %. La fixation est une étape primordiale qui a pour but de préserver l'aspect structural du tissu. Elle doit être réalisée rapidement après l'obtention du prélèvement. Elle consiste à protéger les tissus prélevés de toute hydrolyse due à la libération des enzymes contenus dans les lysosomes cellulaires (Kalem, 2013) afin de garder le prélèvement dans un état aussi proche que possible de l'état vivant.

II.2.1.2 Circulation

L'étape de circulation consiste à faire séjourner les pièces dans une série de liquides intermédiaires à l'aide d'un automate de circulation et à préparer le tissu à l'inclusion en paraffine qui est de nature hydrophobe.

Pour cela les pièces doivent subir les étapes suivantes:

A. Déshydratation

Cette étape permet l'élimination de l'eau des tissus afin de les préparer à une inclusion dans un milieu hydrophobe (la paraffine : non miscible à l'eau). Elle s'effectue par le passage des pièces contenu dans des cassettes par 6 cuves remplies d'alcool à teneur croissante (70° à 100°).

B. Éclaircissement

L'éclaircissement consiste à remplacer l'alcool présent dans le tissu par un solvant benzénique qui est le xylène car la paraffine est hydrophobe, elle sera répulsée si l'eau demeure à l'intérieur. Elle se fait pendant 8h, dans 4 bains de xylène (2h pour chaque bain).

C. Imprégnation à la paraffine

Dernière étape s'effectue par passage des échantillons dans 2 bains de paraffine. Le but est de faire rentrer la paraffine entre les éléments tissulaires pour donner une rigidité au tissu lui permettant de conserver sa structure interne au moment de la coupe. Elle s'effectue à chaud dans 2 cuves en acier inoxydable et thermo-stabilisées contenant de la paraffine liquéfiée. Les tissus sont tous portés dans des cassettes perforées individuellement.



Figure 14 : Automate de circulation (Photo originale)

II.2.1.3 Inclusion et confection du bloc de paraffine

Elle consiste à la confection des blocs de paraffine destinés à la coupe au microtome.

Nos échantillons ont été délicatement retirés des cassettes avec une pince puis mis dans des moules recouverts d'une petite quantité de paraffine, La cassette est ensuite déposée sur le moule , par la suite une autre quantité de paraffine fondue à une température allant de 55 à 65 a été rajoutée à travers les grilles de la cassette. Après cela, les moules sont déposés sur une plaque refroidissante afin de solidifier la paraffine, et sont par la suite démoulés. Cette étape a pour but de faciliter la réalisation des coupes, mais aussi de conserver l'échantillon à long terme.

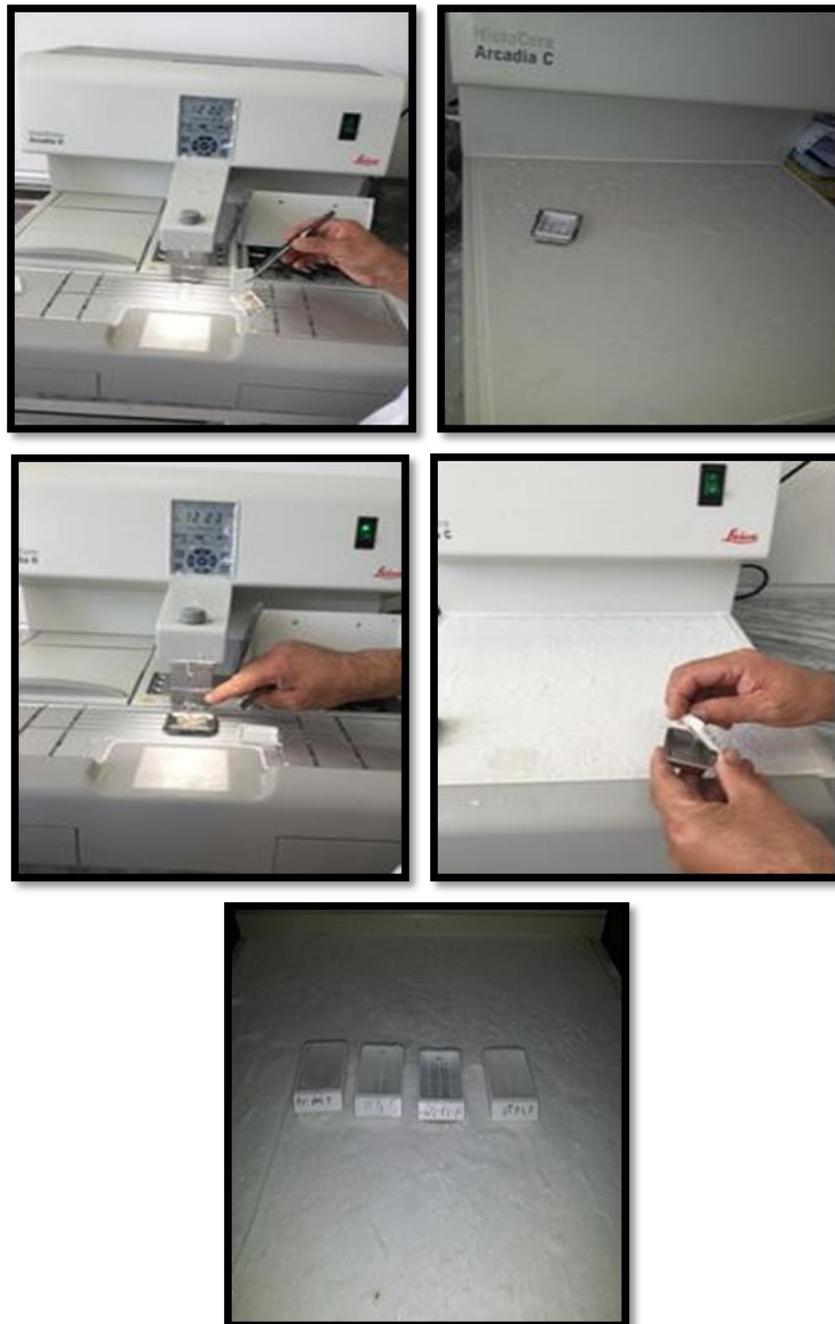


Figure 15 : Différentes étapes de confection des blocs (Photo originale).

II.2.1.4 Confection et étalement des coupes

Les blocs sont coupés à l'aide d'un microtome de type « Leica », afin d'obtenir des rubans très fins (de 3 à 5 μm). Cette épaisseur permet aux rayons lumineux du microscope de traverser la préparation et d'éviter la superposition tissulaire.

Le ruban de coupe est étalé dans un bain marie de 37 à 40 C°, dans le but d'éviter la formation des plis et pour détendre le ruban. La lame est ensuite plongée perpendiculairement au ruban pour faciliter son adhésion. La lame sera mise sur une plaque chauffante à une

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

température de 65C°, puis mise dans une étuve à 37C° pour faire fondre la paraffine et éliminer les résidus d'eau.



Figure 16 : Différentes étapes de confection et étalement des lames (Photo originale).

II.2.1.5 Coloration

La coloration histologique permet l'analyse l'architecture d'un tissu, des cellules, de leur noyau, de leur cytoplasme et des constituants extracellulaires. Les coupes ne seront pas prêtes à recevoir les colorants qu'après les deux étapes suivantes : le déparaffinage et l'hydratation

II.2.1.5.1 Déparaffinage

Le déparaffinage sert à enlever la paraffine du tissu pour que les colorants hydrophiles puissent pénétrer. Les coupes sont passées par un bain de Xylène pendant 30 min.

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

II.2.1.5.2 Hydratation

L'hydratation permet l'apport de l'eau, les coupes sont passées dans des bains d'alcool à concentration décroissante (100°, 90°, 70°), puis rincées à l'eau distillée.

II.2.1.5.3 Coloration topographique et histochimique

II.2.1.5.3.1 L'Hémalinéosine (HE) (Voir annexe 02)

La méthode HE est une coloration de routine, utilisée pour tout fragment étudié dans le but d'obtenir une topographie générale de l'échantillon.

C'est une combinaison entre deux colorants, l'un basique hémalin qui colore le noyau en bleu violacé et l'autre acide éosine qui confère une coloration rose au cytoplasme.



Figure 17 : Appareil de coloration HE « DAKO COVER STAINER ».(Photo originale)

II.2.1.5.3.2 Periodic Acid Schiff (voir annexe 2)

Cette méthode met en évidence les glucides, le mécanisme est le suivant : un agent oxydant, l'acide périodique rompt les liaisons entre 2 carbones de certains groupements chimiques en faisant apparaître des aldéhydes. Ces aldéhydes sont visualisés par le réactif de Schiff en rouge (**Ganter et Jollés , 1970**).

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

II.2.1.5.3.3 Trichrome de Masson (voir annexe 2)

Cette méthode met en évidence les fibres de collagène, comme son nom l'indique, cette coloration associe trois colorants : L'hématoxyline un colorant nucléaire. Il colore notamment les noyaux en violet. La fuchsine ponceau un colorant cytoplasmique. Il colore le cytoplasme en rouge. Le vert lumière (ou le bleu d'aniline) un colorant fibrillaire. Il colore les fibres conjonctives de collagène en vert ou en bleu (**Goldner ,1938**).

II.2.1.5.4 Montage des coupes

Le montage entre lame et lamelle à l'aide de l'Eukit permet d'observer les lames et de les conserver.

II.2.1.5.5 Observation des coupes et acquisition des images

Les lames sont observées grâce au microscope optique Optica, et prises en photos par un appareil photo numérique de type HiROCAM (5.0 Megapixel).

II.3 Technique d'immunohistochimie

Notre étude immunohistochimique a été réalisée au niveau de Laboratoire de cytologie et Anapathologie de l'hôpital universitaire Djillali Bounaama, Douera-Alger.

L'immunohistochimie est une technique utilisée en histo et cytopathologie ,son but est de mettre en évidence certaines protéines cellulaires (Antigène) qu'elles soient cytoplasmiques, nucléaires ou membranaires, spécifiques à un type ou à une fonction cellulaire, à l'aide d'anticorps dirigés contre cette protéine aux propriétés antigènes (réaction antigène-anticorps), sur des préparations cytologiques (immunocytochimie), ou sur des coupes de tissus congelés,ou fixés et inclus en paraffine et le complexe formé étant rendu visible, donc localisable, par un marqueur coloré.

Au cours de notre étude nous avons utilisé deux marqueurs l'E-cadhérine et le CD3.

II.3.1 Technique

Les systèmes de détection ont été testés sur les foies des rats de sables Psammomys: témoin et expérimentaux avec deux marqueurs l'un d'inflammation (CD3) et l'autre d'adhésion (E cadhérine) afin d'évaluer leurs niveau d'amplification.

Les foies sont fixés au formol neutre tamponné à 10% et à ph 7,4 pendant une nuit à température ambiante, ensuite ils sont inclus en paraffine.

Des coupes de 3µm d'épaisseur sont placées et étalées sur des lames de verre chargées positivement dite Superfrost plus (silanisée) pour une adhésion maximale du tissu au support, puis ces lames sont mises à l'étuve pendant une nuit à 54 °C (proche de la température de fusion de la paraffine), ce qui élimine le film liquidien compris entre la lame et la coupe paraffinée.

II.3.2 Etapes

1. Etape de déparaffinage et Démasquage des lames :

Cette étape consiste à faire passer les lames dans le PT Link pendant 1h dans le but d'éliminer la paraffine et réhydrater les lames avec un démasquage de l'antigène le rendant ainsi visible et localisable, que ce soit dans le cytoplasme, les noyaux ou la membrane cellulaire.

2. Marquage par des anticorps :

L'AC primaire « anti E-cadhérin et anti CD3 » est déposé sur la partie encadrée du tissu sur la lame qui est détecté par un second anticorps conjugué à l'enzyme HRP (Horse Radish peroxydase) dirigé contre la partie constante du premier.

2. Révélation de l'anticorps secondaire :

après appliquer L'AC secondaire « HRP », le chromogène de la peroxydase et le DAB (3-3 diaminobenzidine) sont déposés sur les coupes . L'enzyme (HRP) dégrade le substrat chromogène DAB, le produit qui en résulte donne une coloration marron détectable par microscopie optique.

3. Montage entre lame et lamelle :

Une goutte de résine (Eukitt) est déposée sur la lame puis recouverte par la lamelle

4. Observation des coupes et acquisition des images :

L'observation au microscope photonique est réalisées à différents grossissements, et les photos sont prises, enregistrées, analysées et interprétées.

RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 Résultats

Les résultats de l'évolution des paramètres pondéraux et de certains paramètres biochimiques sériques chez *Psammomys Obesus* témoins et rendu diabétique par un régime hypercalorique, sur une période de 9 mois sont présentés sous forme des graphes et des tableaux. (Annexe 01)

III.1.1 Poids corporel

Psammomys obesus témoins soumis au régime naturel durant 9 mois présentent une évolution pondérale de faible amplitude qui passe de $86,63 \pm 1,37$ g à T=0 à $103,38 \pm 4,46$ g en fin d'expérimentation (tableau IV. Annexe 01) (figure 18). Chez les animaux soumis au régime hypercalorique (RHC), les paramètres pondéraux évoluent très fortement, les valeurs moyennes pondérales augmentent progressivement jusqu'au 6^{ème} mois pour atteindre $136,34 \pm 5,24$ g pour chuter ensuite brutalement, en effet, elle passe de $136,34 \pm 5,24$ au 6^{ème} mois du RHC à $106,12 \pm 6,35$ au 9^{ème} mois du RHC (tableau IV. Annexe 01) (figure18).

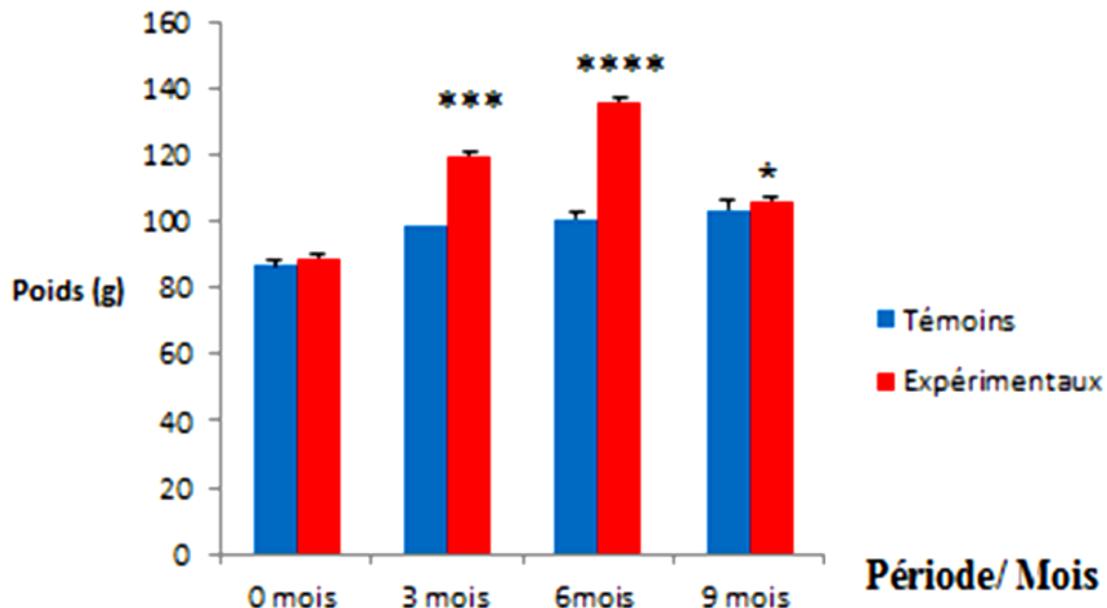


Figure 18 : Evolution du poids corporel (g) en fonction de la durée de RHC

III.1.2. Résultats des paramètres biochimiques

Le dosage des paramètres biochimiques permettent de déterminer l'évolution du diabète et des troubles métaboliques chez *Psammomys* soumis au RHC comparativement à l'animal témoin nourri aux plantes halophiles de son biotope. Tout au long de l'expérimentation, le dosage des paramètres biochimiques a été effectué chaque trois mois pour lot témoins et les lots expérimentaux.

III.1.2.1. Dosage de la glycémie

La glycémie chez les témoins ne subit pas de changement significatif tout au long de l'expérimentation. En parallèle, chez les expérimentaux, l'augmentation du taux de la glycémie apparaît dès le troisième mois d'expérimentation pour atteindre au 9ème mois une valeur maximale de $2,28 \pm 0,26$ g. Cette valeur est très significative (**tableau V. Annexe 01**) (**figure 19**).

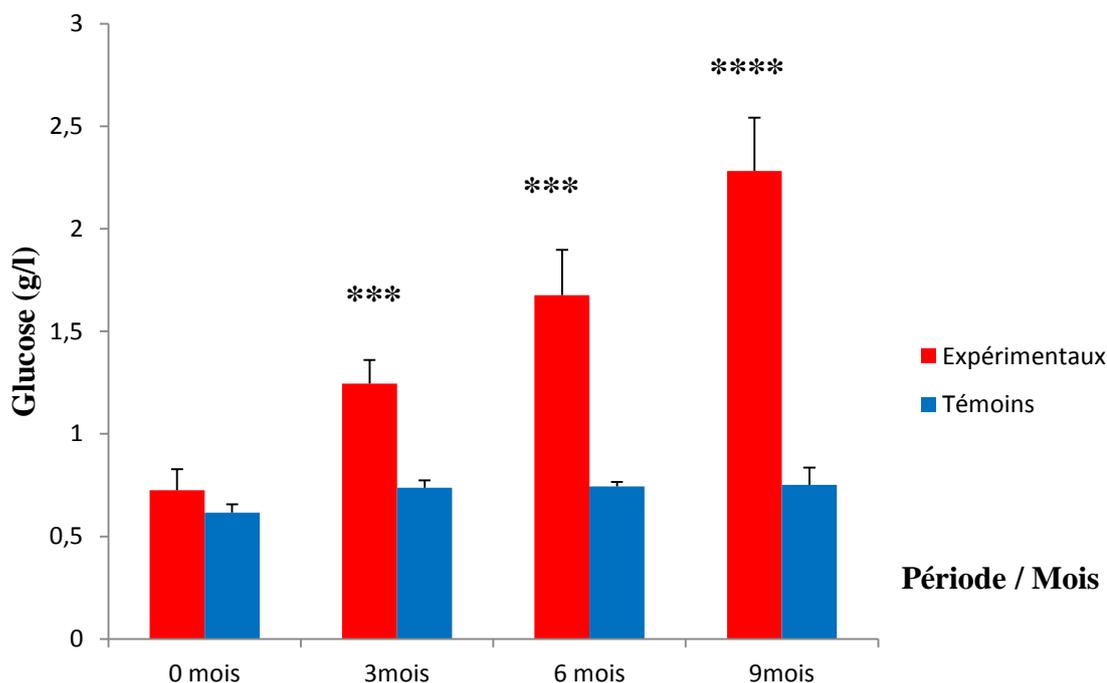


Figure 19 : Valeurs moyennes du glucose sanguin (g/l) chez les rats de sable témoins et expérimentaux.

III.1.2.2. Dosage des lipides plasmatiques : triglycérides et cholestérol total.

Les lipides plasmatiques chez les animaux soumis au RHC augmentent considérablement, la triglycéridémie subit une variation hautement significative (tableau VI ; figure 20). Le cholestérol total est hautement significative sa valeur moyenne passe de $0,61 \pm 0,04$ g/l à $2,25 \pm 0,15$ g/l de plasma (**tableau VII. Annexe 01**) (**figure 21**).

a. Dosage des triglycérides

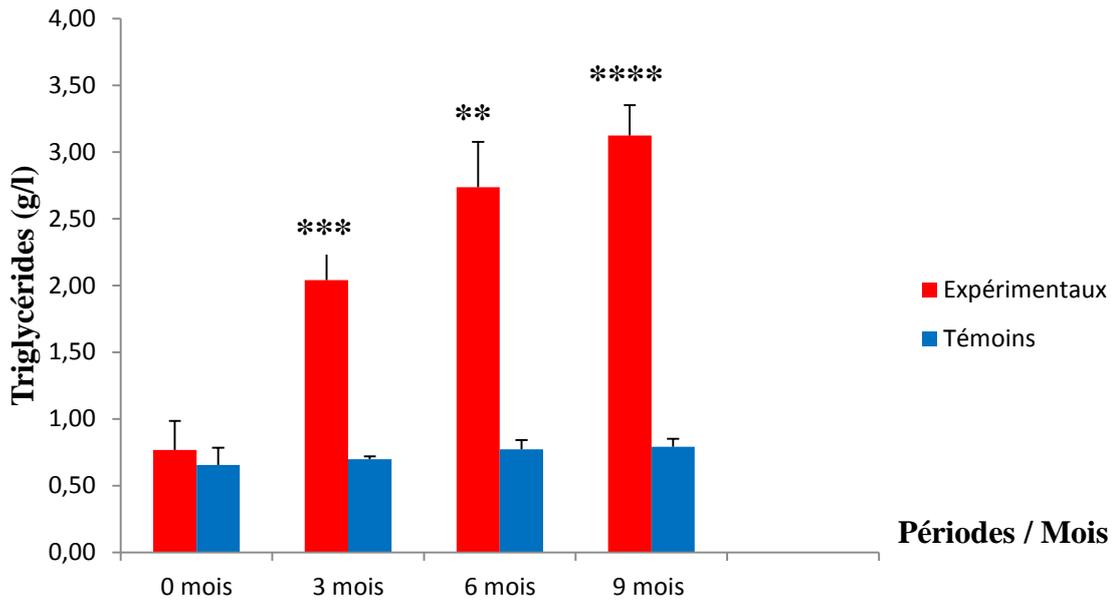


Figure 20 : Valeurs moyennes des triglycérides plasmatiques chez *Psammomys* témoins et expérimentaux.

b. Dosage du cholestérol total.

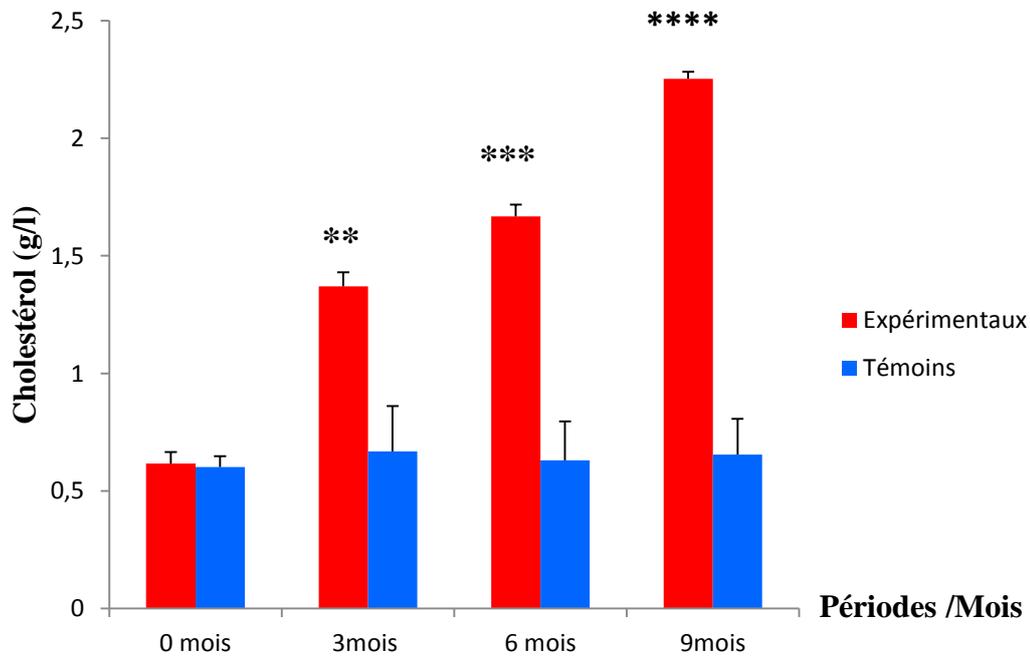


Figure 21 : Valeurs moyennes du cholestérol total plasmatiques chez les rats de sable témoins et expérimentaux.

III.1.2.3. Dosage de l'insuline plasmatique

Le taux d'insuline chez *Psammomys obesus* montre que l'augmentation du taux d'insuline plasmatique commence dès l'instauration du RHC. La croissance devient brutale à partir du 3^{ème} mois de RHC pour atteindre le pic insulinique après 6 mois de RHC. Les cellules bêta du pancréas commencent à s'épuiser et le taux de fabrication d'insuline diminue. Cette décroissance est due à une diminution de la masse des cellules bêta au niveau des îlots de Langerhans qui après une phase d'hyperplasie, se réduisent et meurent par apoptose. Il a été démontré au laboratoire Nutrition et Métabolisme (FSB/USTHB) qu'à partir du 9^{ème} mois la production d'insuline diminue considérablement (**tableau VIII. Annexe 01**) (**figure 22**).

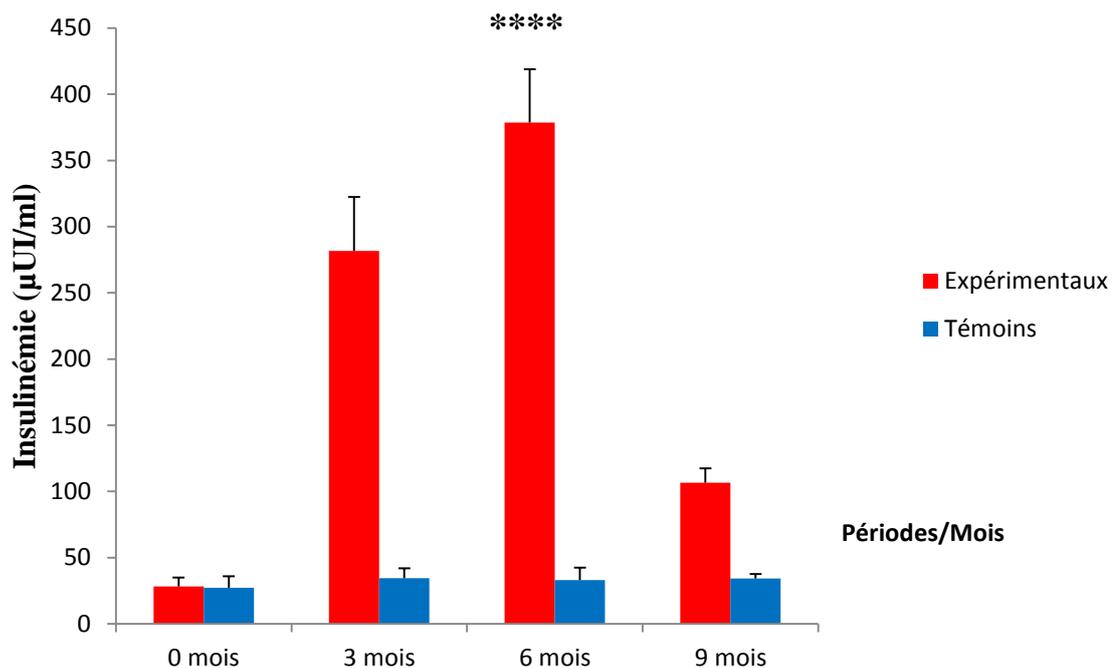


Figure 22 : Valeurs moyenne de l'insulinémie plasmatique chez *Psammomys obesus* témoins et expérimentaux.

I.1 Résultats histologiques

I.1.1 Etude histologique du foie témoin de *Psammomys obesus*

Les résultats histologiques du tissu hépatique témoin sont présentés sous forme des coupes (**Fig. 23**) en montrant les constituants du foie. La coupe histologique du foie de *Psammomys obesus* témoins coloré à HE observé au grossissement GX100 montre une vue d'ensemble du foie, dans cette figure on observe le parenchyme hépatique qui est constitué de lobules séparés par l'Espace porte (EP), chaque lobule contient une veine Centro lobulaire (VCL). On observe aussi des travées de cellules, les hépatocytes de coloration rose, entre ces travées des hépatocytes s'installe les sinusoides sous forme d'espace peu coloré (**Fig. 23 A**). La coupe histologique du foie de *Psammomys obesus* témoins coloré au PAS observé au grossissement GX400 montre la mise en évidence des travées de Remak sous forme de cordon cellulaire. On observe les hépatocytes avec un noyau rond et des hépatocytes bi nucléaires séparés par des capillaires sinusoides (espace clair) s'observe également (**Fig. 23 B**). Par contre la coupe histologique du foie de *Psammomys obesus* témoins coloré à HE observé au grossissement GX400 montre le détail de la veine Centro lobulaire (VCL) avec des travées de Remak qui convergent vers une veine qui est VCL et qu'ils sont séparés par les capillaire sinusoides. Des hépatocytes s'observent aussi avec un cytoplasme basophile rose reflète la richesse en organites (**Fig. 23 C**). La dernière c'est une coupe histologique du foie de *Psammomys obesus* témoins coloré au PAS observé au grossissement GX400 qui montre la mise en évidence de l'espace porte. On observe du canal biliaire avec l'espace porte, des hépatocytes séparées par les sinusoides (**Fig. 23D**).

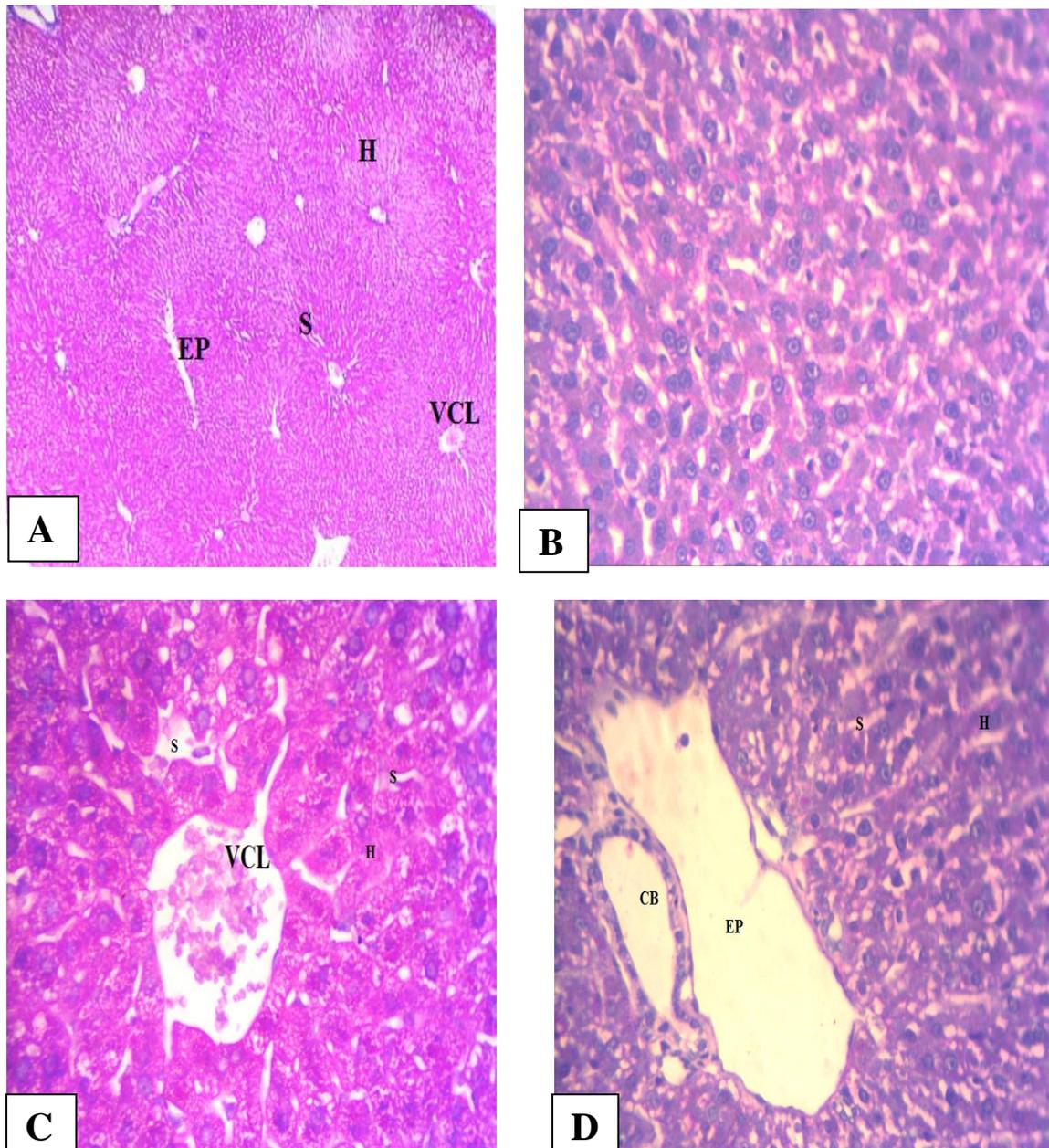


Figure 23 : Coupe histologique du foie de *Psammomys obesus* coloré a Hématoxyline-éosine(HE) et Periodic Acid Shiff (PAS). Observé au microscope photonique GX100 et GX400 VCL : veine Centro lobulaire, EP : espace porte, CB : canal biliaire, S : Sinusoïde, H : hépatocyte.

I.1.2 Etude histologique du foie de *Psammomys obesus* après 3mois RHC

Les résultats histologique du tissu hépatique après 3mois de régime hypercalorique(RHC) sont présentés sous forme des coupes (**Fig.24**) la première c'est une Coupe histologique du foie de *Psammomys obesus* après 3mois de RHC coloré à HE observé au grossissement GX100. Montrant une vue d'ensemble du foie dans cette figure on observe une diffusion importante des vacuoles lipidiques qui reflète la présence d'une stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) pure (**Fig. 24 A**). La coupe suivante est une coupe histologique du foie de *Psammomys obesus* après 3mois de RHC coloré à HE observé au grossissement GX400. Qui montre le détail de la veine Centro lobulaire (VCL) dont l'installation d'une stéatose hépatique est observée (**Fig. 24 B**). La troisième est une coupe histologique du foie de *Psammomys obesus* après 3mois de RHC coloré à HE observé au grossissement GX400 qui montre le détail du parenchyme hépatique .Dans cette figure on observe le détail des hépatocytes (H) qui sont chargées des vacuoles lipidiques avec un noyau qui est refoulé à la base des cellules (flèches) (**Fig. 24 C**). La dernière c'est une coupe histologique du foie de *Psammomys obesus* après 3mois de RHC coloré à HE observé au grossissement GX400. Cette figure nous montre le détail des vacuoles lipidiques qui se présentent sous différentes tailles, grande et petite vacuoles (flèches) (**Fig. 24 D**).

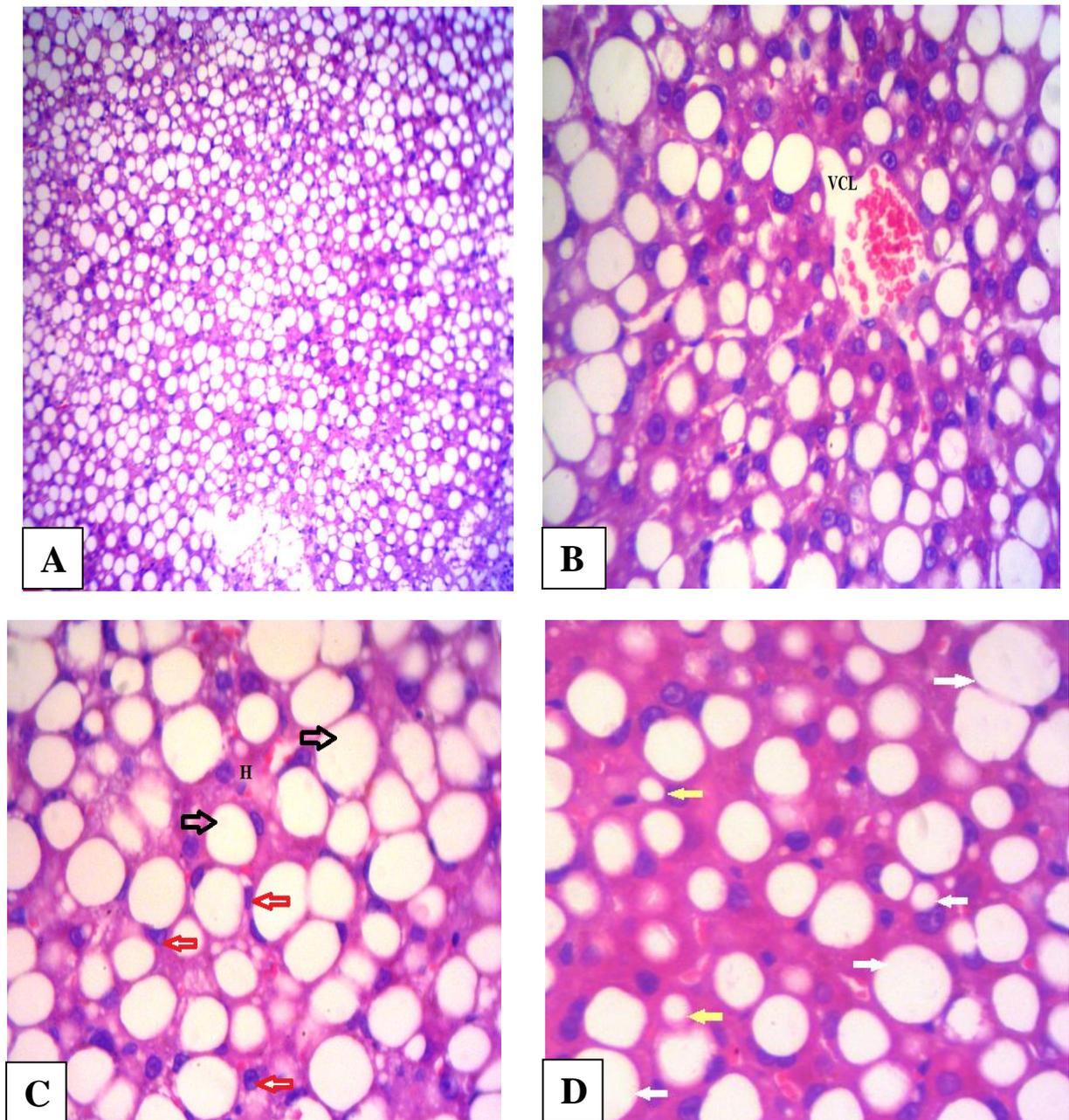


Figure 24: Coupe histologique du foie de *Psammomys obesus* coloré a Hématoxyline-éosine(HE). Observé au microscope photonique GX100et GX400 .VCL : veine Centro lobulaire, H : hépatocyte, flèche noire : vacuole lipidique, flèche rouge : noyau des hépatocytes, flèche blanche : macro vacuole, flèche jaune : micro vacuole.

I.1.3 Etude histologique du foie de *Psammomys obesus* après 6 mois RHC

La coupe histologique du foie de *Psammomys obesus* après 6 mois coloré à Hématoxyline-éosine(HE). Observé au microscope photonique GX100. Montrant l'espace porte, on observe dans cette figure une vue d'ensemble des infiltrats inflammatoires portales et lobulaires (cercle) (**Fig.25 A**). La coupe histologique du foie de *Psammomys obesus* après 6 mois coloré à Hématoxyline-éosine (HE), Observé au microscope photonique GX400. Montrant le détail d'infiltrat inflammatoire qui reflète la présence d'une inflammation hépatique due au diabète de type 2 induit par le RHC (**Fig.25 B**). La coupe histologique du foie de *Psammomys obesus* 6 mois RHC, coloré au Trichrome de Masson(TM). Observé au microscope photonique GX400. Montrant le détail d'infiltrat inflammatoire qui reflète la présence d'une inflammation hépatique avec début d'installation de la fibrose (étoiles) (**Fig.25 C**). La coupe histologique du foie de *Psammomys obesus* 6 mois RHC coloré au Trichrome de Masson (TM). Observation au microscope photonique GX400. Montrant le détail des cellules inflammatoires dont des neutrophiles et des lymphocytes avec un grand noyau rond sont observées avec l'installation de la fibrose (**Fig.25 D**).

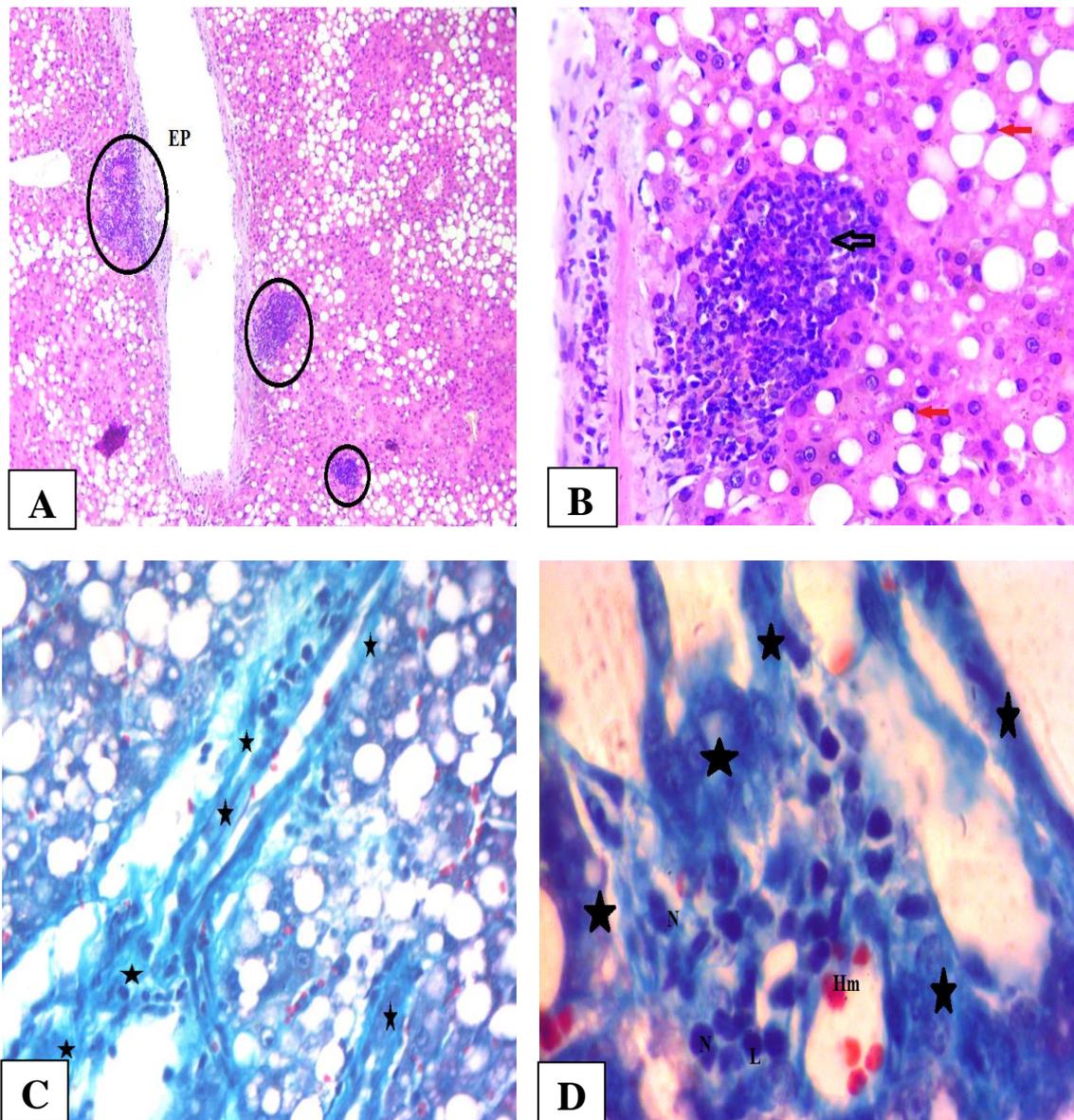


Figure 25 : Coupe histologique du foie de *Psammomys obesus* après 6mois de RHC coloré a Hématoxyline-éosine(HE) et à Trichrome de Masson. Observé au microscope photonique GX100 (A) et GX400 (B ,C ,D).cercle : l'infiltrat inflammatoire, flèche noire : noyau des cellules inflammatoires, flèche rouge : noyau des hépatocytes, étoile : fibrose, Hm : hématies, N : neutrophile, L : lymphocyte.

I.1.4 Etude histologique du foie de *Psammomys obesus* après 9 mois RHC

La coupe histologique du foie de *Psammomys obesus* après 9 mois de RHC coloré à Hématoxyline-éosine(HE). Observation au microscope photonique GX100. Montrant des infiltrats inflammatoires (cercle) au tour des veines Centro lobulaires (VCL) (**Fig.26 A**). La coupe histologique du foie de *Psammomys obesus* après 9 mois de RHC coloré à Hématoxyline-éosine(HE). Observation au microscope photonique GX400. Montrant le détail d'une veine Centro lobulaire (VCL), on observe une clarification des hépatocytes avec un grand nombre des cellules d'infiltrat inflammatoire (Neutrophile et lymphocytes) (**Fig.26 B**). La coupe histologique du foie de *Psammomys obesus* après 9 mois de RHC coloré au Trichrome de Masson(TM). Observation au microscope photonique GX400. Montrant une veine Centro lobulaire (VCL), une installation avancée de la fibrose (étoiles) est observée on suggère que c'est le début d'une cirrhose (**Fig.26 C**). La coupe histologique du foie de *Psammomys obesus* après 9 mois de RHC coloré au Trichrome de Masson (TM). Observation au microscope photonique GX400. Montrant le détail de la fibrose au tour des hépatocytes, on observe également une clarification des hépatocytes qui reflète la détérioration et l'altération hépatocytaire avec la présence d'une armature des fibres de collagène (flèche) (**Fig.26 D**).

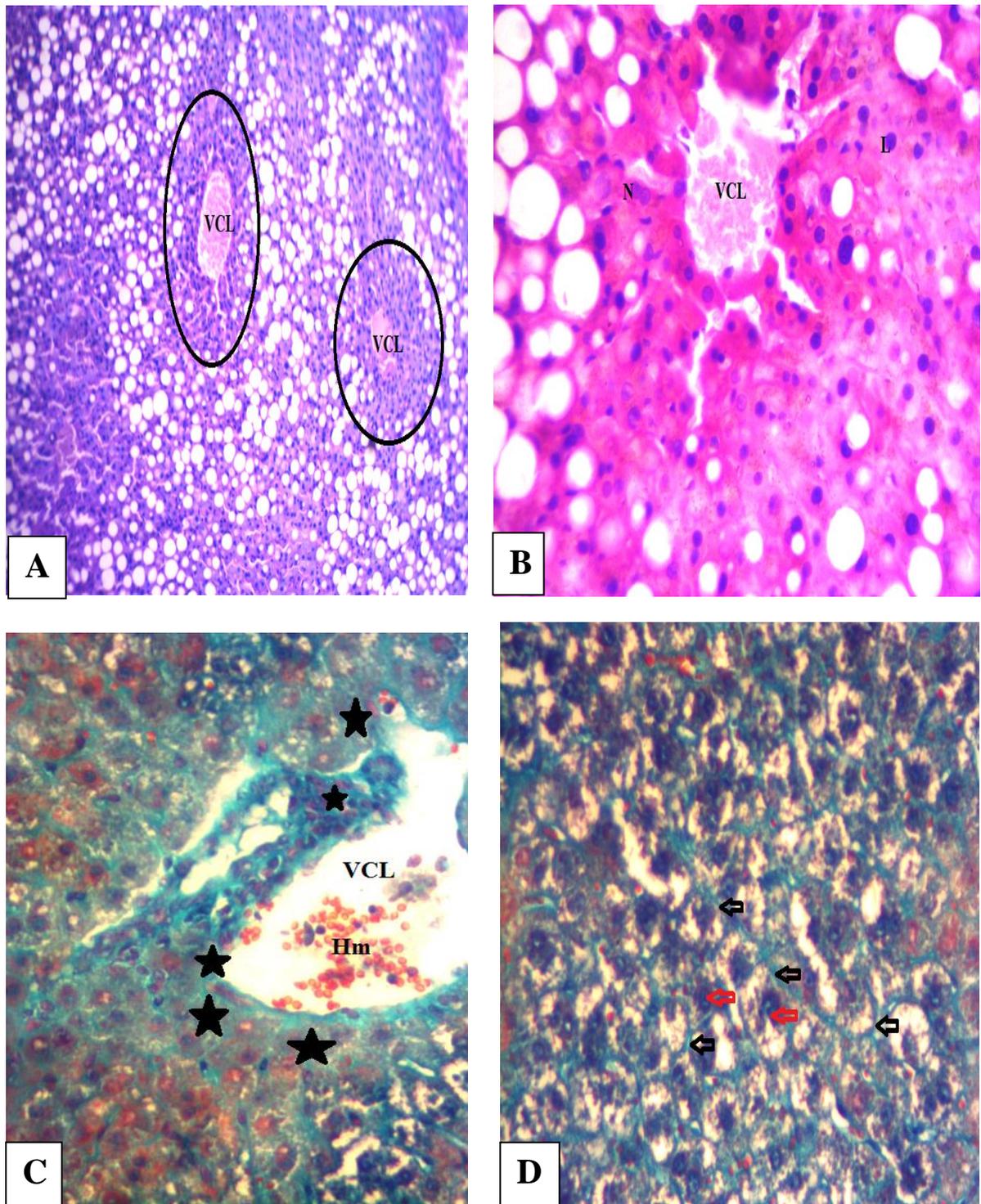


Figure 26 : Coupe histologique du foie de *Psammomys obesus* après 9mois de RHC coloré a Hématoxyline-éosine(HE) et à Trichrome de Masson. Observé au microscope photonique GX100 (A) et G X400 (B,C,D).cercle : Infiltrat inflammatoire, VCL : veine Centro lobulaire, N : neutrophile, L : lymphocyte, Hm : hématies, étoile : fibrose, flèche noire : armature des fibres de collagène , flèche rouge : noyau des hépatocytes.

I.2 Résultats immunohistologiques

I.2.1 Immunomarquage par l'anticorps monoclonal CD3

I.2.1.1 Etude immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* témoin

La coupe immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* témoins marquée par l'anticorps monoclonal CD3. Observation au microscope photonique GX100. Montrant une veine Centro lobulaire (VCL) et l'espace porte (EP). On observe un très faible marquage membranaire du parenchyme hépatique due à l'absence des lymphocytes T (**Fig.27 A**). La coupe immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* témoins marquée par l'anticorps monoclonal CD3. Observation au microscope photonique GX100. Montrant le détail de la veine Centro lobulaire (VCL), observation d'un faible marquage qui reflète l'absence des Lymphocytes (**Fig.27 B**).

I.2.1.2 Etude immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* après 3 mois de RHC

La coupe immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* après 3 mois de RHC marquée par l'anticorps monoclonal CD3. Observation au microscope photonique GX100. Montrant une vue d'ensemble du parenchyme hépatique marqué au CD3 au niveau de la veine Centro lobulaire (VCL) et entre les cordons cellulaires, des travées de Remak : les capillaires sinusoides (**Fig.28 A**). La coupe immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* après 3 mois de RHC marquée par l'anticorps monoclonal CD3. Observation au microscope photonique GX400. Montrant le détail des travées de Remak. On observe un marquage important au niveau des capillaires sinusoides ce qui reflète la présence des lymphocytes T qui jouent un rôle lors de la réponse immunitaire cellulaire (**Fig.28 B**).

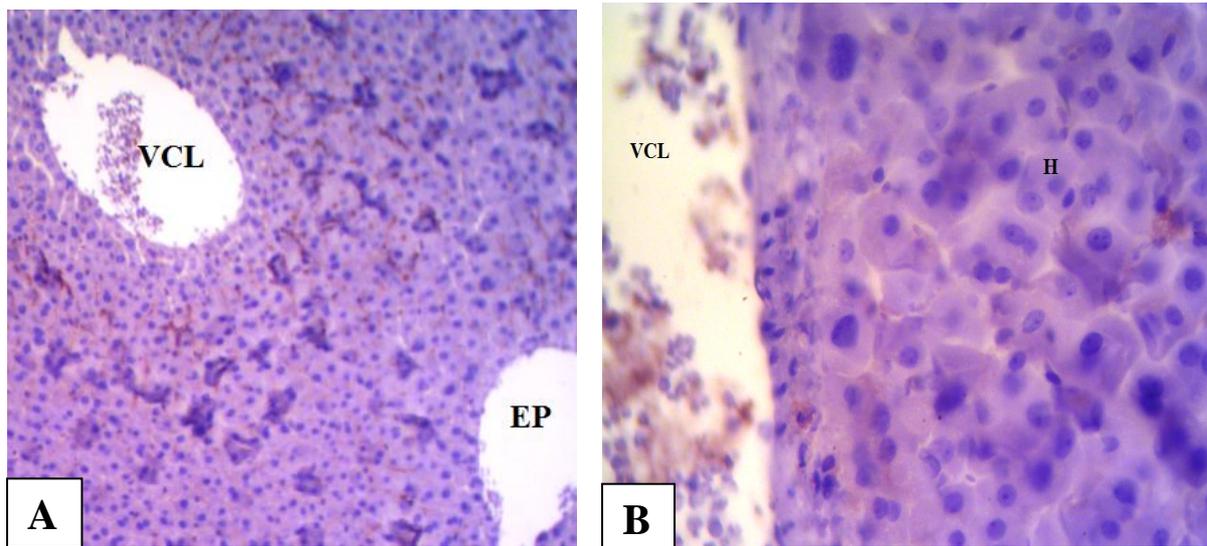


Figure 27 : Coupe immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* témoin marquée par l'anticorps monoclonal CD3. . Observé au microscope photonique GX100 (A, B).VCL : veine Centro lobulaire, EP espace porte, H : hépatocytes.

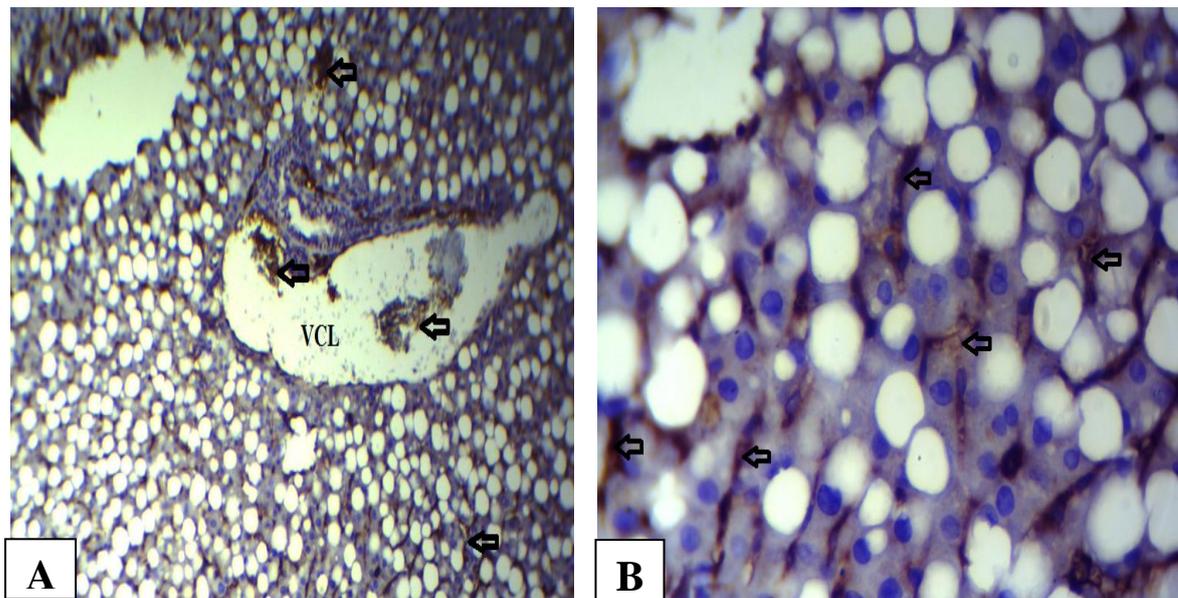


Figure 28 : Coupe immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* témoin marquée par l'anticorps monoclonal CD3. . Observé au microscope photonique GX100 (A) et GX400 (B).VCL : veine Centro lobulaire, flèche noire : expression d'anticorps CD3.

I.2.1.3 Etude immunohistologique (CD3) du foie de *Psammomys obesus* après 6 mois de RHC

La coupe immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* de 6 mois de RHC marquée par l'anticorps monoclonal CD3. Observation au microscope photonique GX100. Montrant une vue d'ensemble de parenchyme hépatique contenant la veine Centro lobulaire (VCL) et l'espace porte (EP). On observe un marquage important d'anticorps CD3 surtout au niveau de la veine Centro lobulaire et dans la lumière des capillaires sinusoides (**Fig.29 A**). La coupe immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* après 6 mois de RHC marquée par l'anticorps monoclonal CD3. Observation au microscope photonique GX400. Montrant une vue détaillée de parenchyme hépatique au niveau de la veine Centro lobulaire et les travées de Remak. On observe un marquage intense d'anticorps CD3 surtout au niveau de la veine Centro lobulaire et les lumières sinusoidales (**Fig.29 B**).

I.2.1.4 Etude immunohistologique (CD3) du foie de *Psammomys obesus* après 9 mois de RHC

La coupe immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* après de 9 mois de RHC marquée par l'anticorps monoclonal CD3. Observation au microscope photonique GX400. Montrant une vue détaillée au niveau de la veine Centro lobulaire, on observe un marquage très intense au niveau de la veine ainsi qu'au niveau des capillaires sinusoides qui reflète la présence diffuse des lymphocytes T un signe d'une réponse immunitaire sévère (**Fig.30 A**). La coupe immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* après de 9 mois de RHC marquée par l'anticorps monoclonal CD3. Observé au microscope photonique X100. Mise en évidence de marquage très intense au CD3 autour des hépatocytes, reflétant la forte présence et concentration des lymphocytes T. De plus, la clarification des hépatocytes c'est un signe de leurs altérations (**Fig.30 B**).

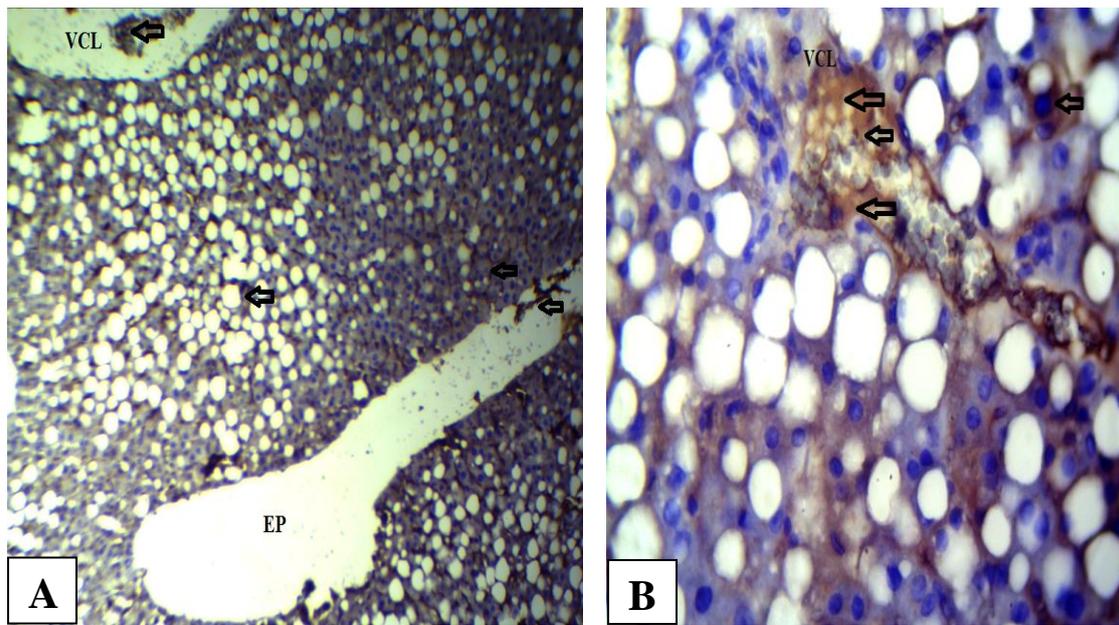


Figure 29 : Coupe immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* après 6mois de RHC marquée par l'anticorps monoclonal CD3. . Observé au microscope photonique GX100 (A) et GX400 (B).VCL : veine Centro lobulaire, flèche noire : expression d'anticorps CD3, EP : espace porte.

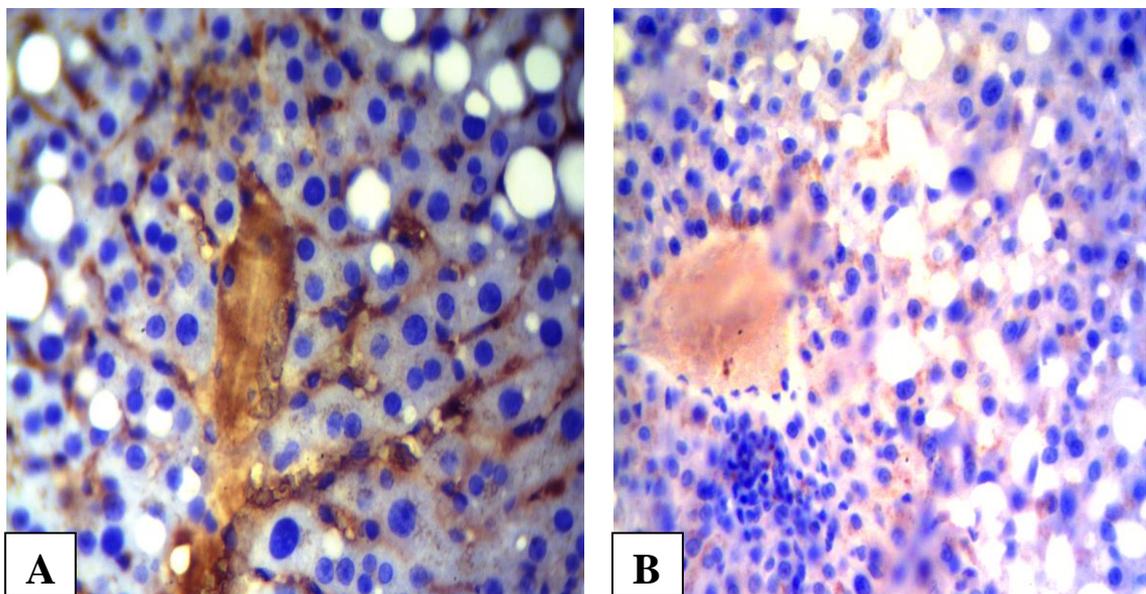


Figure 30 : Coupe immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* après de 9mois de RHC marquée par l'anticorps monoclonal CD3. Observé au microscope photonique GX100 (B) GX400 (A).

I.2.2 Immunomarquage par l'anticorps monoclonal E cadhérine

I.2.2.1 Etude immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* témoin

La coupe immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* témoins marquée par l'anticorps monoclonal E cadhérine. Observation au microscope photonique GX100. Montrant une vue d'ensemble de parenchyme hépatique. On observe une expression homogène et très intense au niveau du tout de parenchyme hépatique qui reflète la présence des adhérences homologues de type cellule-cellule (**Fig.31 A**). La coupe immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* témoins marquée par l'anticorps monoclonal E cadhérine. Observation au microscope photonique GX400. Montrant le détail des travées de Remak et au niveau de l'espace porte. On observe un marquage très intense intercellulaire qui reflète la forte adhésion cellulaire (**Fig.31 B**).

I.2.2.2 Etude immunohistologique(Ecadhérine) du foie de *Psammomys obesus* après 3 mois de RHC

La coupe immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* après 3 mois de RHC marquée par l'anticorps monoclonal E cadhérine. Observation au microscope photonique GX100. Montrant une vue d'ensemble de parenchyme hépatique infiltré par des vacuoles lipidiques : stade stéatose pure (NAFLD). On observe un marquage plus au moins faible que chez les témoins mais il reste intense (**Fig.32 A**). La coupe immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* après 3 mois de RHC marquée par l'anticorps monoclonal E cadhérine. Observation au microscope photonique GX400. Montrant le détail de marquage de parenchyme hépatique et au niveau de la veine centro lobulaire. On observe un marquage intense hépatocyte-hépatocyte à partir de la VCL vers les hépatocytes contenant les vacuoles lipidiques (stéatose) (**Fig.32 B**).

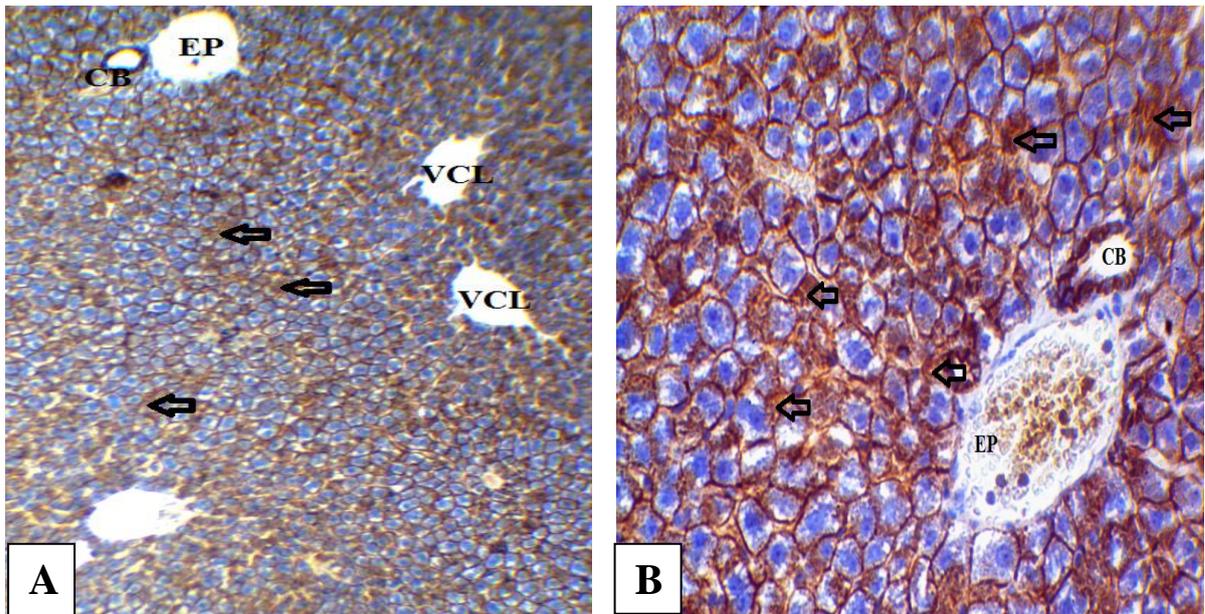


Figure 31 : Coupe immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* témoin marquée par l'anticorps monoclonal E cadherine. Observé au microscope photonique GX100 (A) et GX400 (B).VCL : veine Centro lobulaire, EP : espace porte, CB : canal biliaire, flèche noire : l'expression de l'anticorps Ecadherine.

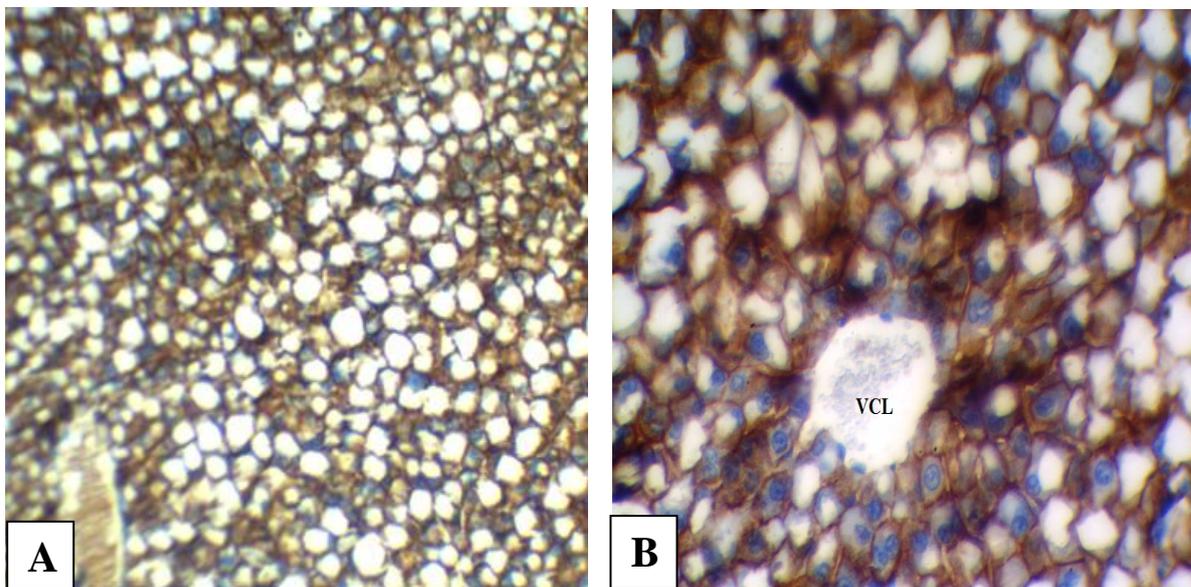


Figure 32 : Coupe immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* après 3mois de RHC marquée par l'anticorps monoclonal E cadherine. Observé au microscope photonique GX100 (A) et GX400 (B).VCL : veine Centro lobulaire.

I.2.2.3 Etude immunohistologique (E cadhérine) du foie de *Psammomys obesus* après 6 mois de RHC

La coupe immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* après 6 mois de RHC marquée par l'anticorps monoclonal E cadhérine. Observation au microscope photonique GX100. Le parenchyme hépatique montrant l'espace porte et canal biliaire, une très forte révélation d'anticorps E cadhérine au niveau de l'épithélium de canal biliaire est observée et un marquage plus ou moins intense entre les hépatocytes ce qui reflète une fragilité des molécules d'adhésion entre les hépatocytes qui est due probablement à la présence de la fibrose, fibres de collagène colorées en bleu qui forme une armature autour des hépatocytes : nous suggérons à ce stade début de passage de la stéatohépatite vers une cirrhose (**Fig.33 A**).

La coupe immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* après 6 mois de RHC marquée par l'anticorps monoclonal E-cadhérine. Observation au microscope photonique GX400 (B). Montrant le détail de la fibrose au niveau du canal biliaire, on observe une faible expression d'anticorps E-cadhérine due probablement à la présence de la fibrose autour des hépatocytes (**Fig.33 B**).

I.2.2.4 Etude immunohistologique (E cadhérine) du foie de *Psammomys obesus* après 9 mois de RHC

La coupe immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* après 9 mois de RHC marquée par l'anticorps monoclonal E cadhérine. Observation au microscope photonique GX100. Montrant une révélation négative du marquage d'anticorps E cadhérine qui reflète l'absence des adhésions cellulaires ce qui explique l'altération complète du tissu hépatique et on peut dire que c'est le stade d'installation d'une cirrhose (**Fig.34 A**). La coupe immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* après 9 mois de RHC marquée par l'anticorps monoclonal E cadhérine. Observation au microscope photonique GX100. Détail au niveau de la veine Centro lobulaire dont on observe une absence totale du marquage d'anticorps Ecadhérine (**Fig.34 B**).

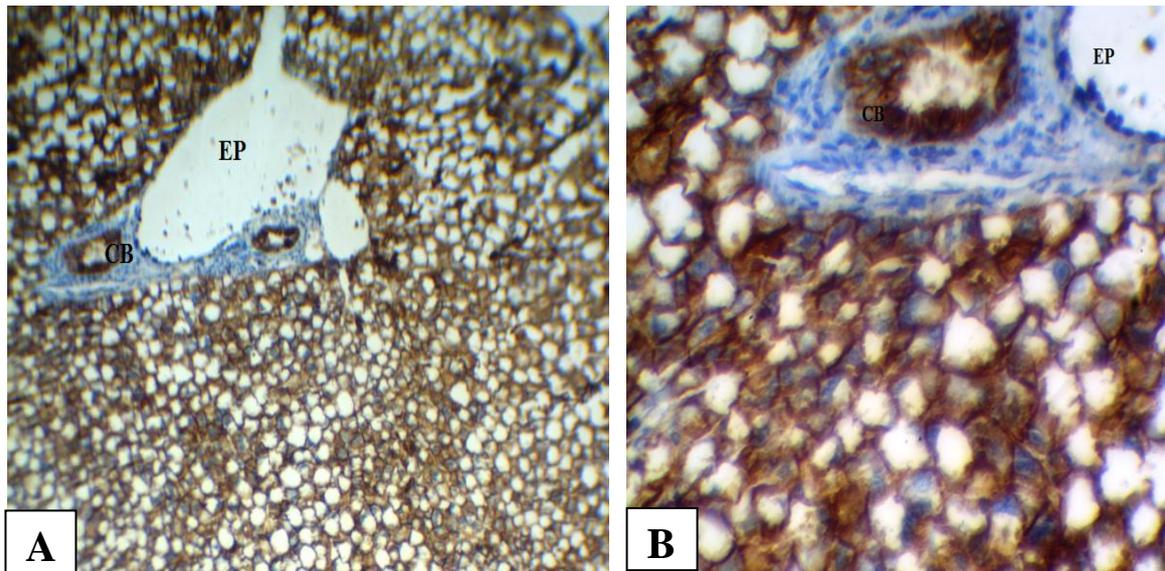


Figure 33 : Coupe immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* après 6mois de RHC marquée par l'anticorps monoclonal E cadherine. Observé au microscope photonique X100 (scale bar = 100 µm) (A) et X400 (scale bar=50 µm) (B).EP : espace porte, CB : canal biliaire.

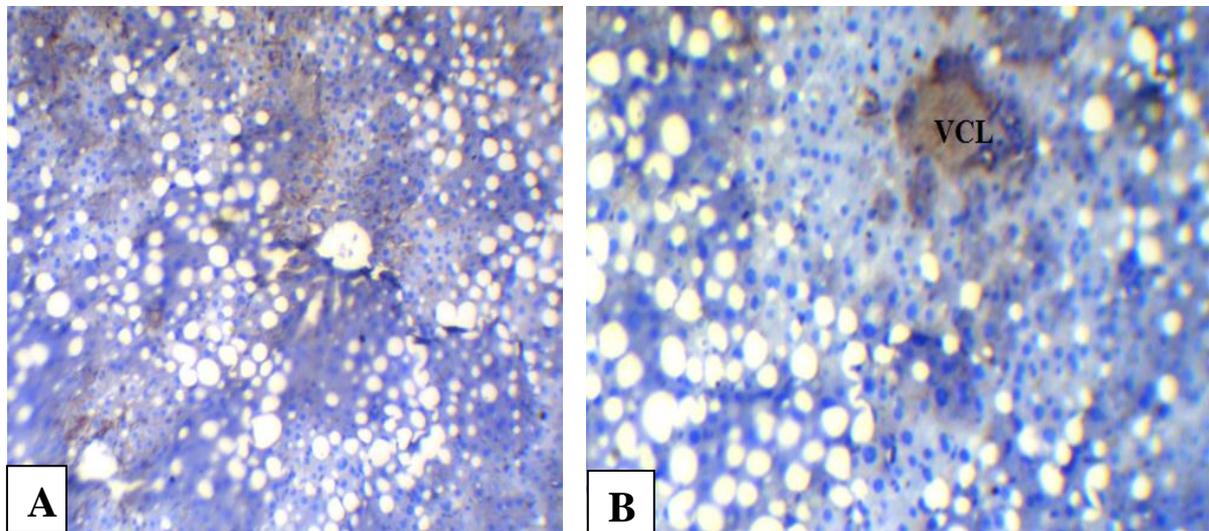


Figure 34 : Coupe immunohistologique du foie de *Psammomys obesus* après 3mois de RHC marquée par l'anticorps monoclonal E cadherine. Observé au microscope photonique X100 (scale bar = 100 µm) (A, B).VCL : veine Centro lobulaire.

III.2 Discussion

Le foie joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Au cours du DT2, des altérations du métabolisme glucido-lipidiques sont observées à son niveau au cours, avec en particulier une augmentation de la production du glucose et de la synthèse des acides gras, l'ensemble aggravant la résistance périphérique à l'insuline (**Postic, 2004**).

De nombreux modèles d'animaux de résistance à l'insuline et de diabète de type 2 sont utilisés pour l'étude du mécanisme de ces phénomènes et pour une meilleure compréhension des complications du diabète dans les populations humaines. Dans notre étude nous avons utilisé un modèle animal déserticole *Psammomys obesus*. Ce modèle animal présente un intérêt particulier, en effet, quand il est soumis au régime standard de laboratoire qui s'avère un RHC pour cet animal, il développe un syndrome diabétique et des lésions hépatiques comparables aux complications de DT 2 humain. Cette étude nous a permis d'analyser, dans un ordre chronologique, l'apparition du diabète type 2, les altérations métaboliques, moléculaires et histopathologiques hépatiques associées au passage NAFLD / NASH chez *P. obesus*.

Notre étude montre que lorsque *P.obesus* est soumis à un régime riche en calories, il développe une obésité associée à une hyperglycémie. De plus, les animaux obèses présentaient une hyperinsulinémie et une dyslipidémie, tous des composantes du syndrome métabolique humain. Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Sahraoui et al (2020)** ; **Ghennai et al (2019)** et **Ousmaal et al (2017)** qui ont montré que lorsque la gerbille *P.obesus* est soumis à un RHC, développe un diabète, une dyslipidémie et une obésité expliqués par l'augmentation significative des taux plasmatiques de glucose et de lipides, y compris les triglycérides, le cholestérol total avec une diminution significative de taux de l'insuline à la fin de l'expérimentation.

Nous avons mesuré le taux de glucose dans le sang des groupes témoins et des expérimentaux nourris par RHC. Les résultats montraient que *P.obesus* expérimentaux ont maintenues une hyperglycémie et une hyperinsulinémie du 3^{ème} mois du RHC jusqu'à la fin de l'étude, nos résultats sont en accord avec les travaux de **Benlarbi-Ben Khedher et al (2019)** qui ont montrés que les rats de sable soumis au RHC sont considérés comme diabétique à partir du 3^{ème} mois de l'expérimentation.

Selon **Waqas et al. (2017)**, le désordre métabolique est défini comme « un trouble métabolique caractérisé par une hyperglycémie qui dans le type 2 résulte d'une résistance à l'insuline et une carence relative en insuline. D'après **Goyal et al. (2020)**, le DT2 est le plus souvent observé en raison des niveaux croissants d'obésité et des régimes alimentaires riches en énergie, le DT2 est un état de résistance à l'insuline associé à un dysfonctionnement des cellules bêta. En effet, initialement, il y a une augmentation compensatoire de la sécrétion d'insuline, qui maintient les niveaux de glucose dans la plage normale et au fur et à mesure que la maladie progresse, les cellules bêta changent et la sécrétion d'insuline est incapable de maintenir l'homéostasie du glucose, produisant une hyperglycémie. L'hyperinsulinémie chronique qui accompagne de la résistance à l'insuline (avant l'insuffisance de la cellule bêta)

pourrait être responsable d'une grande partie de la pathologie du syndrome métabolique par une « hyperactivation » constante des récepteurs de l'insuline et de l'IGF-1 (**Beale, 2013**).

D'après **Samuel et Shulman (2016)**, chez les rats nourris avec de la graisse, l'augmentation de la teneur hépatique en DAG active la PKC ϵ , la principale isoforme de la PKC dans le foie, ces changements sont associés à une diminution de l'activation de l'IRTK. Donc l'activation induite du DAG de PKC ϵ altère la signalisation de l'insuline hépatique, contraignant la synthèse de glycogène hépatique stimulée par l'insuline. La synthèse lipidique hépatique se poursuit sans relâche. Dans certaines circonstances, la stéatose hépatique apparaît dissociée de la résistance hépatique à l'insuline. En effet, la diminution de l'expression de l'identification comparative du gène-58 (CGI-58), un activateur du triglycéride lipase adipeuse (ATGL), a entraîné une stéatose hépatique marquée et une augmentation de la teneur totale en DAG sans résistance hépatique à l'insuline. Cependant, la perte de CGI-58 a modifié la distribution subcellulaire de DAG et de PKC ϵ ; spécifiquement, le knockdown de CGI-58 a empêché l'accumulation de DAG à la membrane plasmique, l'activation de PKC ϵ et les altérations associées de l'action hépatique de l'insuline.

Selon **Bugianesi et al. (2005)**, l'expression phénotypique de l'IR (insulinorésistance) dépend d'un trait génétiquement déterminé et de conditions environnementales, La suralimentation et l'obésité, en particulier l'obésité viscérale, sont les causes environnementales les plus importantes de la RI. Les anomalies de l'absorption cellulaire du glucose semblent résulter de défauts de la signalisation intracellulaire. Plusieurs facteurs tels que l'hyperinsulinémie, l'hyperglycémie, le facteur de nécrose tumorale, les acides gras libres et la liaison à l'insuline favorise l'autophosphorylation du récepteur et la phosphorylation subséquente de la tyrosine des protéines IRS (IRS-1 et IRS-2), ce qui déclenche une cascade d'événements conduisant finalement à la translocation d'un transporteur de glucose spécifique le transporteur de glucose 4 - de son pool intracellulaire à la membrane cellulaire. Le transporteur de glucose 4 facilite le transport du glucose le long du gradient de concentration de l'espace extracellulaire dans le cytoplasme. Les mécanismes responsables de l'IR peuvent impliquer soit des protéines de liaison à l'insuline (des protéines IRS), soit enfin le transporteur de glucose 4.

Selon **Jaafar et al.(2014)**, le diabète est notamment associé à l'obésité et la dyslipidémie, participe au développement de la stéatose hépatique et dans un deuxième temps, à la stéatose hépatite non alcoolique qui peut progresser vers la cirrhose voir un carcinome hépatocellulaire.

D'après nos résultats, les observations histopathologiques en microscope photonique, du foie des *P.obesus* témoins ont montré une importante similitude entre son parenchyme hépatique et celui de l'homme sain. En effet, le foie apparaît sous forme de lobules hépatiques séparés par l'Espace porte (EP) et au centre des lobules se trouvent la veine Centro lobulaire qui collecte le sang. Nous avons également, mis en évidence des travées de Remak sous forme de cordon cellulaire qui convergent vers la VCL et qu'ils sont séparés par les capillaires sinusoides. De divers types de cellules adjacentes aux hépatocytes, ont été bien visibles en microscopie photonique, elles sont organisées de façon complexe. De plus, les canalicules biliaires sont positionnés du côté apicale des

hépatocytes, et la circulation sanguine intra hépatique se fait à travers les espaces sinusoides formés par les cellules endothéliales.

Au 3ème mois du RHC, nos résultats ont montré l'apparition des lésions pathologiques hépatiques, ce qui reflète l'apparition des perturbations métaboliques qui peuvent être expliquées par une adaptation du métabolisme du glucose conduisant à un remodelage du parenchyme hépatique. Nos observations microscopiques du foie ont montré une accumulation des gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes (H). Ces résultats corroborent les résultats biochimiques et histopathologiques de **Juggi et Prathap (1979)** et les résultats histopathologiques de **Gluchowski et al. (2017)**. **D'autre part, Smith et al.(2011) ; Jornayvaz et al.(2010)** ont admis que l'accumulation de lipides au niveau des hépatocytes est due à un déséquilibre entre un afflux important d'acides gras par l'alimentation, la lipolyse des tissus graisseux et la lipogenèse hépatique, et une diminution de l'élimination et de l'oxydation des AG.

Selon **Ipsen et al. (2018)** la régulation de la lipogenèse de novo est complexe, mais largement contrôlée par deux facteurs de transcription clés : SREBP1c et ChREBP, l'oxydation des acides gras est contrôlée par le PPAR α et réduit les niveaux de graisse intrahépatique en utilisant les lipides comme source d'énergie, la lipogenèse de novo médiée par SREBP1c améliorée est une caractéristique clé de la NAFLD contribuant de manière significative à l'accumulation de lipides. Dans le même temps, ChREBP qui pourrait être hépatoprotectrice, semble être régulée négativement dans la NAFLD.

D'après notre étude, nos observations microscopiques des hépatocytes, au 3ème mois du RHC ont révélé, la présence des vacuoles lipidiques sous différentes tailles avec un noyau refoulé à la base. Ces résultats ont été confirmés par **Takahashi et Fukusato (2014)**. Ces derniers ont admis que la stéatose hépatocellulaire est classée en deux types : macrovésiculaire et microvésiculaire. Dans la stéatose macrovésiculaire, une seule grosse gouttelette de graisse ou de plus petites gouttelettes de graisse bien définies occupent le cytoplasme des hépatocytes, poussant le noyau vers la périphérie. Dans la stéatose microvésiculaire, le cytoplasme des hépatocytes est rempli de minuscules gouttelettes lipidiques et le noyau est situé au centre de la cellule.

A partir du 6^{ème} mois de notre expérimentation, nos observations microscopiques montraient l'apparition d'une inflammation portale et lobulaire avec la présence des neutrophiles et des lymphocytes avec clarification de certaines cellules hépatiques. Nos résultats ont en parfaite corrélation avec les résultats de **Takahashi et Fukusato (2014)** qui ont observé une inflammation intralobulaire sous forme d'infiltrat cellulaire inflammatoire mixte (lymphocytes, neutrophiles, éosinophiles et cellules de Kupffer). Les polymorphes entourent parfois les hépatocytes ballonnés cette lésion est appelée « satellitose ». Ces mêmes auteurs ont trouvés que l'inflammation portale chronique (plus que légère) a été associée à la quantité et à la localisation de la stéatose, du gonflement et de la fibrose avancée. Par conséquent, une inflammation portale chronique plus importante que légère dans la NAFLD non traitée pourrait être considérée comme un marqueur d'une maladie avancée. De plus, **Brown & Kleiner (2016)**, les caractéristiques histologiques de la NASH comprennent la

stéatose macrovésiculaire typique mais peut être composée d'un mélange de grandes et petites vacuoles, la dégénérescence des hépatocytes en ballon, l'inflammation dispersée (principalement lobulaire) et les corps apoptotiques.

Au 9^{ème} mois du RHC, l'infiltrat inflammatoire a été associé avec une désorganisation de l'architecteur histologique du parenchyme hépatique et une expansion de la fibrose. D'après **Jaafar et al. (2014)**, les cellules du foie perdent leurs délimitations cytoplasmiques ce qui induit leurs dégénérescence. Par conséquent, les réponses de réparation intra-hépatiques seront déclenchées par l'activation des macrophages résidents dans le foie, à savoir les cellules de Kupffer, par une exposition excessive aux lipides toxiques tels que DAG et céramides, conduisant à un changement de phénotype vers l'état M1 pro-inflammatoire. De plus, les cellules activées de Kupffer sécrètent non seulement des cytokines pro-inflammatoires excessives telles que le TNF α et l'interleukine-6 (IL-6) pour stimuler les réponses inflammatoires, mais favorisent également l'activation des cellules stellaires hépatiques, productrices de collagène, conduisant à la formation de tissu cicatriciel et à la fibrose subséquente. Par conséquent, une inflammation soutenue due à des réponses cicatricielles à la lipotoxicité favorise l'évolution de la stéatose vers une stéato-hépatite progressive (**Hu et al., 2017**). D'après **Hijona et al. (2010)**, le stress oxydatif active le ligand Fas et le facteur nucléaire kappa (NF-kappa β), respectivement, le premier provoque la dégénérescence et la mort des hépatocytes, le second stimule la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , TGF- β , IL-8). De plus, les produits finaux de la peroxydation lipidique ont des propriétés chimiotactiques, activant les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , TGF- β , IL-6, IL-8) et stimulant les cellules étoilées productrices de collagène hépatique. Le résultat final est une lésion mixte, appelée stéatohépatite, caractérisée par une dégénérescence et une nécrose des hépatocytes, un infiltrat inflammatoire et une fibrose, ainsi qu'une stéatose.

Dans notre étude, la coloration de trichrome de Masson mettant en évidence la localisation de collagène montre l'installation d'une fibrose à partir du 6^{ème} mois du RHC qui semble sévère et qui progresse et évolué vers une cirrhose au 9^{ème} mois du RHC. Dans ce contexte, d'après **Brown et Kleiner (2016)** le dépôt de collagène et d'autres protéines de la matrice extracellulaire le long des sinusoides autour des hépatocytes appelé la fibrose portale peut être observée à mesure que la gravité de la maladie augmente, et si elle n'est pas traitée, elle peut évoluer vers une fibrose et une cirrhose de pontage. Il convient de noter que dans certains cas de NASH liée à l'obésité et dans la NASH pédiatrique, seule la fibrose portale est présente. Comme la cirrhose est une découverte au stade terminal, les biopsies de la maladie à un stade avancé peuvent manquer de fibrose péricellulaire/péricellulaire et de signes de maladie active. En effet, selon **Hijona et al. (2010)**, ce n'est pas tous les patients présentant des facteurs de risque similaires (obésité, diabète, hyperlipidémie, etc.) développent de stéatose et ce n'est pas tous les patients atteints de stéatose simple développent les lésions caractéristiques de la stéatohépatite et tous les patients atteints de stéatohépatite n'atteignent pas le stade de la cirrhose. Pour cela Il a été suggéré que cette gamme de résultats peut dépendre de certains facteurs génétiquement déterminés, tels que le polymorphisme génétique dans les régions promotrices CYP2E1, TNF- α ou IL-10. Dans la NAFLD, ces facteurs

généétiques sont inconnus, mais il a été suggéré que le développement de la stéatose pourrait dépendre de l'apparition d'altérations dans les gènes impliqués dans la résistance à l'insuline, ou dans les protéines codantes impliquées dans le métabolisme hépatique des lipides.

Notre étude immunohistochimique par le marquage de l'anticorps anti CD3 a montré un faible marquage voire absent chez les *P.obesus* témoins qui reflète l'absence des lymphocytes T par contre, nous avons observé une augmentation d'intensité du marquage à partir du 3^{ème} mois jusqu'au 9^{ème} mois du RHC chez les *P.obesus* expérimentaux au niveau de la veine Centro lobulaire ainsi qu'au niveau des capillaires sinusoides qui reflète la présence diffuse des lymphocytes T un signe d'une réponse immunitaire sévère. Dans ce contexte, **Tajiri et al. (2009)** ont évalué des échantillons de biopsie hépatique de patients atteints de NAFLD et effectué une cytométrie en flux sur 20 des échantillons, sur ses 20 échantillons, ils ont constaté que chez les patients atteints de stéatose plus sévère, il y avait une augmentation des cellules CD3+/CD56+ NKT. D'autre part, **DeVito et al.(2012)**, ont signalé une diminution du nombre de cellules inflammatoires CD3 + chez les enfants avec NASH. Des études sur des modèles animaux de NAFLD / NASH ont montré que l'activité des macrophages du foie (cellule de Kupffer) joue un rôle déclencheur important dans le développement de la maladie (**Svendson et al., 2017**).

Selon **Ilan et al. (2018)**, les cellules T reconnaissent les antigènes via le récepteur des cellules T (TCR), qui est associé à la molécule CD3. Le complexe CD3/TCR est présent à la surface de toutes les cellules T et est impliqué dans la reconnaissance des antigènes et la transduction du signal. Alors que les chaînes TCR sont sujettes à un réarrangement génique et sont variables, les chaînes CD3 sont invariables et ne sont pas spécifiques de l'antigène.

Dans notre étude, l'examen immunohistologique d'anticorps anti Ecadhérine a montré une expression homogène et très intense entre les hépatocytes chez *P.obesus* témoins qui reflète la présence des adhérences homologues de type cellule-cellule. Par contre chez les *P.obesus* soumises au RHC et à partir du 3^{ème} mois du RHC, une diminution du marquage significative est observée voir une absence totale au 9^{ème} mois du RHC. Ces résultats sont en d'accord avec les résultats de **Urushima et al. (2020)**, qui a montré que l'immunocoloration de la E-cadhérine a été confirmée aux jonctions adhérentes entre les hépatocytes et les CSH ainsi qu'aux jonctions adhérentes hépatocyte-hépatocyte. De même, les travaux de **Wang et al. (2014)** ont démontré que L'expression de la E-cadhérine était localisée sur la membrane des cellules du carcinome hépatocellulaire (CHC), ainsi que sur la membrane des hépatocytes et des endothéliocytes des voies biliaires. D'autre part, ces mêmes auteurs ont montré qu'une expression réduite de l'E-cadhérine était associée à l'infiltration de macrophages dans les tissus du carcinome hépatocellulaire(CHC).

Selon **Tian et al.(2011)** la fibrose est un processus biosynthétique de matrice extracellulaire active (MEC) et représente la voie finale de défaillance chronique de nombreux organes. La régulation négative de l'E-cadhérine responsable de la perte d'adhésion cellule-cellule et la régulation négative de la β -caténine sont deux changements importants dans le processus de fibrose.

Des travaux récents de **Fan et al. (2019)** ont démontré que les fonctions biologiques complètes de la E-cadhérine ont été en partie attribuées à l'interaction entre la E-cadhérine et

plusieurs voies de signalisation, telles que la voie Wnt/ β -caténine, la voie PI3K/AKT, la voie hippopotame et la voie de signalisation NF κ B. Selon ces derniers auteurs, d'après des études sur divers cancers ont documenté la relation complexe entre la signalisation de la β -caténine et l'adhésion cellule-cellule médiée par l'E-cadhérine, la signalisation nucléaire de la β -caténine joue un rôle central dans le cancer humain, y compris le CHC. Une réduction des niveaux de cadhérine peut libérer de la β -caténine liée à la surface cellulaire.

Au cours de la malignité, l'adhésion cellule-cellule médiée par l'E-cadhérine est perdue, et ce processus peut être inversé lorsque l'E-cadhérine est rétablie. De nombreux facteurs peuvent entraîner une perte d'E-cadhérine. Certaines des mutations germinales associées au cancer ont été signalées comme interférant avec l'expression et la fonction de la cadhérine. De plus, dans de nombreuses tumeurs malignes épithéliales comme l'œsophage, le mélanome et le carcinome hépatocellulaire, l'expression de l'E-cadhérine est diminuée par l'hyper méthylation du promoteur. **(Yu et al., 2019).**

Les types de mutations du CDH1 gène qui code pour l'E-cadhérine consistent principalement en des mutations au site d'épissage et des mutations tronquées qui sont causées par des insertions, des délétions et des mutations non-sens. **(Fan et al., 2019).**

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

La stéatopathie métabolique ou NAFLD semble être fréquemment associée au diabète de type 2 à la dyslipidémie et à l'obésité. C'est une entité clinique importante à identifier en raison de la prévalence croissante.

L'utilisation d'un modèle murin « *Psammomys obesus* » représente un approche expérimental *in vivo* très objective pour suivre la chronologie de l'évolution cellulaire et moléculaire de la NAFLD en NASH à savoir la connaissance des interactions des facteurs inducteurs pour mieux cibler les processus de la physiopathologie.

L'expression de CD3 et E-cadhérine sont en corrélation inverse ce qui signifie la part relative de l'inflammation avec le dysfonctionnement de certaine jonction intercellulaire au niveau du tissu hépatique.

Les traitements médicamenteux actuels ne possèdent qu'une efficacité modeste et les mesures hygiéno- diététiques sont à privilégier.

Références bibliographiques

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdel-Misih, S. R., & Bloomston, M. (2010). Liver anatomy. *Surgical Clinics*, 90(4), 643-653. doi: 10.1016/j.suc.2010.04.017

Alberti, K. G., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., Fruchart, J. C., James, W. P., Loria, C. M., Smith, S. C., Jr., International Diabetes Federation Task Force on, E., Prevention, National Heart, L., Blood, I., American Heart, A., World Heart, F., International Atherosclerosis, S., and International Association for the Study of, O. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*, 120(16), 1640-1645.

Aydin, M., & Akcali, K. C. (2018). Liver fibrosis. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 29(1), 14-21.

Beale E. G. (2013). Insulin signaling and insulin resistance. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*, 61(1), 11–14.

Benlarbi-Ben Khedher, M., Hajri, K., Dellaa, A., Baccouche, B., Hammoum, I., Boudhrioua-Mihoubi, N., Dhifi, W., & Ben Chaouacha-Chekir, R. (2019). Astaxanthin inhibits aldose reductase activity in *Psammomys obesus*, a model of type 2 diabetes and diabetic retinopathy. *Food science & nutrition*, 7(12), 3979–3985.

Blaner, W. S. et al. Hepatic Stellate Cell Lipid Droplets: A Specialized Lipid Droplet for Retinoid Storage. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 467 (2009).

Bohlen G (2003) Special circulations. In: Lippincott Williams & Wilkins, editor. *Medical physiology*

Brown, G. T., & Kleiner, D. E. (2016). Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism: clinical and experimental*, 65(8), 1080–1086.

Bugianesi, E., McCullough, A. J., & Marchesini, G. (2005). Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 42(5), 987–1000.

Capeau, J. (2003). Voies de signalisation de l'insuline: mécanismes affectés dans l'insulino-résistance. *M/S : médecine sciences*, 19(8-9), 834–839.

- Couvelard, A., Scoazec, J.Y., Feldmann, G. (1993). Expression of cell-cell and cell-matrix adhesion proteins by sinusoidal endothelial cells in the normal and cirrhotic human liver. *Am. J. Pathol*, 143, 738-52 .
- Desmet, V. J. (1994) *The liver biology and pathobiology*. Third Edition, 1216.
- Dixon, L. J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M. T., Nagy, L. E. (2013). Kupffer Cells in the Liver. *Compr. Physiol*, 3(2), 785–797.
- Fabienne, F., Bronwyn, H., Alexandre, B., Hainault, I., Pascale, F. (2005). Un nouveau rôle de l'insuline dans la régulation du métabolisme glucido-lipidique hépatique. *Med. Sci. (Paris)*, 21(6-7), 569-571.
- Friedman, S. L. (2008). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol. Rev*, 88, 125-72.
- Ganter P., Jollés G. (1970). *Histologie Normale et Pathologique*. Edition Gauthier-Villars. Paris. Vol. 1-2.
- Ghennai, A., Koceir, E.H.A., Boudierba, S. (2019). Insulinorésistance et inflammation : effets de la spiruline en prévention primaire chez *Psammomys obesus*. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 33(1), 78-79.
- Gluchowski, N. L., Becuwe, M., Walther, T. C., & Farese, R. V., Jr (2017). Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 14(6), 343–355.
- Goldblatt, P.J., Gunning, W.T 3rd. (1984). Ultrastructure of the liver and biliary tract in health and disease. *Ann. Clin. Lab. Sci*, 14(2), 159-67.
- Goldner J. (1938). A modification of the masson trichrome technique for routine laboratory purposes. *The American journal of pathology*, 14(2), 237–243.
- Goyal R, Jialal I. Diabetes Mellitus Type 2. (20 Nov 2020). In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan.
- Grenier-Larouche, T., Carreau, A. M., & Carpentier, A. C. (2017). Early Metabolic Improvement After Bariatric Surgery: The First Steps Toward Remission of Type 2 Diabetes. *Canadian journal of diabetes*, 41(4), 418–425.
- Grundy, S.M. (2016). Metabolic syndrome update. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 26(4), 364-373.
- Han, T.S., & Lean, M.E.J. (2015). Metabolic Syndrome. *Medicine*, 43(2), 80-87.
- Hijona, E., Hijona, L., Arenas, J. I., & Bujanda, L. (2010). Inflammatory mediators of hepatic steatosis. *Mediators of inflammation*, 2010, 837419.

- Hu, M., Phan, F., Bourron, O., Ferré, P., & Foufelle, F. (2017). Steatosis and NASH in type 2 diabetes. *Biochimie*. doi: 10.1016/j.biochi.2017.10.019
- Huang, X., Liu, G., Guo, J., & Su, Z. (2018). The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *International Journal of Biological Sciences*, 14(11), 1483-1496.
- Ilan, Y., Shailubhai, K., & Sanyal, A. (2018). Immunotherapy with oral administration of humanized anti-CD3 monoclonal antibody: A novel gut-immune system-based therapy for metaflammation and NASH. *Clinical & Experimental Immunology*.
- Ipsen, D. H., Lykkesfeldt, J., & Tveden-Nyborg, P. (2018). Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 75(18), 3313–3327.
- Jaafar Jaafar, B. & Jornayvaz, F. P. (2014). Maladies hépatiques chroniques et diabète. *Rev. Med. Suisse*, 10, 1254-60.
- Jornayvaz, F. R., Jurczak, M. J., Lee, H. Y., Birkenfeld, A. L., Frederick, D. W., Zhang, D., Zhang, X.M., Samuel, V.T. and Shulman, G. I. (2010). A high-fat, ketogenic diet causes hepatic insulin resistance in mice, despite increasing energy expenditure and preventing weight gain. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 299(5), 808-815.
- Ju, C., & Tacke, F. (2016). Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: from pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Cellular & molecular immunology*, 13(3), 316. doi:10.1038/cmi.2015.104
- Juggi, J. S., & Prathap, K. (1979). Lipid accumulation in the rat liver: a histological and biochemical study. *Cytobios*, 24(94), 117–134.
- Kahou Bi, G. P., Claude Abo, K. J., & Irie Bi, J. S. (2016). Effet D'un Extrait Aqueux De *Pseudarthria Hookeri* Wight & Arn. (Fabaceae) Sur La Glycemie Et Sur La Liberation Et Le Stockage Du Glucose Hepatique De Rats Diabetiques. *European Scientific Journal, ESJ*, 12(6), 37.
- Kalem K. (2013). *Précis d'anatomie pathologique du laborantin*. Office des publications universitaires. Édition : 3.01.5410. P73-89.
- Klezovitch, O., & Vasioukhin, V. (2015). Cadherin signaling: keeping cells in touch. *F1000Research*, 4(F1000 Faculty Rev), 550.
- Klezovitch, O., & Vasioukhin, V. (2015). Cadherin signaling: keeping cells in touch. *F1000Research*, 4(F1000 Faculty Rev), 550.
- Kořínková, L., Pražienková, V., Černá, L., Karnošová, A., Železná, B., Kuneš, J. & Maletínská, L. (2020). Pathophysiology of NALFD and NASH in Experimental Models: The Role of Food Intake Regulating Peptides. *Frontiers in Endocrinology*, 11.

- Lanthier N. (2020). Les nouveaux traitements de la stéatohépatite non-alcoolique [New therapies in non-alcoholic steatohepatitis]. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 34(3), 216–222.
- LeCluyse, E.L., Witek, R.P., Andersen, M.E., & Powers, M.J. (2012) Organotypic liver culture models: Meeting current challenges in toxicity testing. *Critical Reviews in Toxicology* 42(6), 501–548.
- Lo, R. C., & Kim, H. (2017). Histopathological evaluation of Liver fibrosis and cirrhosis regression. *Clinical and Molecular Hepatology*, 23(4), 302-307.
- Luo, G., Huang, D., Tao, R. & Chen, J. (2016). The role of E-cadherin - 160C/A polymorphism in breast cancer. *Open Life Sciences*, 11(1), 110-115.
- Maitre, M., Blicklé, J.-F. (2008). *Metabolisme hépatique*. EMC-Hépatologie, 3(1), 1-16
- Manne, V., Handa, P., & Kowdley, K. v. (2018). Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clinics in Liver Disease*, 22(1), 23-37.
- Marra, F., Gastaldelli, A., Baroni, G. S., Tell, G., & Tiribelli, C. (2008). Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends in molecular medicine*, 14(2), 72-81.
- Martinez-Esparza, M. (2015). Inflammatory status in human hepatic cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology*, 21(41), 11522.
- McCormick, P. A., & Jalan, R. (2018). Hepatic Cirrhosis. *Sherlock's Diseases of the Liver and Biliary System*, 107-126.
- McCracken, E., Monaghan, M., & Sreenivasan, S. (2018) Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clinics in Dermatology*, 36(1), 14-20.
- Mendonsa, A. M., Na, T. Y., & Gumbiner, B. M. (2018). E-cadherin in contact inhibition and cancer. *Oncogene*, 37(35), 4769–4780.
- Mezale, D., Strumfa, I., Vanags, A., Mezals, M., Fridrihsone, I., Strumfs, B., & Balodis, D. (2017). Non-Alcoholic Steatohepatitis, Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma: The Molecular Pathways. In *Liver Cirrhosis-Update and Current Challenges*.
- Miller, A. M., Wang, H., Bertola, A., Park, O., Horiguchi, N., Hwan Ki, S., ... Gao, B. (2011). Inflammation-associated interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 activation ameliorates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in interleukin-10-deficient mice. *Hepatology*, 54(3), 846-856.
- Ministrini, S., Monteuo, F., Sahebkar, A., & Carbone, F. (2020). Macrophage in the pathophysiology of NAFLD: the role of sex differences. *European Journal of Clinical Investigation*, e13236.

- Ousmaal. M.E.F, Martinez. M.D.C, Andriantsitohaina. R, Kecekoul. L, Khen. M.A, Mameri. S, Baz. A. (2017) .Analyse du stress oxydant et évaluation des atteintes structurales et ultrastructurales au niveau des vaisseaux sanguins de Psammomys obesus dyslipidémique, *Annales d'Endocrinologie*,78(4), 299-300.
- Patton, K.T. & Thibodeau, G.A. (2014) *Mosby's Handbook of Anatomy & Physiology*, Elsevier Health Sciences.
- Pećina-Šlaus, N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int* 3, 17 (2003).
- Petersen,M.C., & Shulman,G.I.(2018).Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance.*Physiological Reviews*,98(4),2133-2223.
- Postic, C., Dentin, & R., Girard, J. (2004).Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes. Metab*, 30, 398-408.
- Rochlani, Y.,Pothineni,N.V.,Kovelamudi,S. ,&Mehta,J.L.(2017).Metabolic Syndrome :pathophysiology,management, and modulation by natural compounds.*Therapeutic Advances in cardiovascular Diseases*, 11(8),215-225.
- Roden,M., & Bernroider,E.(2003).Hepatic glucose metabolism in humans- its role in health and disease.*Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*,17(3),365-383.
- Rui,L.(2014).Energy Metabolism in the Liver.*Comprehensive Physiology*,177-197.
- Sahraoui, A., Dewachter, C., Vegh, G., Mc Entee, K., Naeije, R., Bouguerra, S. A., & Dewachter, L. (2020). High fat diet altered cardiac metabolic gene profile in Psammomys obesus gerbils. *Lipids in health and disease*, 19(1), 123.
- Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2016). The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *The Journal of clinical investigation*, 126(1), 12–22.
- Sendensky,A., &Dufour,J.-F.(2010).Liver Physiology.*Chronic Liver Failure*,33-45.
- Sharabi,K.,Tavares,C.D.J.,Rines,A.K., &Puisgsever,P.(2015).Molecular pathophysiology of hepatic glucose production.*Molecular Aspects of Medicine*,46,21-33.
- Sherlock, S., & Dooley, J. (1997). *Diseases of the liver and biliary system*. Vol.Tenth Edition. 681.gy. . pp. 276-289.
- Smith, B. W., & Adams, L. A. (2011). Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus: pathogenesis and treatment. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(8), 456.
- Sutti J.S, Jindal. A, Locatelli .I, Vacchiano. M, Gigliotti .L, Bozzola. C, Albano.A, (2014). Adaptive Immune Responses Triggered by Oxidative Stress Contribute to Hepatic Inflammation in NASH, *Hepatology* 59 (3): 886–897

Syn WK, Oo YH, Pereira TA, Karaca GF, Jung Y, Omenetti A, Witek RP, Choi SS, Guy CD, Fearing CM, et al. Accumulation of natural killer T cells in progressive nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010;51:1998–2007.

Tajiri K, Shimizu Y, Tsuneyama K, Sugiyama T. Role of liver-infiltrating CD3+CD56+ natural killer T cells in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009;21:673–680.

Takahashi, Y., & Fukusato, T. (2014). Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World journal of gastroenterology*, 20(42), 15539–15548.

Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. *Liver*. *Curr Biol*. 2017 Nov 6;27(21):R1147-R1151 (2017).

Tso P, McGill J (2003) The physiology of the liver. In: Lippincott Williams & Wilkins, editor. *Medical physiology*. . pp. 514-525.

Urushima,H.,Yuasa,H., Matsubara,T.,Kuroda,N.,Hara,Y.,Inoue,K., ...Ikeda,K. (2020).Activation of Hepatic Stellate cells Requires Dissociation of E-cadhrin-Containing Adherens Junctions with Hepatocytes. *The American Journal of Pathology*.

Wagner, R., Heni, M., Tabák, A.G. et al. Pathophysiology-based subphenotyping of individuals at elevated risk for type 2 diabetes. *Nat Med* 27, 49–57 (2021).

Walter J, & Burdelski M, Bröring DC (2008) Chances and risks in living donor liver transplantation. *Dtsch Arztebl Int* 105: 101-107.

Waqas Sami, Tahir Ansari, Nadeem Shafique Butt, Mohd Rashid Ab Hamid *Int J Health Sci (Qassim)* 2017 Apr-Jun; 11(2): 65–71.

Yu W, Yang L, Li T and Zhang Y (2019) Cadherin Signaling in Cancer: Its Functions and Role as a Therapeutic Target. *Front. Oncol*. 9:989.

Annexes

Annexe 01

Tableau I : Définition du syndrome métabolique

OMS 1999	EGIR 1999	FID 2005	NCEP ATP III 2001
CONDITION OBLIGATOIRE			
Intolérance au glucose ou insulino-résistance ou diabète de type 2	Hyper insulinémie (non diabétique)	Obésité abdominale	Aucune
+ 2 parmi			3 parmi
OBESITE			
IMC > 30 kg/m ² ou T/H : > 0,9 (H) et 0,85 (F)	Tour de taille : ≥ 94 cm (H) ≥ 80 cm (F)	Condition obligatoire (tour de taille selon origine ethnique et sexe)	Tour de taille : ≥ 102 cm (H) ≥ 88 cm (F)
HYPERTENSION ARTERIELLE			
Pression artérielle ≥ 140/90mmHg ou traitement	Pression artérielle ≥ 140/90mmHg ou traitement	Pression artérielle Systolique ≥ 130 mmHg Diastolique ≥ 85mmHg ou traitement	Pression artérielle ≥ 130/85mmHg ou traitement
DYSLIPIDEMIE			
HDL-C < 0,9 mmol/l (H) < 1 mmol/l (F) ou TG > 1,7 mmol/l	HDL-C < 1 mmol/l ou TG > 2 mmol/l	HDL-C < 1,3 mmol/l (H) < 1,29 mmol/l (F) ou traitement Et TG > 1,7 mmol/l ou traitement	HDL-C < 1,3 mmol/l (H) < 1,29 mmol/l (F) Et TG > 1,7 mmol/l
AUTRES			
MICROALBUMINURIE Taux d'excrétion urinaire > 20µg/min ou albumine/créatine >30mg/g	HYPERGLYCEMIE à jeun ≥ 110 mg/dl	HYPERGLYCEMIE à jeun ≥ 100 mg/dl ou diabète de type 2	HYPERGLYCEMIE à jeun ≥ 110 mg/dl

Les abréviations : OMS = Organisation Mondiale de la Santé; EGIR = European Group for the Study of InsulinResistance; NCEPATP III= National Cholesterol Education Program ThirdAdultTreatment Panel; FID = FédérationInternationale du Diabète, H = Homme, F= Femme; HDL -C = High DensityLipoprotein-Cholestérol; TG = Triglycérides.

Tableau II : Matériel utilisé

Verreries et petit matériel	Equipement et appareillages
Bécher	Balance
Eprouvette graduée	Réfrigérateur
Seringue	Automate de circulation « Leica »
Spatule	Plaque refroidissante « Leica »
Tube à essai	Microtome « Leica »
Verre de montre	Bain marie
Micropipette	Etuve « NUVE »
Cage	Appareil d'enrobage « Leica »
Pince	Plaque chauffante « Leica »
Panier porte lame	Appareil de coloration de routine (Hématoxyline-Eosine) « DAKO coverStainer »
Moules en métal	Hotte aspirante pour le montage « Labopur »
	PT link « DAKO »
	Appareil d'immunohistochimie automatique « VENTANA »
	Appareil automatique de coloration spéciale
	Chambre humide

Tableau III : Composition centésimale des régimes alimentaires, naturels et hypercaloriques (Sihali-Beloui 2016 & 2019).

Régime naturel (RN)		Régime hypercalorique (RHC)	
Composition	Valeurs (%)	Composition	Valeurs (%)
Eau	80.79	Eau	9
Matière minérale	6.86	Matière minérale	7.1
Matière grasse	0.40	Matière grasse	7.5
Matière protéique	3.53	Matière protéique	25
Hydrate de carbone	8.42	Sucres totaux	47.4
Sucres totaux	0.18	Indéterminé	0
Hémicellulose	2.62	Cellulose	4
Cellulose	2.23		
Lignine	1.12		
Indéterminé	2.27		

Tableau IV : Valeurs moyennes des poids corporel (g) chez Psammomys obesus témoins et rendus diabétiques par un régime hypercalorique.

Périodes	0mois	3mois	6mois	9mois
Animaux				
Témoins (n= 24)	86,63	98,82	100,78	103,38
(régime naturel)	±1,37	±2,33	±3,34	± 4,46
Expérimentaux (n=38)	89,29	120,12	136,34	106,12
(régime hypercalorique)	±1,45	±5,92***	±5,24****	±6,35 *

p < 0.05 peu significatif *p < 0.01 très significatif ****p < 0.001 hautement significatif.*

Tableau V: Valeurs moyennes du glucose sanguin (g/l) chez les rats de sable témoins et expérimentaux.

Périodes	0mois	3mois	6mois	9mois
Valeurs moyennes du glucose (g/l)				
Témoins (n= 24)	0,61	0,73	0,74	0,75
	±0,041	±0,03	±0,02	±0,08
Expérimentaux (n=38)	0,72	1,24	1,67	2,28
	±0,10	±0,11***	±0,22***	±0,26****

****p < 0.01 très significatif ****p < 0.001 hautement significatif.*

Tableau VI : Valeurs moyennes des triglycérides plasmatiques chez les rats de sable témoins et expérimentaux.

Périodes	0mois	3mois	6mois	9mois
Valeurs moyennes des triglycérides (g/l)				
Témoins (n= 24)	0,65 ±0,13	0,69 ±0,09	0,77 ±0,07	0,79 ±0,06
Expérimentaux (n=38)	0,76 ±0,21	2,04 ±0,32***	2,73 ±0,33***	3,12 ±0,22*****

*** $p < 0.01$ très significatif ***** $p < 0.001$ hautement significatif.

Tableau VII : Valeurs moyennes du cholestérol total plasmatiques chez Psammomys témoins et expérimentaux.

Périodes	0mois	3mois	6mois	9mois
Valeurs moyennes du cholestérol (g/l)				
Témoins (n= 24)	0,60 ±0,05	0,66 ±0,06	0,63 ±0,05	0,65 ±0,03
Expérimentaux (n=38)	0,61 ±0,04	1,37 ±0,19**	1,66 ±0,16***	2,25 ±0,15*****

** $p < 0.02$ significatif *** $p < 0.01$ très significatif ***** $p < 0.001$ hautement significatif.

Tableau VIII : Valeurs moyenne de l'insulinémie plasmatique chez Psammomys obesus témoins et expérimentaux.

Périodes	0mois	3mois	6mois	9mois
Valeurs moyennes de l'insuline (μUI/ml)				
Témoins (n= 24)	27,2 ±8,68	34,4 ±7,56	33 ±9,4	34,2 ±3,39
Expérimentaux (n=38)	28,33 ±6,63	281,66 ±40,77	378,5 ±40,36*****	106,66 ±10,66

*** $p < 0.01$ très significatif ***** $p < 0.001$ hautement significatif.

Annexe 02

Les colorations

A- T M

- Déparaffinage par passage de l'échantillon dans 2 bains de xylène d'environ 5 min chacun.
- Hydratation par passage dans 3 bains d'alcool de concentration décroissante (100°,90°,70°), pendant 5 min pour chaque bain. Dans le but de retirer le xylène et de le remplacer par de l'eau.
- Rinçage par l'eau distillée pendant 3min.
- Coloration à l'Hématoxyline pendant 1min.
- Rinçage par l'eau courante pendant 5min.
- Rinçage par l'eau distillée pendant 4min.
- Coloration à FuschinePonceau pendant 20s.
- Rinçage par l'eau acétifiée pendant 4min.
- Coloration à l'Orange G pendant 15s.
- Rinçage par l'eau acétifiée pendant 10min.
- Coloration à Vert lumière pendant 25s.
- Rinçage par l'eau acétifiée pendant 7min.
- Déshydratation par passage dans 3 bains d'alcool de concentration croissante (70° ,90° ,100°) pendant 1min chacun.
- Eclaircissement par passage dans un bain de xylène pendant 1min.
- Montage sur lame à l'aide de milieu synthétique Eukitt.



B- HE

- Déparaffinage par passage de l'échantillon dans 2 bains de xylène d'environ 5 min chacun.
- Hydratation par passage dans 3 bains d'alcool de concentration décroissante (100°,90°,70°), pendant 3 min pour chaque bain. Dans le but de retirer le xylène et de le remplacer par de l'eau.
- Rinçage par l'eau distillée (pendant 3min).
- Coloration à l'hématoxyline (pendant 2min).
- Rinçage par l'eau courante (pendant 5min).
- Rinçage par l'eau distillée (pendant 3min).
- Coloration à l'éosine (pendant 30s).
- Rinçage par l'eau acétifiée pendant 3min.
- Déshydratation par passage dans l'alcool à 70° puis 90° puis 100° (pendant 3min chacun).
- Eclaircissement par passage dans 2 bains de xylène de 5min chacun.
- Montage sur lame à l'aide de milieu synthétique Eukitt.

C- PAS

- Déparaffinage par passage de l'échantillon dans 2 bains de xylène d'environ 5 min chacun.
- Hydratation par passage dans 3 bains d'alcool de concentration décroissante (100°,90°,70°), pendant 5 min pour chaque bain. Dans le but de retirer le xylène et de le remplacer par de l'eau.
- Rinçage par l'eau distillée pendant 3min.
- Passage dans l'acide périodique pendant 10min.
- Rinçage par l'eau courante pendant 10min.
- Rinçage rapide par l'eau distillée.
- Passage par réactif de Schiff pendant 20min à l'obscurité.

- Rinçage par l'eau distillée pendant 5min.
- Rinçage par l'eau courante pendant 10min.
- Contre coloration par l'Hématoxyline pendant 30s.
- Rinçage par l'eau courante pendant 3min.
- Déshydratation par passage dans l'alcool à 70°, 90° puis 100° (pendant 5min chacun).
- Eclaircissement par passage dans 2 bains de xylène de 5min chacun.
- Montage sur lame à l'aide de milieu synthétique Eukitt.

Les méthodes biochimiques

A- Méthode GOD-POD : La glucose oxydase (GOD) oxyde le glucose en acide gluconique et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). L'enzyme peroxydase (POD) agit sur le peroxyde d'hydrogène pour libérer l'oxygène naissant (O₂), puis l'oxygène naissant se couple avec la 4-amino antipyrine et le phénol pour former un colorant rouge quinonéimine. L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la concentration de glucose présente dans le plasma (**Kahou Bi et al.,2016**).

B- Méthode GPO-PAP de FOSSATI : c'est une méthode enzymatique colorimétrique, Les triglycérides sont hydrolysés par une lipase spécifique libérant des acides gras et du glycérol. Le glycérol est phosphorylé par l'enzyme glycérolase et par la suite, le glycérol-1-phosphate est oxydé en hydroxyacétone phosphate par l'enzyme glycérol-phosphate oxydase, générant du peroxyde d'hydrogène. Par la suite, dans une réaction de type Trinder, le peroxyde d'hydrogène réagit avec la 4-aminoantipyrine et l'acide 3,5-dichloro-2-hydroxybenzènesulfonique pour produire un composé coloré au moyen de l'enzyme peroxydase en une quantité proportionnelle à la concentration de triglycérides présents dans le échantillon cellulaire (**BIOLAB,2019**).

C- **Le test ELISA :** ELISA (Enzyme-Linked Immuno Assay) est un test immunologique qui permet la détection ou le dosage de molécules (généralement des protéines) dans un échantillon biologique. Elle fut conceptualisée et développée par deux scientifiques suédois, Peter Perlmann et Eva Engvall à l'Université de Stockholm en 1971. L'ELISA est basé sur la réaction spécifique d'antigène-anticorps et concerne habituellement immobiliser des anticorps ou des antigènes à une plaque de 96 puits ou de 384 puits **(Magniez,2008).**

Fiche technique N1°

IMMUNOHISTICHIMIE

La méthode employée est LSAB (LabelledStreptavidin-Biotine) ,basée sur la haute affinité de la streptavidine pour la biotine. Un anticorps primaire se fixe spécifiquement sur l'antigène cible est révélé par un anticorps secondaire couplé à la biotine (biotynilé). La streptavidine est couplée à une enzyme,péroxydase de Raifort (HRP); celle-ci, va se fixer sur l'anticorps secondaire biotynilé. L'activité de la peroxydase induira la coloration d'un chromogène.

1. Le prétraitement :

*Déparaffinage, réhydratation et démasquage antigénique: Afin de réaliser le déparaffinage, la réhydratation et le démasquage, les lames sont prétraitées dans le PT Link pendant 1h afin d'inhiber les effets secondaires de la fixation, pour cela il faut:

-Diluer la solution de démasquage des cibles au 1/50ème dans de l'eau distillée ou déionisée.

-Remplir les cuves du PT link avec une quantité de solution de travail suffisante (1.5 litres) pour recouvrir les coupes de tissus.

-Régler le PT link, afin de préchauffer la solution à 65°C°.

-Immerger les coupes de tissus dans la solution de démasquage des cibles.

-Incuber à 97°C, pendant 20 minutes.

-Laisser les coupes dans le PT link jusqu'à atteindre 65°C°.

-Retirer les lames de la cuve du PT link et les plonger immédiatement dans un récipient contenant une solution de tampon de lavage (wash Buffer) (20x) diluée à une température ambiante pendant 1 à 5 minutes.



-Cerclage des coupes retenues sur les lames l'aide d'un stylo hydrophobe et insoluble dans l'alcool (DAKOpen).pour indiquer le siège et empêcher la diffusion des anticorps sur la lame.



-Blocage des peroxydases endogènes: Afin de bloquer les peroxydases endogènes, on dépose une solution de blocage à base d'H₂O₂ (Peroxydase Blocking Reagent) pendant 15 min sur la lame. Celle-ci est ensuite mise dans une chambre humide et obscure à température ambiante pendant 15 minutes.



L'addition de H₂O₂ permet le blocage des peroxydases endogènes qui ont les mêmes récepteurs que le DAB (3,3' Diaminobenzidine). Cette étape est suivie par un rinçage dans 3 bacs de tampon de lavage dilué au 1/20ème, pendant 5 minutes chacun.

2. Traitement:

-Application de l'AC primaire spécifique: 200 µl de l'AC primaire sont déposés sur la partie encerclée du tissu sur la lame qui est incubée pendant 30 minutes dans une chambre obscure et humide, puis rincée dans 3 bacs de tampon de lavage (TBS) pendant 5 minutes chacun. Dans notre cas, c'est l'anticorps « E-cadhérine » et anti CD3.



-Application de l'AC secondaire non spécifique: 200µL de l'AC secondaire conjugué à l'enzyme HRP (Horse Radish peroxydase) sont déposés sur la lame, c'est une étape d'amplification du signal; une deuxième incubation est effectuée pendant 20 minutes puis la lame est rincée dans 3 bacs de tampon de lavage pendant 5 minutes chacun, pour éliminer l'excès de l'HRP.



-Révélation: elle Se fait par 200 µl d'un révélateur, le chromogène de la peroxydase d'une couleur marron le DAB (3-3 diaminobenzidine) sont appliqués sur les coupes lesquelles sont incubées pendant 5 à 10 minutes, puis rincées à l'eau distillée pour éliminer l'excès de DAB. L'enzyme (HRP) dégrade le substrat chromogène DAB, le produit qui en résulte donne une coloration marron détectable par microscopie optique.



-Contre coloration: Dans le but de colorer le noyau en bleu, Les lames sont émergées dans l'hématoxyline de Mayer pendant 5 minutes puis rincées à l'eau courante pour enlever l'excès d'hématoxyline. Par la suite, effectuer un passage des lames dans un bain d'eau ammoniacale pour éliminer l'excès du colorant (Bleuiment), suivi par un rinçage à l'eau courante.

-Déshydratation et éclaircissement: On met les lames dans 3 bacs d'éthanol d'ordre croissant (70,90 et 100%) de 2 minutes chacun, puis dans 3 bacs de xylène, d'une minute chacun.

-Montage des lames et lamelle

-Observation au microscope photonique est réalisées à différents grossissements, et les photos sont prises, enregistrées, analysées et interprétées.

Figure 01: Méthode de marquage à la streptavidine-biotine (LSAB)(VECTOR LABORATORIES)

