

REPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB BLIDA -1-  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie et de Physiologie Cellulaires  
Laboratoire des biotechnologies, environnement et santé



Mémoire de fin d'études en vue de  
l'obtention du diplôme de master en  
science de la nature et de la vie

Spécialité : Biologie moléculaire et cellulaire

THÈME

ALTÉRATIONS CELLULAIRES ET MOLÉCULAIRES DU  
FOIE DIABÉTIQUE CHEZ UN ANIMAL MODÈLE  
*PSAMMOMYS OBESUS* NUTRI-INDUIT

Présenter par

**M<sup>elle</sup> CHAMI Selma**

Soutenue le 03/07/2018

Devant le jury composé de :

<b>M<sup>me</sup> ANANE A.</b>	<b>MAA</b>	<b>USDB1</b>	<b>Présidente</b>
<b>M<sup>me</sup> AMOKRANE A.</b>	<b>MAA</b>	<b>USDB1</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>M<sup>me</sup> BENAZOUZ F.</b>	<b>MAA</b>	<b>USDB1</b>	<b>Promotrice</b>
<b>M<sup>me</sup> SIHALI O.</b>	<b>MCB</b>	<b>USTHB</b>	<b>Co-Promotrice</b>
<b>M<sup>me</sup> HADJI A.</b>	<b>MA</b>	<b>CHU Douira</b>	<b>Co-Promotrice</b>

**Dr. SAADI L. responsable de l'option BMC**

## REMERCIEMENTS

La réalisation de cette étude n'aurait pas été possible sans la contribution de plusieurs acteurs.

Je tiens tout d'abord à remercier Madame ANANE A. qui me fait l'honneur de présider mon jury de mémoire fin d'études, ainsi qu'à Madame AMOKRANE A. pour avoir accepté d'évaluer et examiné ce travail et pour l'attention qu'elles ont su y porter.

Je désire exprimer toute ma reconnaissance envers ma promotrice M<sup>me</sup> BENAZOUZ Fella pour la confiance, soutien tout au long de ce travail, la compréhension et le temps qu'elle m'a accordée et de m'avoir corrigé ma rédaction du mémoire ;

Je remercie vivement M<sup>me</sup> SIHALI Ouahiba, ma co-promotrice de m'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 mon stage. Ses encouragements et conseils m'ont guidé tout au long de ce travail ;

Je remercie sincèrement Dr HADJI, ma co-promotrice pour les judicieux conseils, encouragements lors des difficiles moments et de m'avoir guidée et soutenu dans la réalisation de cette étude ;

Je suis très touchée par leur disponibilité malgré leurs multiples responsabilités. Elles étaient d'un grand soutien moral, surtout au moment de faiblesse, d'avoir dirigé ce travail pour mener à bien cette étude le plus efficacement possible. Je n'oublierai jamais leur immense générosité et aide qui m'a permis d'avoir confiance en moi pour réaliser ce travail.

Je tiens à remercier Mr BELARBI de m'avoir accueilli au niveau de son laboratoire d'anatomopathologie du CHU Douera, et pour m'avoir permis de réaliser ce travail de recherche ;

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire d'anatomopathologique de CHU Douera pour leur bon accueil comme un membre de l'équipe, d'avoir transmis leurs passion, expériences et multiples connaissances des techniques de laboratoire et leurs réponses à mes questions, bien particulièrement pour Mr Hakim ;

J'adresse mes sincères remerciements à Dr SAADI Leila, responsable de l'option Biologie Moléculaire et Cellulaire, pour son aide, soutien et compréhension pour réaliser ce projet, également pour ses efforts à nous garantir la continuité et l'aboutissement de ce programme de Master ;

Je tiens aussi à souligner que mon engagement dans des études supérieures est conséquent à l'enseignement transmis par des enseignants inspirants dont j'ai eu la chance de côtoyer tout au long de mon parcours académique. Ma curiosité intellectuelle et l'importance que j'accorde aux études m'ont également été transmises par mes parents. En plus de m'avoir donné les outils nécessaires pour poursuivre mes études, ceux-ci m'ont offert un soutien indispensable à ma réussite sur plusieurs plans. Je suis très fière d'avoir appris auprès de vous et j'espère avoir été à la hauteur de votre attente.

Un merci bien particulier pour tous ceux qu'ils m'ont fait des obstacles, qui m'ont dit NON et je ne peux pas le faire. C'est à cause d'eux que je le fais moi-même.

## DÉDICACES

Je dédie ce modeste travail :

À ceux qui m'ont donné la vie, qui ont sacrifié pour mon bonheur et ma réussite et mon bien-être, et qui n'ont cessé de m'encourager, protéger et de prier pour moi et m'aider durant toute ma vie : mes parents. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments et mon éternelle gratitude. « Que dieu vous préserve et vous procure santé et longue vie ». Ce sont vos sourires qui me donnent la force d'avancer.

J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi.

Je remercie sincèrement ma très chère sœur et mon frère qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité. Je vous remercie pour vos nombreuses faveurs, soutien, et toute l'ambiance dont vous m'avez entouré.

À tous les membres de ma famille. Pour leur soutien moral, pour leurs incessants encouragements tout au long de mon étude, Je vous souhaite beaucoup de joies et de bonheur. Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

À la mémoire de mes grands-pères et ma grande mère j'aurais tant aimé que vous soyez présents. Que dieu ait vos âmes dans sa sainte miséricorde

À la personne la plus proche BOUKHELF Fethia, tu as été ma plus belle rencontre scientifique et amicale, mon amie, ma confidente, ma complice. En souvenir des bons moments passés ensemble, en souvenir de nos efforts communs, ton soutien moral et encouragements tout au long de mon étude, que ce travail soit l'expression de la profonde affection que je te porte.

Aux personnes qui m'ont aidé et encouragé, qui étaient à mes côtés, et qui m'ont accompagné durant cette étape de ma vie, mes aimables amis, collègues d'étude, TAIF Amel, FRIDI Chahinez et LAMARI Dehiba ; et à mes collègues du laboratoire d'anatomopathologie, le binôme MOUAICI Fouzia et SEGHIER Soumaya.

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

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

## RÉSUMÉ

Le diabète type 2 fait partie du syndrome métabolique chronique, affecte tous les systèmes dans le corps, y compris le foie. Les effets toxiques de l'hyperglycémie chronique causés principalement par l'insulinorésistance peuvent entraîner une stéatose hépatique non alcoolique, qui peut évoluer vers la stéatohépatite, la cirrhose voir carcinomes hépatocellulaires. Cette étude vise à mettre en évidence les changements métaboliques et les altérations cellulaires et moléculaires hépatique impliquées dans le passage de la stéatose à la stéatohépatite non alcoolique, sur un modèle murin, *Psammomys obesus* durant le développement du diabète type 2 induit par un régime hypercalorique. Cette évolution pathologique a été induite pendant 9 mois et analysée au moyen d'études biochimiques, histologique et immunohistochimique. Nous avons observé que *Psammomys obesus*, soumis à un régime hypercalorique montre une augmentation du poids corporel, hyperglycémie, hyperinsulinémie et une dyslipidémie au début de l'étude. Au troisième mois, des hépatocytes chargés de vacuoles lipidiques sont détectable ; à 6 mois, un infiltrat inflammatoire lobulaire et portal se produise ; à 9 mois, une perte d'architecture cellulaire, ballonnisation et une fibrose portale se produisent. L'expression de CD3, CD163 et Bcl-2 était altéré chez les *Psammomys obesus* expérimentaux. À la suite de ces observations, nous avons constaté que le diabète type 2 peut être à l'origine d'affections hépatiques graves telles la stéatose hépatique non alcoolique ; le *Psammomys obesus* développe les symptômes caractéristiques de la maladie humaine du foie et, il apparaît comme un excellent modèle bien adapté aux recherches expérimentales dont le but d'améliorer la gestion thérapeutique.

**Mots clés :** Diabète type 2, Résistance à l'insuline, Hyperglycémie, Obésité, Inflammation, Foie, Stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD), *Psammomys Obesus*.

## ABSTRACT

Type 2 diabetes is one of the chronic metabolic syndromes, affecting all systems in the body, including the liver. The toxic effects of chronic hyperglycemia caused mainly by insulin resistance may result in non-alcoholic fatty liver disease, which can further progress to non-alcoholic steatohepatitis, cirrhosis and, finally, hepatocellular carcinomas. This study aims to highlight metabolic changes, cellular and molecular hepatic changes involved in the evolution of simple steatosis to non-alcoholic steatohepatitis, on a murine model, *Psammomys obesus* of a high energy diet-induced type 2 diabetes. This pathological evolution was induced during 9 months and analyzed by means of metabolic, histological and immunohistochemical studies. We observed that *Psammomys obesus*, subjected to hypercaloric diet showed increased body weight, hyperglycemia, hyperinsulinemia and dyslipidemia at the beginning of the study. In the third month, hepatocytes loaded with lipid vacuoles are detectable; at 6 months, a lobular and portal inflammatory infiltrate occurs; at 9 months, a loss of cellular architecture, ballooning and portal fibrosis occur. CD3, CD163 and Bcl-2 expression was altered in experimental *Psammomys obesus*. In conclusion, our results suggest that type 2 diabetes can cause serious liver diseases such as non-alcoholic fatty liver disease; fed a calorie-rich diet *Psammomys obesus* develops a syndrome, which shares characteristics compatible with human non-alcoholic fatty liver disease and is a very well adapted for experimental research, and could help improve the therapeutic management of patients.

**Keywords:** Type 2 Diabetes, Insulin Resistance, Hyperglycemia, Obesity, Inflammation, Liver, Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), *Psammomys Obesus*.

## ملخص

داء السكري من النمط الثاني هو متلازمة الاضطراب الأيضي المزمن، التي تؤثر على جميع أجهزة و أعضاء الجسم، بما في ذلك الكبد. يؤثر ارتفاع السكر المزمن في الدم، الناجم أساسا عن مقاومة الانسولين، على عملية التمثيل الغذائي و يمكن أن يؤدي إلى أمراض الكبد الدهنية غير الكحولية، و التي يمكن أن تتطور بدورها لالتهاب الكبد الدهني غير الكحولي و تليف الكبد و سرطان الخلايا الكبدية. الهدف من هذه الدراسة التي أجريت لمدة 9 أشهر يتوقف على تقييم التغيرات الأيضية، الخلوية و الجزيئية التي تساهم في التطور من تدهن الكبد إلى التهاب الكبد الدهني الغير كحولي على نموذج فأر الرمل، خلال تطور مرض السكري من النمط الثاني الناتج عن اتباع نظام غذائي عالي السعرات الحرارية، و ذلك عن طريق إجراء تحاليل كيميائية، دراسات نسيجية و كيمياء المناعة النسيجية. في بداية الدراسة، لوحظت زيادة في وزن فأران الرمل الخاضعة لنظام غذائي عالي السعرات الحرارية مع فرط في نسب كل من السكر، الدهون الثلاثية، الكولسترول و الانسولين في الدم. في الشهر الثالث، تجمع حويصلات كبيرة من الدهون داخل خلايا الكبد تمت ملاحظتها؛ خلال الشهر السادس، وفيه لوحظ حدوث ارتشاح التهابي في الكبد؛ في الشهر التاسع من الدراسة و مع تطور المرض فإن المضاعفات شملت تضخم الخلايا الكبدية، فقدان بعض الخلايا بنيتها، مع تليف الكبد. لقد أدى النظام الغذائي عالي السعرات الحرارية إلى تغيير تعبير كل من عنقود التمايز 3 ، عنقود التمايز 163 و بروتين بي سي إل-2. بعد هذه الملاحظات و من خلال هذه النتائج التجريبية تبين انه مرض السكري من النوع 2 يمكن أن يسبب أمراض الكبد الخطيرة مثل مرض الكبد الدهني غير الكحولي؛ فأر الرمل يطور أعراض مماثلة للأعراض المميزة لهذا المرض البشري، كما أنه يمثل نموذج ممتاز يتناسب تمامًا مع الأبحاث التجريبية التي تهدف إلى تحسين الإدارة العلاجية.

**الكلمات المفتاحية:** داء السكري من النمط الثاني، مقاومة الأنسولين، ارتفاع السكر في الدم، البدانة، التهاب، الكبد، مرض الكبد الدهني غير الكحولي، فأر الرمل.

## GLOSSAIRE

**Acinus hépatique :** est une unité de parenchyme hépatique, dont la forme évoque un grain de raisin, centrée par un espace porte. Il est situé entre au moins deux veinules hépatiques terminales et le sang coule de l'espace porte vers les veinules à travers les sinusoides (**Young et al., 2015**).

**Diabète gestationnel:** est une complication fréquente de la grossesse définie comme une intolérance au glucose avec apparition de la première reconnaissance pendant la grossesse (**Zheng et al., 2017**).

**Diffusion facilitée:** processus de transport du matériau par gradient de concentration à travers une membrane via des transporteurs membranaires, qui ne nécessite pas d'énergie (**Lodish et al., 2000**).

**Étape du prédiabète :** C'est une période pendant laquelle le sujet reste normoglycémique, mais présente un certain nombre d'anomalies cliniques ou biologiques, connues comme des facteurs prédisposant au diabète de type 2, comme l'obésité, antécédents familiaux de diabète de type 2 (**DeFronzo et al., 2015**).

**Gluconéogenèse:** Une voie métabolique utilisant des substrats de carbone pour générer du glucose (**Rines et al., 2016**).

**Glucotoxicité:** Les effets toxiques de l'hyperglycémie. Ces effets néfastes peuvent être fonctionnels et réversibles, ou peuvent conduire à la mort cellulaire (**Donath et Shoelson, 2011**).

**Glycogénolyse:** Une voie métabolique qui dégrade le glycogène en glucose (**Rines et al., 2016**).

**Hyperglycémie:** glycémie élevée au-dessus des niveaux normaux (**Rines et al., 2016**).

**Hyperinsulinémie:** excès de taux d'insuline dans le sang, souvent causé par la résistance à l'insuline (**Rines et al., 2016**).

**Inflammasome:** Complexe moléculaire de plusieurs protéines qui, lorsqu'il est activé, entraîne la production de caspase active 1, qui clive la pro-interleukine-1 $\beta$  (pro-IL-1 $\beta$ ) et pro-IL-18 pour produire les cytokines actives (**Donath et Shoelson, 2011**).

**Lipotoxicité:** Les effets toxiques de niveaux élevés d'acides gras libres. Ces effets néfastes peuvent être fonctionnels et réversibles, ou peuvent conduire à la mort cellulaire (**Donath et Shoelson, 2011**).

**Macrophage de type M1:** des macrophages pro-inflammatoires, classiquement activés par des ligands du récepteur de type Toll (comme le lipopolysaccharide) et l'interféron- $\gamma$ , et qui exprime l'oxyde nitrique synthase inductible, qui génère de l'oxyde nitrique (**Donath et Shoelson, 2011**).

**Macrophage de type M2:** des macrophages anti-inflammatoires, alternativement activé par IL-4 ou IL-13 et exprimant l'arginase 1, le récepteur du mannose CD206 et la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-4 (**Donath et Shoelson, 2011**).

**Maladie non transmissibles (MNT) :** des maladies chroniques de longue durée, qui ne se transmettent pas d'un individu à un autre. Les quatre principaux types de maladies non transmissibles sont les maladies cardiovasculaires, les cancers, les maladies respiratoires chroniques et le diabète. Touches toutes les tranches d'âges et toutes les régions et, représente 70% des décès dans le monde (**Organisation mondiale de la santé, 2017**).

**Polypeptide amyloïde des îlots :** est l'un des principaux produits de sécrétion des cellules  $\beta$  des îlots pancréatiques. Il inhibe la sécrétion d'insuline et de glucagon (**Westermarck et al., 2011**).

**Stress du réticulum endoplasmique (SRE) :** une réponse du RE qui entraîne la perturbation du repliement des protéines et l'accumulation de protéines dépliées dans le RE (**Donath et Shoelson, 2011**).

**Syndrome métabolique (MetS) :** Un groupe de facteurs de risque qui prédisposent au développement de la maladie cardiovasculaire (MCV) et les maladies métaboliques compris le diabète de type 2 (DT2). Il nécessite la coïncidence d'au moins 3 des critères suivants: la présence d'un tour de taille élevé, l'hypertension, la dyslipidémie spécifiquement hypertriglycéridémie et des niveaux réduits de lipoprotéines de haute densité (HDL) et une glycémie à jeun élevée (**Fanning et O'Shea, 2018**).

**Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) :** des molécules hautement réactives, dont les niveaux peuvent augmenter considérablement pendant différents types de stress, entraînant des dommages aux structures cellulaires. Cela se cumule dans une situation définie comme un stress oxydatif (**Marra et al., 2008**).

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADA	American Diabetes Association
AGL	Acide Gras Libre
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CCL	chemokine (C-C motif) ligand
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2
CD	Cluster de différenciation
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CRP	C-reactive protein
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) Ligand
DG	Diabète gestationnel
DID	Diabète Insulino-Dépendant
DNID	Diabète Non Insulino-Dépendant
DT2	Diabète Type 2
EP	Espace porte
FID	Fédération Internationale du Diabète
GWAS	Genome-Wide Association Study
HbA1c	Hémoglobine A1c
HGPO	HyperGlycémie Provoquée par voie Orale
I-CAM1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IL-1RA	Interleukin-1 Receptor Antagonist
IL-1 $\beta$	Interleukine 1 $\beta$
IL-6	Interleukine 6
IMC	Indice de Masse Corporelle
IRS	Insulin Receptor Substrate
JNK	c-Jun N-terminal kinases
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MCP1	Monocyte Chemoattractant Protéine 1

MNT	Maladies Non Transmissibles
MTA	Macrophages du Tissu Adipeux
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
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PPARG	peroxisome proliferator activated receptor gamma
RE	Réticulum endoplasmique
RHC	Régime Hypercalorique
RI	Récepteur de l'insuline
RN	Régime Naturel
ROS	Reactive Oxygen Species
RS	Régime Standard
TCF7L2	Transcription Factor 7 Like 2
TG	Triglyceride
Th 1	Type 1 T helper cells
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
Trég	Regulatory T cells
V-CAM1	Vascular cell adhesion protein 1
VCL	Veine Centro lobulaire
VLDL	very low-density lipoprotein

## LISTE DES FIGURES

Figure 1	Facteurs de risque et mécanismes d'apparition de diabète type 2.	6
Figure 2	Cellules des îlots de Langerhans provenant du pancréas.	7
Figure 3	Activation de la signalisation de l'insuline.	8
Figure 4	L'inflammation des îlots dans le diabète de type 2.	9
Figure 5	Les cellules immunitaires médient l'inflammation dans le tissu adipeux	10
Figure 6	Anatomie du foie humain.	12
Figure 7	Ingénierie des tissus hépatiques.	13
Figure 8	les mécanismes pathogènes pendant la progression vers la stéatohépatite NASH.	16
Figure 9	<i>Psammomys obesus</i> au laboratoire.	19
Figure 10	Les différentes étapes de la chasse du <i>Psammomys obesus</i>	22
Figure 11	Les différentes plantes halophiles, de la famille des chénopodiacées	24
Figure 12	Prélèvements sanguins au niveau du sinus rétro orbital de l'œil du <i>Psammomys obesus</i> .	25
Figure 13	scores histologiques des lésions hépatiques selon la SAF.	36
Figure 14	Graphique linéaire de l'évolution pondérale dans les groupes témoins et expérimentaux de <i>Psammomys obesus</i> au moment du sacrifice.	38
Figure 15	Graphique linéaire de l'évolution de la glycémie plasmatique dans les groupes témoins et expérimentaux de <i>Psammomys obesus</i> au cours de 9 mois de l'étude	39
Figure 16	Graphique linéaire de l'évolution de la triglycéridémie plasmatique dans les groupes témoins et expérimentaux de <i>Psammomys obesus</i> au cours de 9 mois de l'étude.	40
Figure 17	Graphique linéaire de l'évolution de la cholestérolémie plasmatique dans les groupes témoins et expérimentaux de <i>Psammomys obesus</i> au cours de 9 mois de l'étude.	41
Figure 18	Graphique linéaire de l'évolution de l'insuline plasmatique dans les groupes témoins et expérimentaux de <i>Psammomys obesus</i> au cours de 9 mois de l'étude.	42
Figure 19	Parenchyme hépatique, chez <i>Psammomys obesus</i> témoin.	43
Figure 20	Parenchyme hépatique, chez <i>Psammomys obesus</i> témoin.	45
Figure 21	Parenchyme hépatique, chez <i>Psammomys obesus</i> expérimentaux (3eme mois).	47
Figure 22	Parenchyme hépatique, chez <i>Psammomys obesus</i> expérimentaux (6eme mois).	49
Figure 23	Parenchyme hépatique, chez <i>Psammomys obesus</i> expérimentaux (9 <sup>eme</sup> mois).	51
Figure 24	Expression immunohistochimique de la protéine Bcl-2 dans le parenchyme hépatique, chez <i>Psammomys obesus</i> témoin et expérimentaux.	52

Figure 25	Expression immunohistochimique de la protéine CD3 dans le parenchyme hépatique, chez <i>Psammomys obesus</i> témoin et expérimentaux.	53
Figure 26	Expression immunohistochimique de la protéine CD163 dans le parenchyme hépatique, chez <i>Psammomys obesus</i> témoin et expérimentaux.	54
Figure 1	Maintien des niveaux de glucose dans le sang par le glucagon et de l'insuline	78
Figure 2.A	Composition cellulaire du foie sain.	78
Figure 2.B	Les cellules immunitaires dans le foie en bonne santé.	78
Figure 3.A	Pathogénèse de la stéatose hépatique.	79
Figure 3.B	Pathogénèse de la stéatohépatite non alcoolique.	79
Figure 4	Protocole expérimental.	80
Figure 5	Schéma des différentes étapes de l'étude histologiques.	81
Figure 6	Méthode de marquage à la streptavidine-biotine (LSAB).	82

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Critère diagnostique pour le diabète et pré-diabète.	5
Tableau II	La composition alimentaire pour 100g de régime naturel et hypercalorique.	24
Tableau III	Protocole de dosage des solutions réactionnelles, dosage de glucose.	26
Tableau IV	Protocole de dosage des solutions réactionnelles, dosage des triglycérides.	27
Tableau V	Protocole de dosage des solutions réactionnelles, dosage du cholestérol.	28
Tableau VI	Poids corporel de groupe témoin et expérimental de <i>Psammomys obesus</i> au moment du sacrifice.	37
Tableau VII	Valeurs moyennes de glucose sanguin, d'insuline plasmatique, de triglycérides plasmatiques et de cholestérol total plasmatique chez des <i>Psammomys obesus</i> témoins et expérimentaux.	38
Tableau I	Facteurs de risque du diabète type 2.	82
Tableau II	Appareillages et réactifs utilisés dans l'étude.	83
Tableaux III	Valeurs des poids et de certains paramètres biochimiques des <i>Psammomys obesus</i> soumis au RN pendant 9 mois.	84
Tableaux IV	Valeurs des poids et de certains paramètres biochimiques des <i>Psammomys obesus</i> soumis au RHC pendant 9 mois.	85

# TABLE DES MATIÈRES

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Chapitre I : Rappels bibliographiques</b> .....	3
I.1. Généralité.....	3
I.1.1. Qu'est-ce que le diabète ?.....	3
I.1.2. Classification du diabète.....	3
I.2. Diabète de type 2.....	4
I.2.1. Épidémiologie du diabète type 2.....	4
I.2.2. Signes cliniques et diagnostic.....	5
I.2.3. Etiologie et facteurs de risque du diabète type 2.....	5
I.2.4. Physiologie normal et physiopathologie du diabète type 2.....	6
I.2.4.1. Bref aperçu de la glucorégulation normale.....	6
I.2.4.2. physiopathologie du diabète type 2.....	8
I.2.4.2.1. Le Diabète type 2 : une maladie auto-inflammatoire ?.....	9
I.3. les complications du diabète type 2.....	11
I.3.1. Le foie, une autre victime du diabète de type 2.....	11
I.3.1.1. Organisation, structure et fonctions du foie.....	11
I.3.1.1.1. Anatomie du foie.....	11
I.3.1.1.2. Histologie.....	12
I.3.1.2. Fonctions hépatique.....	14
I.3.1.3. Stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD).....	15
I.3.1.3.1.. Physiopathologie de la stéatose hépatique non alcoolique.....	15
I.3.1.3.2. Steatohepatite non alcoolique (NASH) et inflammation.....	16
I.3.1.3.3. Fibrose.....	17
I.3.1.3.4. Cirrhose.....	17
I.4. Diabète type 2 expérimental.....	17
<b>Chapitre II : Matériel et méthodes</b> .....	19
II.1. MATÉRIEL.....	19

II.1.1. Matériel biologique.....	19
II.1.1.1. Les rats : <i>Psammomys obesus</i> et son biotope.....	19
II.1.1.1.1. Ecophysiologie de l’animal.....	20
II.1.1.2. Prélèvements.....	20
II.1.1.3. les anticorps.....	21
II.1.2. Matériel non biologiques.....	21
II.2. Méthodes.....	21
II.2.1. Mise en œuvre expérimentale .....	21
II.2.1.1. Capture des animaux.....	21
II.2.1.2. Conditionnement de l’animal au laboratoire.....	23
II.2.1.3. Répartition des lots.....	23
II.2.1.4. Le régime alimentaire.....	23
II.2.1.5. Contrôle du poids corporel .....	25
II.2.1.6. Prélèvement sanguin .....	25
II.2.1.7. Prélèvement des organes .....	25
II.2.2. Techniques analytiques.....	26
II.2.2.1. Dosage du glucose.....	26
II.2.2.2. Dosage des triglycérides.....	27
II.2.2.3. Dosage du cholestérol.....	28
II.2.2.4. Dosage de l’insuline.....	29
II.2.3. Etude statistique.....	29
II.2.4. La technique histologique .....	30
II.2.5. Etude immunohistochimique.....	33
II.2.6. Le score histologique de la stéatose hépatique non alcoolique.....	35
<b>Chapitre III : Résultats et discussion.....</b>	<b>37</b>
III.1. Résultats.....	37
III.1.1. Evaluation du poids corporels des <i>Psammomys obesus</i> .....	37
III.1.2. Paramètres métaboliques et biochimiques.....	38

III.1.2.1. La glycémie.....	39
III.1.2.2. La triglycéridémie.....	40
III.1.2.3. La cholestérolémie.....	41
III.1.2.4. L'insulinémie .....	42
III.1.3. Étude histologique du foie de <i>Psammomys obesus</i> .....	43
III.1.3.1. Etude architecturale et structurale de tissu hépatique..... des rats témoins	43
III.1.3.2. Etude architecturale et structurale de tissu hépatique des rats..... expérimentaux	46
III.1.4. Immunmarquage de molécules du foie de <i>Psammomys</i> témoins..... et expérimentaux.	52
II.1.4.1. Expression de Bcl-2.....	52
III.1.4.2. Expression de CD3.....	53
III.1.4.3. Expression de CD163.....	54
III.2. Discussion.....	57
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>64</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>66</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>78</b>

## Introduction

Le diabète sucré est un problème majeur de santé publique qui touche l'ensemble de la population mondiale. Ce syndrome métabolique chronique, liée aux changements de mode de vie et d'habitudes alimentaires, voit en effet son incidence et prévalence croître de manière exponentielle (**FID, 2017**); ce qui souligne l'énorme ampleur de ce problème, au point que l'organisation mondiale de la santé a déjà lancé des alertes à plusieurs reprises (**OMS, 2016**).

Selon la Fédération Internationale du Diabète (FID), 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. Si cette tendance se poursuit, 629 millions de personnes environ, seront atteintes de diabète d'ici 2045 (**Chatterjee et al., 2017**). En Algérie, et selon différentes études épidémiologiques, 8 à 12 % de la population est atteinte de diabète; il y représente, par ailleurs, la quatrième cause de décès (**Chami et al., 2015**).

En effet, le diabète de type 2 fait partie de syndrome métabolique, qui implique une combinaison d'une altération de la sécrétion d'insuline, résistance à l'insuline et augmentation de la production hépatique de glucose, tous conduisant à la voie commune finale de l'hyperglycémie chronique, et l'importance relative de ces trois anomalies métaboliques communes dépendent des facteurs génétiques, pathologiques ou environnementaux, notamment l'obésité, la sédentarité et la mauvaise alimentation, impliqués chez un patient particulier (**Hupfeld et al., 2010**).

L'hyperglycémie chronique liée au diabète est associée à d'importantes complications, dont la microangiopathie et la macroangiopathie (**Raccah, 2004**). D'autre part, le diabète induit des modifications métaboliques qui contribuent à l'apparition des altérations fonctionnelles et structurales hépatique, bien 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, constitue un spectre de lésions hépatiques allant d'une stéatose hépatique relativement bénigne vers une stéatohépatite (NASH) à une cirrhose potentiellement mortelle (**Clark et Diehl, 2002**).

Cependant, il n'est pas encore clair si l'une de ces conditions provoque l'autre (Diabète type 2 ↔<sup>?</sup> NAFLD), ou si les deux sont les conséquences d'un autre processus ; de plus, la nature cellulaire de l'inflammation hépatique impliqué dans la progression vers la NASH est encore inconnue. Pour cela, le recours à des modèles expérimentaux s'impose donc, pour étudier le

développement de ces complications hépatiques, telle la NAFLD. 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), CD163 (macrophages activés) caractéristique de l'activation du système immunitaire, et la protéine anti-apoptotique Bcl-2 ?

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 apoptotique. Pour contribuer à la compréhension des mécanismes moléculaires du diabète type 2 et les complications hépatiques qui y sont lui associées.

Afin de répondre aux questions, nous étudierons dans un premier temps le diabète type 2, ses caractéristiques et complications hépatiques. Puis, dans une seconde partie, nous verrons le matériel utilisé et les méthodes appliqués dans cette étude afin d'atteindre nos objectifs. La troisième partie de ce mémoire sera consacrée aux résultats et discussion, où nous avons abordé les résultats expérimentaux obtenus lors de l'induction du diabète par un régime hypercalorique et l'application des différentes techniques avec leur interprétation et analyse. Enfin, une conclusion récapitule les connaissances acquises lors de ce travail ; ainsi que les perspectives et les possibilités de poursuivre des recherches dans le domaine étudié.

## **I.1. Généralité**

### **I.1.1. Qu'est-ce que le diabète ?**

Le diabète est un *syndrome métabolique* chronique d'étiologie multiple, caractérisée par des niveaux élevés de glucose dans le sang, c'est l'hyperglycémie; en raison de défauts d'action ou de sécrétion d'*insuline*, ou une combinaison des deux. Ce syndrome provoque ainsi des perturbations au niveau du métabolisme des glucides, des protéines et des lipides (ADA, 2014; Puchulu, 2018). Il est l'une des quatre principales *maladies non transmissibles* (MNT) (OMS, 2017). S'il n'est pas contrôlé, il mène à la chronicité de l'hyperglycémie, responsable des atteintes graves, et à long terme de nombreux organes, qui sont en grande partie responsable de la morbidité et de la mortalité (ADA, 2014). En revanche, des mesures efficaces de surveillance, qualité des soins et prévention permettront de retarder ou de prévenir la survenue du diabète et de ses complications (OMS, 2016).

### **I.1.2. Classification du diabète**

La classification du diabète a fait l'objet de nombreux débats et, continuera d'évoluer pour comprendre pleinement sa pathogénèse. Plusieurs schémas de classification ont été envisagés (Thomas et Philipson, 2015), dont la première a été publiée par le comité d'experts de l'OMS en 1980, (Alberti et Zimmet, 1998). Actuellement, la classification est basée sur l'étiologie de la maladie (Punthakee et al., 2018), dont les formes les plus répandues sont:

- Diabète de type 1 (DID): auto-immune, dû à la destruction des cellules  $\beta$ , entraînant une carence absolue en insuline;
- Diabète de type 2 (DNID): dû à une anomalie progressive de sécrétion d'insuline ;
- Diabète gestationnel* (DG): est une forme d'intolérance au glucose, avec apparition ou première reconnaissance pendant la grossesse;
- Types spécifiques de diabète moins courants dus à des maladies génétiques « syndromes diabétiques monogéniques », aux complications d'autres maladies et la prise de médicaments.

Peu importe la forme de classification, soit pour la recherche, ou les soins aux patients, l'objectif reste cependant le même, entre autres de trouver des thérapies optimales (Thomas et Philipson, 2015).

Ces brèves descriptions de cette maladie n'expliquent que partiellement l'intérêt de notre étude dans le domaine de la recherche. Durant la présentation suivante, nous nous sommes intéressés uniquement au diabète de type 2 et de ces complications.

## **I.2. Diabète de type 2 :**

Autrefois appelé diabète de l'adulte (**American Diabetes Association, 2017**). Dans cette forme de diabète, l'hyperglycémie chronique est causée par une combinaison de production inadéquate d'insuline pancréatique et l'incapacité de l'organisme de l'utiliser efficacement; une condition connue sous le nom d'insulino-résistance (**Chatterjee et al., 2017**).

Dans un premier temps et, chez les *individus prédiabétiques*, les cellules  $\beta$  pancréatiques augmentent leur capacité de production de l'insuline, un état qualifié de l'hyperinsulinémie, afin de diminuer l'hyperglycémie. Au fil du temps, l'hyperglycémie se développe alors avec une défaillance progressive des cellules  $\beta$  pancréatiques, jusqu'à ce qu'ils ne parviennent plus à compenser le degré de résistance à l'insuline. Dans ce cas, une déficience en insuline et, finalement, le diabète type 2 (DT2) se développent (**Chatterjee et al., 2017; He et al., 2018; Khalkhal, 2012**) (Figure 1). Les patients atteints de DT2 peuvent ne pas avoir besoin de traitement à l'insuline pour survivre, au moins au début, et souvent tout au long de leur vie (**American Diabetes Association, 2017**).

### **I.2.1. Épidémiologie du diabète type 2**

Au cours des trois dernières décennies, la prévalence du diabète a plus que doublé; suggérant que les changements dans l'environnement et le style de vie sont les principaux contributeurs (**Rewers et Ludvigsson, 2016; Deepa et al., 2017**). Selon la Fédération International du Diabète (FID), cette pandémie figure parmi les 10 premières causes de décès au monde, dont le taux de mortalité est plus élevé chez les diabétiques de type 2 par rapport au type 1 (**Reynolds et al., 2018**). En 2017, 1 adulte sur 2 (20-79 ans) n'est pas diagnostiqué, et 1 sur 11 vivait avec le diabète dans le monde (425 millions); soit 8,8 % de la population adulte, comparé à 108 millions en 1980. Si cette tendance se poursuit, 629 millions de personnes environ, seront atteintes d'ici 2045 (**Cho et al., 2018; FID, 2017**). Le DT2 est la forme la plus répandue, touchant environ 90% des diabétiques, vivant principalement dans des pays à revenu faible ou intermédiaire. Ce type touche généralement des adultes plus âgés, mais est de plus en plus souvent observé chez des enfants, des adolescents et des adultes plus jeunes (**Chatterjee et al., 2017; Henson et al., 2018**)

En Algérie, et selon différent études épidémiologiques, 8 à 12 % de la population est atteinte de diabète; il représente la quatrième cause de décès (**Chami et al., 2015**). Une étude réalisée au niveau de la ville d'Oran, rapporte que la prévalence du diabète de type 2 qui était de 7,1% en 1998, est passée à 10,5% entre 2007-2009 (**Keddad, 2017**). Une autre étude dans la région de Sétif en 2001, annonce une prévalence de 8.2% (IC : 95% : 6.8% à 9.6 %) (**Malek et al., 2001**).

### I.2.2. Signes cliniques et diagnostic

Le diabète type 2 présente des symptômes classiques, notamment une soif excessive (polydipsie), des urines abondantes et fréquentes (polyurie), faim excessive (polyphagie) et perte de poids inexplicée, fatigue extrême (voir physiopathologie), des fourmillements des mains et pieds, cicatrisation lente et Vision trouble (FID, 2017). Ces symptômes apparaissent habituellement plus lentement, par conséquent, la maladie peut rester non diagnostiquée pendant plusieurs années, jusqu'à ce que des complications existantes soient constatées (Pratley, 2013).

Le diagnostic clinique de diabète chez les personnes présentant des symptômes classiques ou des signes de sa complications repose sur l'un des quatre critères résumés dans le tableau I (Chaudhury et al., 2017; Punthakee et al., 2018; Vijan, 2015). Sachant que, La recommandation actuelle consiste à mesurer les taux d'hémoglobine A1c (HbA1c) pour le diagnostic du DT2 (Chaudhury et al., 2017).

Diagnostic	Glycémie à jeune mmol/l (1)	Glycémie à la 2ème heure d'une HGPO (2)	HbA c1 (3)	Glycémie à un moment quelconque de la journée (4)
Pré-diabète	≥ 5.6 et < 7.0	≥ 7.8 et < 11.1	≥ 5.7 et < 6	N'est pas applicable
Diabète	≥ 7.0 (126 mg/dl)	≥ 11.1 (200 mg/dl)	≥ 6.5 (4.8 mg/dl)	≥ 11.1 (200 mg/dl) avec symptômes classiques

**Tableau I| critères diagnostiques pour le diabète et pré-diabète (original).** 1. absence d'apport calorique depuis au moins 8 heures; 2. Hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) selon les recommandations de l'OMS en utilisant une charge orale en glucose anhydre égale à 75g dissout dans de l'eau; 3. L'hémoglobine glyquée permet d'obtenir une estimation de la glycémie moyenne au cours des trois derniers mois de suivi d'un patient. L'ADA le recommande pour le diagnostic du DT2 en raison de sa facilité d'utilisation (car aucun jeûne n'est requis) et de sa fiabilité; 4. N'importe quel moment de la journée, sans tenir compte de l'intervalle depuis le dernier repas.

Dans le cas asymptomatique, si un résultat est positif, le même test soit répété un autre jour pour la confirmation; chez ceux qui présentent de forts facteurs de risque tels que l'obésité (IMC > 25 kg/ m2) devraient être testés. Chez les personnes sans facteurs de risque, l'ADA recommande le dépistage du prédiabète dès l'âge de 45 ans (ADA, 2012; Chaudhury et al., 2017).

### I.2.3. Etiologie et facteurs de risque du diabète type 2

Le diabète de type 2 est multifactorielles, résulte d'une interaction complexe entre facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux (Prasad et al., 2015) (Fig. 1). Ces facteurs peuvent être classés comme modifiables et non modifiables, parmi eux, nous avons ceux présentés dans le tableau I (annexe).

Des études épidémiologiques ont montré que l'obésité est le facteur de risque le plus important, qui peut influencer le développement de la résistance à l'insuline (Belkina et Denis, 2010), dont l'augmentation de son incidence est en corrélation avec la prévalence du DT2 (Zheng

et *al.*, 2017). Cependant, toutes les personnes obèses ne développent pas le diabète et les antécédents familiaux positifs sont considérés comme un facteur de risque puissant (Prasad et Groop, 2015; Tekola-Ayele et *al.*, 2013). Les études sur les jumeaux ont montré une concordance de 70% dans l'apparition du DT2 chez les jumeaux monozygotes et de 20-30% chez les jumeaux dizygotes (Prasad et Groop, 2015).

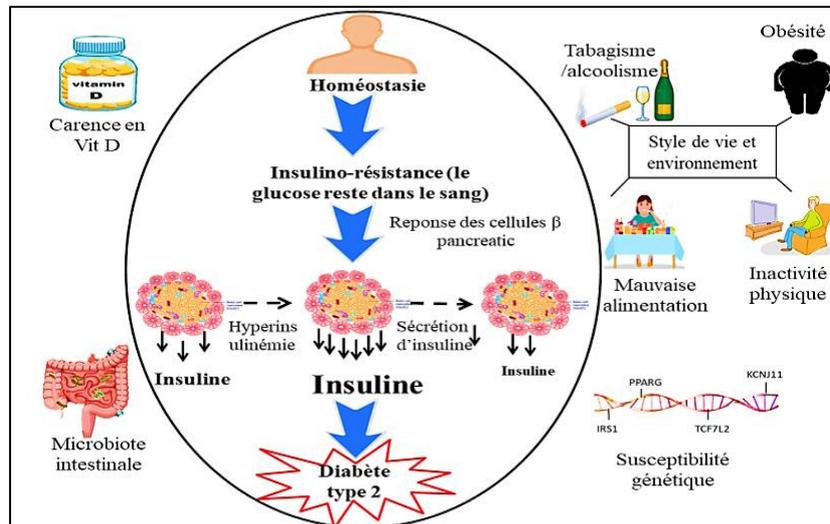


Figure 1 | Facteurs de risque et mécanismes d'apparition de diabète type 2. (Original)

Au cours de la dernière décennie, les vagues successives d'étude d'association pangénomique (GWAS) de DT2, ont identifié plus de 80 variants d'association (Fuchsberger et *al.*, 2016). La plupart des loci ont des effets sur le fonctionnement des cellules  $\beta$  (Zheng et *al.*, 2017) et certains sont associés à l'obésité et à la résistance à l'insuline.

Sur le plan des facteurs alimentaires, les études ont montré qu'une alimentation pauvre en fibres avec un index glycémique élevé, une teneur élevée en graisses saturées, une consommation élevée de boissons sucrées et l'inactivité physique sont positivement associée à un risque plus élevé de DT2 (Kahn et *al.*, 2014; Wu et *al.*, 2014; Zheng et *al.*, 2017).

D'autres facteurs ont été étudiés, comme le microbiote intestinal, la pollution de l'air, les médicaments, la carence en vitamine D (Wu et *al.*, 2014; Zheng et *al.*, 2017) et l'interférence des heures de travail avec le temps de sommeil (Vetter et *al.*, 2015).

## I.2.4. Physiologie normal et physiopathologie du diabète type 2

### I.2.4.1. Bref aperçu de la glucorégulation normale

Le maintien à long terme des taux de glucose sanguin dans les normes, appelée homéostasie du glucose ; est une fonction physiologique clé (Henriksen et *al.*, 2011). Ceci est accompli par un

réseau très sophistiqué où le pancréas représente l'acteur clé, en sécrétant l'hormone hypoglycémisante insuline et son glucagon adversaire (Göke, 2008), par une collection de cellules appelées îlots de Langerhans (1 à 2 millions d'îlots), composé de cellules- $\alpha$  synthétisent le glucagon, les cellules- $\beta$  (60-70% des îlots de Langerhans) produisent de l'insuline, les cellules- $\delta$  et F des îlots (Thomas et al., 2012) (Figure 2).

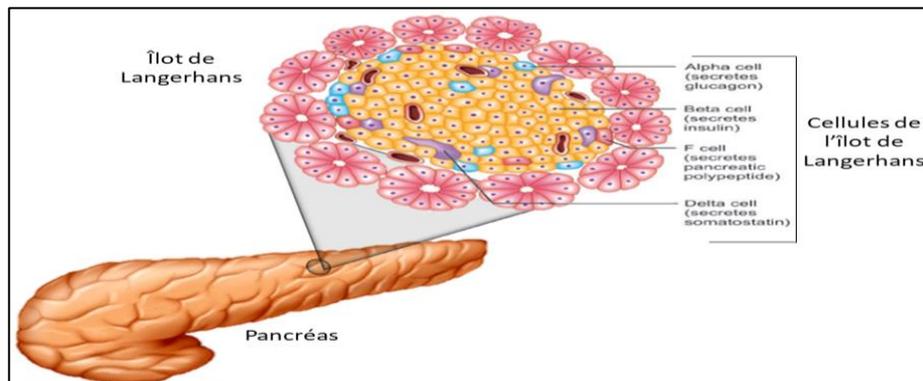


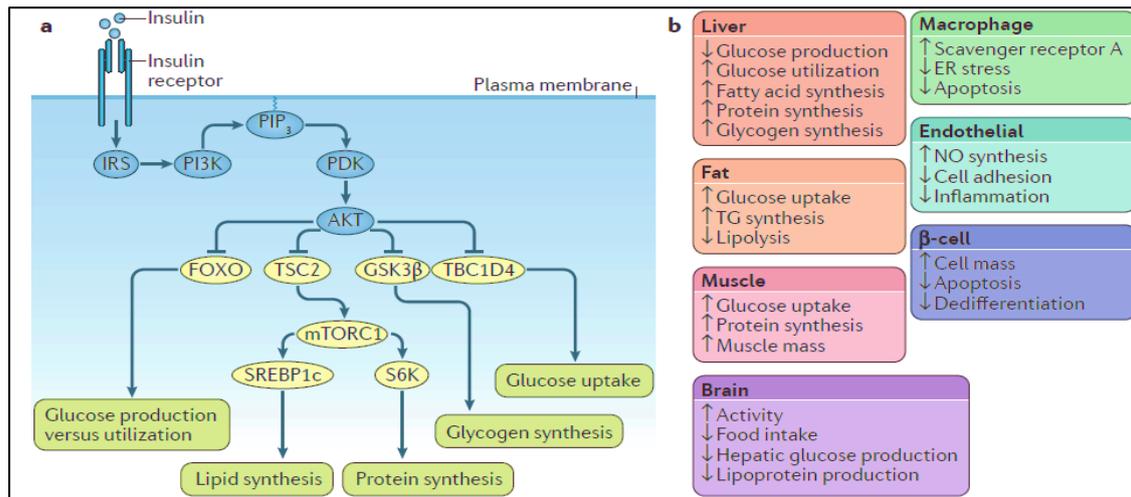
Figure 2| Cellules des îlots de Langerhans provenant du pancréas. (Original)

Pendant le sommeil ou entre les repas, lorsque les taux de glucose sanguin sont bas, le glucagon est libéré des cellules  $\alpha$  pour favoriser la *glycogénolyse* hépatique et, la *gluconéogenèse* hépatique et rénale pendant un jeûne prolongé. En revanche, la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  est stimulée par des taux élevés de glucose exogène, comme ceux qui surviennent après un repas (Röder et al., 2016) (Figure 1 annexe).

Pratiquement toutes les cellules de mammifères possèdent des récepteurs de l'insuline (RI) (Haeusler et al., 2017). Le récepteur, est une glycoprotéine composée d'un dimère des hétérodimères (( $\alpha \beta$ )<sub>2</sub>), la sous-unité  $\alpha$  qui lie l'insuline est extracellulaire, tandis que la sous-unité  $\beta$  est transmembranaire avec un domaine intracellulaire tyrosine kinase (Scapin et al., 2018). Les principaux tissus ciblés par l'insuline sont: le muscle, où l'insuline favorise l'absorption du glucose (*glycogénogenèse*) et la synthèse des protéines; le tissu adipeux, où l'insuline favorise l'absorption du glucose et des acides gras (*lipogenèse*) et inhibe la *lipolyse*; le foie, où l'insuline favorise l'utilisation du glucose (*glycogénogenèse*), supprime la production de glucose et favorise la synthèse des triglycérides (Haeusler et al., 2017; Röder et al., 2016) (Figure 3). L'entrée du glucose dans les cellules se fait par le processus de *diffusion facilitée* à l'aide des transporteurs de glucose, GLUT 1 à GLUT 7 (Thomas et al., 2012).

L'activation des récepteurs de l'insuline par son ligand initie une cascade d'événements de phosphorylation (Boucher et al., 2014) (Figure 3); tout d'abord, une modification conformationnelle et une autophosphorylation des récepteurs au niveau des résidus tyrosine, conduisant au recrutement et à la phosphorylation des substrats de récepteurs tels que les protéines

IRS et Shc. Shc active la voie Ras-MAPK qui contrôle la prolifération cellulaire et la transcription génique (pas montré dans la figure 3), alors que les protéines IRS activent principalement la voie PI3K-Akt en recrutant et en activant PI3K, conduisant à la génération du second messenger PIP<sub>3</sub> membranaire qui recrute et active PDK-1, cette dernière phosphoryle et active Akt. L'AKT activée continue à phosphoryler un certain nombre de substrats au niveau des résidus sérine/thréonine kinase qui intervient dans la plupart des effets métaboliques de l'insuline (**Boucher et al., 2014; Haeusler et al., 2017; Sah et al., 2016**) (Figure 3).



**Figure 3| Activation de la signalisation de l'insuline. a.** Activation du récepteur de l'insuline par son ligand; **b.** Effets de la signalisation de l'insuline dans divers tissus et types de cellules (**Haeusler et al., 2017**)

#### I.2.4.2. physiopathologie du diabète type 2

La résistance à l'insuline est définie par la diminution de l'action de l'insuline au niveau des tissus cibles, compris le foie, le muscle, le tissu adipeux, qui se traduit par des défauts de captation du glucose au sein de ces tissus et un moindre frein de la production de glucose par le foie en réponse à l'insuline, avec une diminution progressive de la fonction des cellules-β pancréatiques, liée à la réduction de leur masse (**Olokoba et al., 2012; Pratley, 2013**), ce qui éventuellement mène à l'hyperglycémie, la caractéristique de DT2 (**Cornell, 2015**).

La persistance de l'hyperglycémie conduit à la réabsorption incomplète du glucose dans le rein, qui sera alors sécrété dans l'urine, c'est la glycosurie. Cela augmente la pression osmotique de l'urine, donc le glucose conduira l'eau avec lui, entraînant une recrudescence de la production d'urine appelée polyurie. Cette dernière se manifeste le plus souvent la nuit, en créant des cycles de sommeil perturbés, ce qui rend les personnes atteintes fatigué pendant la journée. La perte d'eau et d'électrolytes conduit à une diminution du volume sanguin, qui est compensé par l'eau des cellules du corps, entraînant une déshydratation également une augmentation de la soif appelée polydipsie. La perte de poids est expliquée par la gluconéogenèse musculaire qui est due à l'incapacité du corps

du produire l'énergie. Quand le glucose ne peut pas pénétrer dans les cellules du centre de satiété, créant ainsi un sentiment de vouloir manger appelé polyphagie (**Adinortey, 2017**).

*Glucotoxicité, la lipotoxicité, Le stress oxydatif, le stress du réticulum endoplasmique (stress ER), les dépôts amyloïdes dans les îlots, et les altérations du microbiote intestinal ont été les principaux mécanismes d'explication de la résistance insulinaire et du dysfonctionnement des îlots. Fait intéressant, tous ces mécanismes sont associés à la réponse inflammatoire (Donath et Shoelson, 2011; Donath, 2014).*

#### **I.2.4.2.1. Le Diabète type 2 : une maladie auto-inflammatoire ?**

Des taux sanguin élevés des protéines de la phase aiguë, cytokines pro-inflammatoires et chimiokines ont été mis en évidence chez des patients atteints du DT2 (**Pickup et al., 1997**). En outre, des niveaux élevés d'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, CRP et IL-1RA dans l'obésité et le prédiabète ont été observé (**Herder et al., 2009; Pradhan et al., 2001**). La présence de ces cytokines traduit l'activation du système immunitaire chez ces patients.

Le tissu adipeux, le foie, les muscles et le pancréas sont des sites d'inflammation en présence d'obésité et de DT2 (**Esser et al., 2014**), et les niveaux excessifs de nutriments, y compris le glucose et les acides gras libres (AGL) stressent ces tissus, conduisant à la production local et à la libération de cytokines et chimiokines (**Donath et Shoelson, 2011**). Ces cellules et molécules de système immunitaire favorisent la résistance à l'insuline en interférant avec la signalisation de l'insuline par l'activation des voies du facteur nucléaire-kappa B (NF- $\kappa$ B) et Jun N-terminal kinase (JNK), dont le foie et le tissu adipeux (**DeFronzo et al., 2015; Esser et al., 2014**).

L'exposition prolongée des cellules  $\beta$  à des concentrations élevées de glucose et d'AGL augmente l'activité métabolique de ces cellules, conduisant à une formation élevée d'*espèces réactives de l'oxygène* (ROS), qui favorise l'activation de l'*inflammasome* NLRP3 et de la caspase 1, permettant ainsi la production de l'IL-1 $\beta$  (Figure 4) (**Maedler et al., 2002**). L'inflammasome peut aussi être activé par un stress de RE qui est dû à l'augmentation de la demande et de la production d'insuline. En outre, les AGL activent le récepteur Toll-like 2 et 4 (TLR2/4), ce qui conduit à l'expression des molécules pro-inflammatoires via NF- $\kappa$ B et l'activation de l'IL-1 $\beta$ ; ce dernier peut être amplifiés par un cycle d'autostimulation, ceci est probablement une conséquence de l'expression abondante de l'IL-1R1 par les cellules  $\beta$  (Figure 4) (**Donath et Shoelson, 2011; Donath, 2014**).

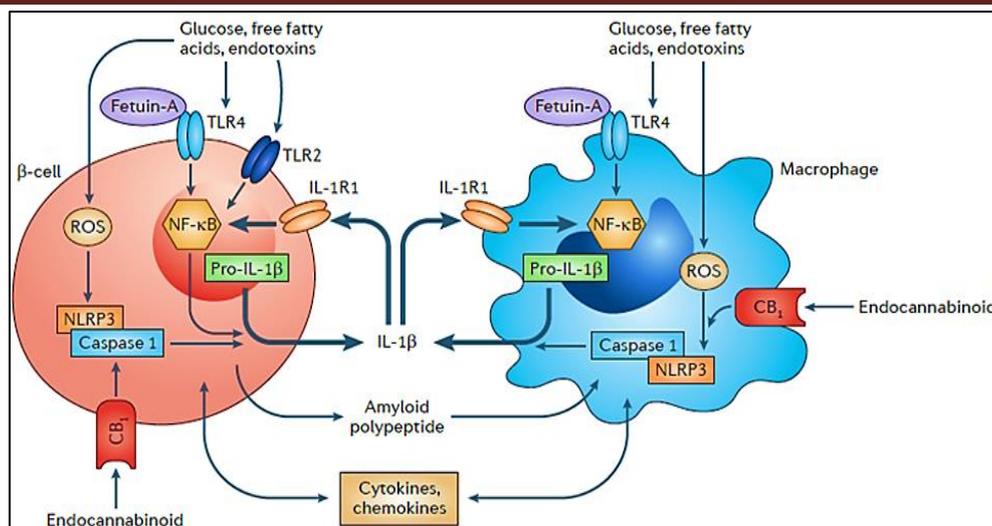


Figure 4| L'inflammation des îlots dans le diabète de type 2. (Donath, 2014)

L'activation de l'IL-1 $\beta$  induit la production d'une large gamme de cytokines et chimiokines telles que IL-6, IL-8, TNF, CCL2, CCL3 et CXCL8 qui conduisent au recrutement des macrophages et autres cellules immunitaires (Butcher *et al.*, 2014; Ehses *et al.*, 2007). Les macrophages recrutés peuvent ensuite être activés par le polypeptide amyloïde des îlots humains, pour favoriser la synthèse de l'IL-1 $\beta$  (Figure 4) (Donath, 2014). Cette inflammation locale peut réduire la sécrétion d'insuline et déclencher l'apoptose des cellules  $\beta$  conduisant à une diminution de la masse des îlots, tous des événements critiques dans la progression du DT2 (Esser *et al.*, 2014).

L'inflammation a également été détectée dans les tissus adipeux. Le stockage de nutriments excessifs et l'accumulation de lipides intracellulaires est traduit par une hypertrophie, qui provoque une réponse pro-inflammatoire et une résistance à l'insuline par l'hypoxie et le stress du RE, entraînant finalement l'apoptose. En outre, comme dans les îlots et les tissus sensibles à l'insuline, les AGL peuvent activer le TLR2/4 conduisant ainsi à la libération médiée par NF- $\kappa$ B de cytokines et de chimiokines qui favorisent alors l'accumulation de diverses cellules immunitaires, dont les macrophages, les mastocytes et les cellules T (Donath et Shoelson, 2011; Donath, 2014).

Le recrutement des macrophages du tissu adipeux (MTA) est corrélé avec le degré d'obésité et est lié à l'inflammation systémique, à la résistance à l'insuline et au syndrome métabolique (Esser *et al.*, 2014), où ils subissent un switch de phénotype *M2 anti-inflammatoires* à un phénotype *M1 pro-inflammatoires*, ces derniers contribuent au développement de la résistance à l'insuline (Figure 5) (Donath et Shoelson, 2011). Un nombre accru des cellules T CD8 effectrices, a été mis en évidence, qui recrute et active les MTA et promouvoit les cascades pro-inflammatoires (Osborn, et Olefsky, 2012). L'obésité induit également un déséquilibre entre les sous-ensembles pro-inflammatoires Th 1

et Th 17 et anti-inflammatoires Th 2 et Trég, (Figure 5) (Esser *et al.*, 2014). En outre, Le rôle des cellules NKT dans le DT2 et l'insulino-résistance reste très controversé (Tard, 2015).

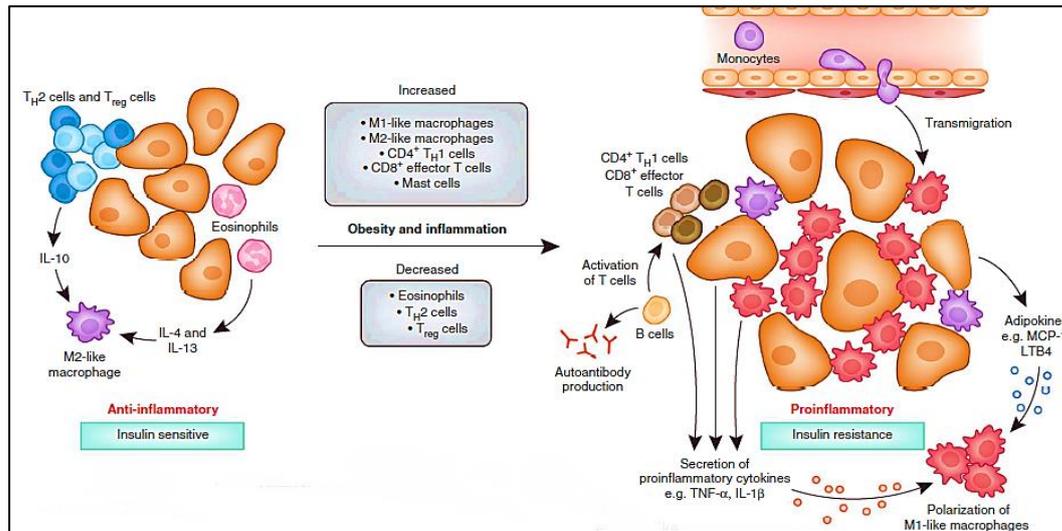


Figure 5| Les cellules immunitaires médient l'inflammation dans le tissu adipeux. (Osborn *et al.*, 2012)

D'autres types de cellules peuvent également participer au processus inflammatoire. Les cellules endothéliales du tissu adipeux qui augmentent l'expression des protéines d'adhésion en réponse à l'augmentation de l'adiposité, par exemple, ICAM-1 et VCAM-1 se lient aux intégrines des monocytes pour les recruter dans les tissus (Figure 5) (Shoelson *et al.*, 2006). Des altérations similaires ont été observées dans d'autres tissus sensibles à l'insuline, en particulier le foie (Donath, 2014).

### I.3. les complications du diabète type 2

Diabète type 2, s'il demeure non diagnostiqué pendant une période prolongée, des complications liées à l'hyperglycémie chronique peuvent se développer (FID, 2017). Au niveau des vaisseaux sanguins, l'hyperglycémie chronique conduit à un stress oxydatif puis à un dysfonctionnement de l'endothélium, qui se caractérise par une vasoconstriction, thrombose, inflammation et lésions (Giacchetti *et al.*, 2005). Sur l'organisme, ces défauts vont conduire à des complications chroniques microvasculaires en raison de dommages aux petits vaisseaux sanguins (compris la rétinopathie, néphropathie, neuropathie); et macrovasculaires en raison de dommages causés aux gros vaisseaux sanguins (athérosclérose et maladies cardiovasculaires). Leur présence contribue à la mortalité et à la perte de qualité de vie (Chawla *et al.*, 2016; Yamazaki *et al.*, 2018).

L'obésité, l'insulino-résistance et l'hyperglycémie chronique, toutes situations rencontrées dans le DT2, entraînent des agressions métaboliques, et en particulier l'accumulation massive dans le foie d'acides gras libres connus pour être hépato-toxiques. Aujourd'hui le DT2 est une cause

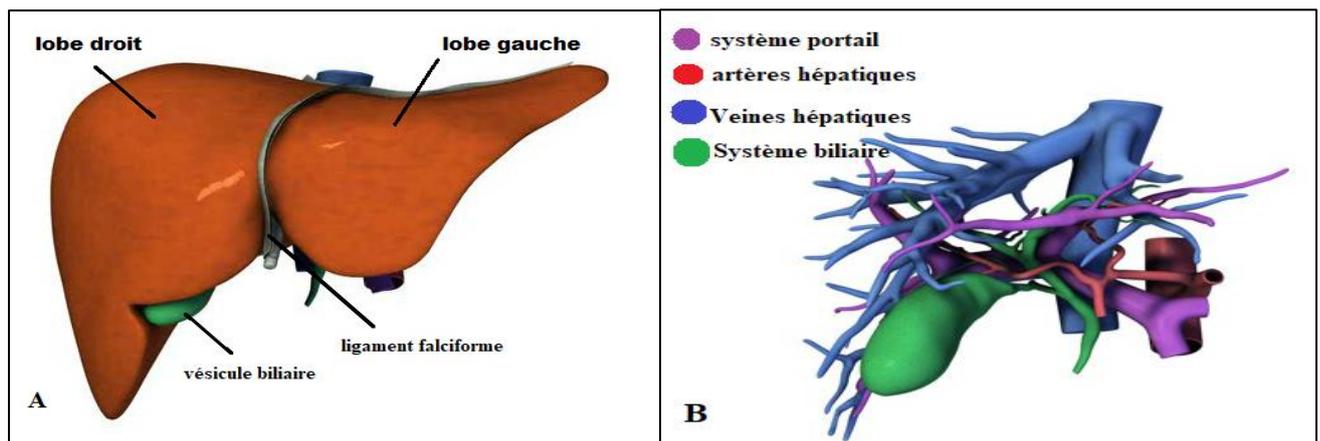
d'atteinte hépatique grave telle la stéatose hépatique non alcoolique, dont sa prévalence augmente parallèlement à celle du DT2 (Esser *et al.*, 2014 ; Hu *et al.*, 2017).

### **I.3.1. Le foie, une autre victime du diabète de type 2**

#### **I.3.1.1. Organisation, structure et fonctions du foie**

##### **I.3.1.1.1. Anatomie du foie**

Le foie est un organe volumineux, pesant environ 1,0-1,5 kg chez les adultes humains. Présente une forme générale d'un prisme, avec sa base vers la droite et son sommet vers la gauche. Il est de couleur brune rosée, de consistance molle, très vasculaire (Gray et Lewis, 2000). Il se situe sous le diaphragme, dans la partie supérieure droite de la cavité abdominale et est presque entièrement protégé par la cage thoracique, avec des ligaments aidant à lui maintenir en place. Classiquement, le foie est divisé en deux grands lobes, droit et gauche, séparés par un ligament falciforme et deux petits lobes centraux, carré et caudés. La vésicule biliaire est attachée au foie à la limite du lobe carré et du lobe hépatique droit (Figure 6. A). Il est entouré d'une capsule lisse de tissu conjonctif appelée capsule de Glisson (Cotoi et Quaglia, 2016; Sparks, 2017). En 1957, Claude a proposé une subdivision du foie en huit segments, basée sur la distribution intrahépatique des veines porte et hépatique, dont les segments V, VI, VII et VIII forment le lobe droit, II, III et IV le lobe gauche, tandis que le segment I forme le lobe dorsal. Ces divisions anatomiques sont importantes pour les interventions chirurgicales (Couinaud,1957).



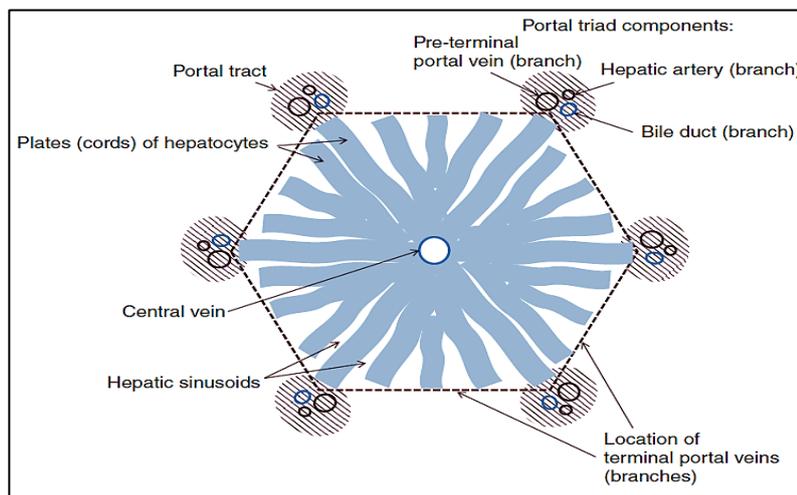
**Figure 6] anatomie du foie humain. A : anatomie commune du foie ; B : vascularisation du foie. (Jodi crossingham, 2008)**

Le foie est fortement vascularisé (Figure 6. B). Il reçoit un flux sanguin d'environ 1,5-2,0 l/m pour un adulte. Ce flux sanguin provient de deux vaisseaux majeurs: l'artère hépatique, qui fournit au foie un sang riche en oxygène provenant du cœur et la veine porte, qui draine le sang

provenant de l'œsophage, de l'estomac et des intestins, il s'agit d'un sang pauvre en oxygène mais riche en nutriments (Oriana et Denis, 2015). Ces deux vaisseaux, entrent dans le foie au niveau du hile, et se divisent en plusieurs branches pour alimenter les différentes parties (Sparks, 2017). Après avoir irrigué l'ensemble des cellules du foie, le sang artériel et portal se mélange finalement dans les sinusoides hépatiques avant de se drainer dans la circulation systémique via le système veineux sus-hépatique qui se jette dans la veine cave inférieure (Abdel-Misih et Bloomston, 2010).

### **I.3.1.1.2. Histologie**

L'unité structurale classique du foie est le lobule de Kiernan hépatique, qui possède une forme grossièrement hexagonale (Kiernan, 1833) et est centré par une veinule hépatique terminale (veine centrolobulaire VCL) dont la périphérie est délimitée par des espaces portes (EP), chacun est formé par une triade portale. Celle-ci est composée de l'artère hépatique, d'une voie biliaire et de la veine porte (Figure 7). Dans certaines espèces (mais pas humain), comme le porc le lobule est délimité par de fins septa de tissu conjonctif mettant bien en évidence une unité structurale. Le parenchyme hépatique est composé principalement d'hépatocytes, qui s'organisent sous forme des travées (cordes) hépatocytaires, séparées par des capillaires sinusoidaux qui s'organisent sous forme de réseaux anastomosés, où le sang circule lentement vers la VCL. Celles-ci se rejoignent pour former la veine sus-hépatique qui se jette dans la veine cave inférieure. Plus récemment, l'*acinus hépatique* est considéré comme l'unité fonctionnelle du foie (Sparks, 2017; Young et al.; 2017).



**Figure 7| Ingénierie des tissus hépatiques. (Sparks, 2017)**

Le foie est composé de plusieurs types cellulaires, chacune ayant un rôle bien particulier, compris : les hépatocytes, responsables de nombreuses fonctions métaboliques et synthétiques du foie (Blouin et al., 1977). Sont de grandes cellules épithéliales avec un noyau arrondi et central, dont la taille est variable en fonction de l'état de la cellule et un cytoplasme très abondant et

granulaire, sa richesse en organites cytoplasmiques témoigne d'une grande activité métabolique (Young et al.; 2017).

Les cellules bordant les sinusoides. Ces cellules appartiennent à au moins trois types cellulaires celle qui tapissent les parois des sinusoides hépatiques, sont des cellules endothéliales plates, se distinguent facilement des hépatocytes par leurs noyaux aplatis, condensés, et leur cytoplasme de taille réduite, peu coloré. Parmi ces cellules, se trouvent de grosses cellules renflées, phagocytaires, avec des noyaux ovalaires, les cellules de Kupffer, appartiennent au système de défense monocyte-macrophage. Le troisième type cellulaires correspond à des cellules difficilement identifiables au microscope optique, appelées cellules étoilées (cellules de Ito, Stellate). Elles possèdent deux fonctions, le stockage de la vitamine A et la production de la matrice extracellulaire et de collagène, qui en cas de lésion hépatique, produisent de très importantes quantités de collagène responsable de la fibrose, caractéristique de la cirrhose hépatique (Grisham, 2009; Young et al.; 2017). On trouve aussi les lymphocytes et les cellules dendritiques (Fig.2 annex) (Racanelli et Rehmann, 2006).

### **I.3.1.2. Fonctions hépatique**

Les nutriments sont absorbés au niveau de l'intestin grêle et, après passage par la veine porte, vont se heurter à une première barrière, le foie. Il va les stocker, éventuellement les transformer, avant de les redistribuer dans la circulation générale. Son activité métabolique est étroitement contrôlée par l'insuline et d'autres hormones métaboliques (Rui, 2014).

**Métabolisme glucidique :** À l'état de jeun, le foie sécrète du glucose à la fois par dégradation du glycogène (glycogénolyse) et par synthèse de novo (gluconéogenèse) à partir de précurseurs non glucidiques tels que le lactate, les acides aminés et le glycérol. A l'état nourri, le foie peut stocker le glucose sous forme de glycogène par l'activation de la voie de la glycogénèse et / ou le convertir en acides gras ou en acides aminés (Postic et al., 2004; Rui, 2014 ; Rines et al., 2016).

**Métabolisme protéique :** Le foie synthétise également des protéines plasmatiques essentielles pour l'organisme comme l'albumine et des facteurs de coagulations, la synthèse des acides aminés (AA) non essentiels et la détoxification des déchets métaboliques (désamination des AA et production d'urée) (Young et al.; 2017).

**Métabolisme lipidique :** Le foie est l'organe principal qui convertit les glucides en acides gras grâce à la lipogenèse de novo. Les hépatocytes obtiennent également des acides gras de la circulation sanguine, qui sont estérifiés soit pour être stockés dans des gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes, soit sécrétés dans la circulation sous forme de particules de lipoprotéines de densité

très faible (VLDL). Les acides gras sont également incorporés dans les phospholipides, qui sont un composant essentiel des membranes cellulaires. Le jeûne favorise également la lipolyse, où les acides gras sont oxydés principalement dans les mitochondries pour générer de l'énergie via la  $\beta$  oxydation (**Rui, 2014**).

**Phagocytose / immunité:** Parce que le foie est constamment exposé aux antigènes de l'intestin ainsi qu'aux faibles taux d'endotoxines bactériennes, de nombreux mécanismes suppriment une activation «accidentelle» du système immunitaire. Les cellules de Kupffer des macrophages jouent un rôle majeur dans la phagocytose des antigènes, le maintien de la tolérance immunologique dans le foie et dans la fourniture d'un micromilieu anti-inflammatoire pendant l'homéostasie (**Ju et Tacke, 2016**). La phagocytose des cellules apoptotiques aussi jouant un rôle majeur dans l'homéostasie tissulaire générale dans des conditions physiologiques et pathologiques (**Dini et al., 2002**).

D'autres fonction, compris la détoxification des médicaments et des toxiques, ainsi que la synthèse et sécrétion de la bile sont l'une des principaux fonctions du foie (**Young et al.; 2017**).

### **I.3.1.3. Stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD)**

La stéatose hépatique non alcoolique est définie par une accumulation de vacuoles lipidiques dans le cytoplasme d'au moins 5-10% d'hépatocytes, ceux-ci n'en contenant normalement que des traces non observables en microscopie optique (**Burt et al.; 1998**). La stéatose, englobe un large éventail de maladies hépatiques, elle est généralement considérée comme une lésion bénigne, qui se progresse vers un stéato-hépatite (NASH) avec inflammation, et peut éventuellement évoluer vers une cirrhose du foie et le carcinome hépatocellulaire (CHC) (Figure 3, A.B annexe) (**Hu, 2017; Ismail, 2011**).

La stéatose peut ainsi se présenter sous deux formes : macrovacuolaire, la plus fréquente, où les gouttelettes de stéatose refoulent le noyau en périphérie de la cellule, et peuvent à l'extrême provoquer une rupture des membranes cellulaires ; microvacuolaire, rare, où le noyau reste central et où les vacuoles, très petites, peuvent être difficiles à voir (**Gluchowski et al., 2017**).

La NAFLD n'est pas causée par l'abus d'alcool, mais elle est considérée comme la manifestation hépatique de l'insulino-résistance, l'obésité, diabète de type 2, dyslipidémie et hypertension. Le stress oxydatif également joue un rôle important dans le développement et la progression de la maladie (**Giorda et al., 2017; Petta et al., 2009**).

### I.3.1.3.1.. Physiopathologie de la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD)

La pathogénèse de la NAFLD reste basée sur l'hypothèse «two hits» proposée en 1998 (Figure 8) (Day et James 1998) et récemment réactualisée comme une hypothèse «multi-hits» (Lewis et Mohanty 2010). Dans ce modèle, l'insulino-résistance et un métabolisme dérégulé des acides gras libres («first hit») induit une accumulation de lipides dans le foie (stéatose) favorise la lipotoxicité et rendre le foie plus sensible aux blessures potentielles. Des médiateurs inflammatoires, des espèces réactives de l'oxygène et une altération de l'apoptose constituent des «second hits» caractérisés par la survenue d'une inflammation : la stéatohépatite (NASH) (Lewis et Mohanty, 2010).

Les sujets avec NAFLD sont hautement résistants à l'insuline au niveau de muscles parce qu'ils présentent une absorption réduite de glucose ; foie parce qu'ils présentent une altération de la suppression de production de glucose endogène hépatique ; et le tissu adipeux, car ils présentent des taux lipolytiques élevés et des AGL circulants accrus (Marra et al., 2008).

Plusieurs mécanismes peuvent entraîner une stéatose, notamment: une augmentation de l'apport de graisses en raison d'un régime riche en graisses ou d'une libération accrue d'acides gras à partir des adipocytes (lipolyse excessive); ou 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). Certaines cytokines inflammatoires, en particulier celles dérivées de tissus adipeux extra-hépatiques, et la résistance à l'insuline sont l'une des mécanismes moléculaires responsables de l'accumulation de graisse dans le foie et notamment l'apparition de la NAFLD (Mezale et al., 2017).

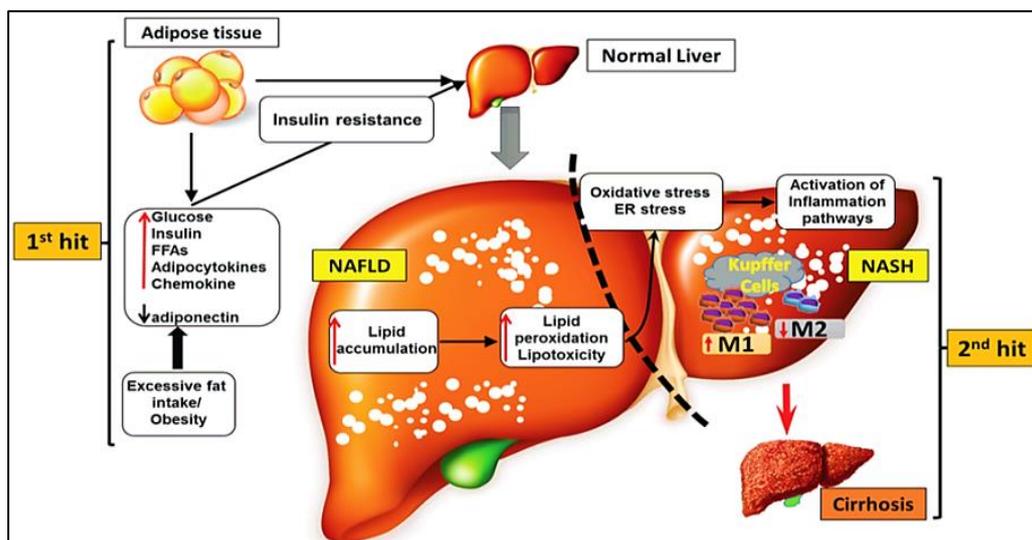


Figure 8| les mécanismes pathogènes pendant la progression vers la stéatohépatite NASH. ( Xu et al., 2015).

### **I.3.1.3.2. Steatohépatite non alcoolique (NASH) et inflammation**

La NASH, cause de cirrhose et de carcinome hépatocellulaire, se caractérise par une infiltration graisseuse du foie (stéatose), une inflammation, une atteinte hépatocellulaire et une fibrose (**Mezale et al., 2017**). La dérégulation métabolique, l'altération mitochondriale et le stress oxydatif, l'insulino-résistance jouent un rôle important dans la détermination des dommages hépatocytaires et entraînent de profonds changements dans l'expression des gènes, menant finalement à l'apoptose et contribuant au processus inflammatoire (**Mezale et al., 2017**).

Les dommages aux hépatocytes conduisent à l'activation des voies de signalisation intracellulaires, ce qui conduit à l'expression de plusieurs cytokines responsables du recrutement des cellules inflammatoires (neutrophiles, cellules mononucléaires). Les lésions hépatiques affectent également la biologie d'autres cellules hépatiques, telles que les cellules de Kupffer, qui deviennent activées et contribuent à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-6). Enfin, les cellules endothéliales sinusoidales sont importantes pour l'interaction avec les leucocytes circulants, à travers l'expression de molécules d'adhésion. La plupart des cellules résidentes du foie sont ciblées par des adipokines sécrétées par le tissu adipeux viscéral. Ces événements mènent à un cercle vicieux qui aggrave les dommages au foie, aggrave l'inflammation, maintient la stéatose, la progression de la maladie et la résistance à l'insuline (**Marra et al., 2008**).

La mort des hépatocytes par apoptose ou nécroptose est augmentée dans la NASH par rapport à la stéatose simple et conduit à la libération des fragments de cytokeratine 18. La stéatose hépatique dans ce contexte est associée à l'activation du NF $\kappa$ B qui fonctionne comme un interrupteur principal pro-inflammatoire au cours de l'inflammation. Il régule à la hausse la transcription d'un large éventail de médiateurs inflammatoires, y compris TNF $\alpha$ , IL6, IL1 $\beta$ , CRP, IL-8 et CXCL10 (**Cotoi et Quaglia, 2016; Wong et al., 2018**).

### **I.3.1.3.3. Fibrose**

Les cellules activées de Kupffer sécrètent non seulement des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF $\alpha$  et l'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 (**Hu et al., 2017**). La fibrose survient en premier lieu dans les régions où la lésion est la plus grave sur plusieurs mois ou plusieurs années. Ce processus implique le dépôt de la matrice extracellulaire dans le parenchyme (**Cotoi et Quaglia, 2016**).

### **I.3.1.3.4. Cirrhose**

La cirrhose, le stade terminal du processus fibrotique, est une maladie hépatique chronique irréversible, caractérisée par la formation de septum et de nodules (**Cotoi et Quaglia, 2016**) qui altèrent peu à peu la fonction hépatique par l'obstruction de la circulation sanguine). et préviennent le déroulement normal des fonctions de métabolisme et de régulation de l'organe. Les septa contiennent des cellules inflammatoires, de nombreux canaux vasculaires et des structures ductulaires (**Brunt, 2010**). Une fois que la cirrhose s'installe, un patient est à risque de développer une hypertension portale et un carcinome hépatocellulaire CHC (**Wong et al., 2018**).

### **I.4. Diabète type 2 expérimental**

En raison de l'interaction complexe entre les facteurs génétiques et environnementaux, les mécanismes physiopathologiques et la complexité des altérations du système immunitaire mal comprise chez les humains, le nombre des questions non encore résolus, le besoin urgent de traitements et de schémas thérapeutiques plus efficaces (**Skovsø, 2014**) ainsi que les limites éthiques dans la réalisation d'études in vivo chez l'homme, de nombreux modèles animaux qui miment la maladie humaine sur une échelle de temps plus courte ont été établis. Ces modèles fournissent l'opportunité d'évaluer l'apparition, le développement et la progression de la maladie, de contribuer à la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents au DT2 et d'offrir des nouvelles perspectives dans les études biomédicales et pour mieux évaluer les complications associées au diabète (**Franconi et al., 2008**).

Cependant, pour qu'un modèle animal soit pertinent, les caractéristiques du modèle devraient refléter la physiopathologie et l'histoire naturelle du diabète et il devrait développer des complications du diabète avec une étiologie similaire à celle de la condition humaine (**Cefalu, 2006**). Sur cette base, les modèles animaux doivent être soigneusement sélectionnés (**Al-Awar et al., 2016**).

Un large éventail de modèles animaux de DT2 existe, ayant une causalité spontanée, génétique, expérimentale ou nutritionnelle. Chacune a ses propres avantages et inconvénients (**Sah, 2016 ; Srinivasan et Ramarao, 2007**). Ces modèles animaux ont tendance à inclure des modèles de résistance à l'insuline et / ou des modèles d'insuffisance de cellules  $\beta$ . D'autre part, plusieurs modèles de DT2 sont obèses, reflétant la condition humaine où l'obésité est étroitement liée au développement du DT2 (**Al-Awar et al.2016 ; King, 2012**). La capacité d'un modèle animal à développer d'abord l'obésité, pour finalement développer le diabète, est l'un des plus importants critères de sélection d'un modèle (**Chatzigeorgiou et al., 2009**).

Cette étude a pour objectifs de mettre en évidence l'effet du régime hypercalorique sur l'induction du diabète type 2 chez un modèle murin, *Psammomys obesus*, de faire la corrélation cause à effet entre l'évolution du diabète type 2 et l'apparition des altérations cellulaires et moléculaires hépatiques ; de vérifier leur susceptibilité vis-à-vis la stéatose hépatique non alcoolique et de son évolution à la stéatohépatite non alcoolique et fibrose. Notre étude était réalisée au niveau de laboratoire de biochimie et modalisation moléculaire à l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB), et au laboratoire d'Anatomie Pathologique du centre hospitalo-universitaire Djilali Bounaama, Douéra où nous avons effectué la partie histologique et immunohistochimique qui à durer deux mois.

## **II.1. MATÉRIEL**

### **II.1.1. Matériel biologique**

#### **II.1.1.1. Les rats : *Psammomys obesus* et son biotope**

Notre étude a porté sur des rats des sables *Psammomys Obesus* (Figure 9). *Psammomys* est un rongeur herbivore, diurne de la famille des Muridae, sous famille des gerbillinae. Il a été décrit pour la première fois par CRETZSCHMAN en 1828 (*Psammomys obesus* cretzenschman).

Dans son milieu naturel, les régions semi-désertiques du nord de l'Afrique, cette gerbille se nourrit des halophiles de la famille des chénopodiacées pauvres en calories (0,4 Kcal/g pour *Salsola foetida* par exemple) et riches en sels minéraux (chlorure de sodium notamment).

#### **Classification phylogénique des *Psammomys Obesus* :**



**Figure 9| *Psammomys obesus* au laboratoire (originale).**

Règne: Animalia

Sous-famille: Gerbillinae

Genre: *Psammomys*

Espèce : *Psammomys obesus*

Embranchement: Chordata

Classe: Mammalia

Sous-classe: Theria

Infra-classe: Eutheria

Ordre: Rodentia

Sous-ordre: Myomorpha

Famille: Muridae

### **II.1.1.1.1. Ecophysiologie de l'animal**

Le *Psammomys* est le seul Gerbillidé diurne qui vit seul ou en petits groupes. Il pèse à l'état adulte, entre 80 et 200gr ; avec une petite taille (130-160mm), un pelage fauve, de petites oreilles (10-12 mm), une queue aussi longue que le reste du corps (115-140mm). Il atteint une longévité de trois ans.

*Psammomys* est un rongeur actif, intelligent, calme et familier et très organisé, il vit seul ou en petits groupes, dans des terriers très profonds qu'il creuse (jusqu'à un mètre), ces terriers le protègent de la température extérieure où l'humidité est importante (50 à 80%) et communique à l'intérieur par des galeries à plusieurs étages et avec plusieurs sorties (moyen de fuite aux prédateurs). Ses terriers se trouvent sous les masses de buissons de plantes halophiles dont il se nourrit en découpant leurs tiges en petits rameaux qu'il emmagasine dans son terrier, la température de ses terriers varie entre 20 et 22°C sur toute l'année.

Les mâles et les femelles vivent séparément sauf en périodes de reproduction (Octobre-Mai), où les conditions climatiques deviennent favorables. La gestation dure 25 jours, le développement post-natal est rapide bien que l'allaitement continu jusqu'à la 4ème semaine. Le rat des sables diminue des déperditions hydriques en produisant une urine très concentrée.

Le métabolisme du *Psammomys obesus* est bien adapté à une alimentation hypocalorique. Cela, lui permet une accumulation constante de graisses dans le tissu adipeux pour couvrir ses besoins en période de pénurie. Ce métabolisme, connu sous le nom «Métabolisme économe » est activé lorsque l'apport en nutriments est élevé. Ces animaux vivent dans des conditions climatiques drastiques, avec des aliments restreints, c'est pourquoi ils ont développé une stratégie alimentaire et des mécanismes d'adaptation comportementaux et physiologiques, leur permettant de vivre normalement dans un tel biotope et de ne développer aucune maladie métabolique (El-aoufi et al., 2007; Zoltowska et al., 2004).

On peut également noter que cet animal, est un hôte intermédiaire du parasite *Leishmania tropica* qui est transmis à l'homme par le phlébotome *Phlebotomos* sp. (Kalman et al., 2012).

### **II.1.1.2. Prélèvements**

- ❖ Des prélèvements sanguins.
- ❖ Des prélèvements d'organes : notre organe d'intérêt est le foie des *psammomys obesus*.

### **II.1.1.3. les anticorps**

Dans la présente étude nous avons utilisé différents anticorps, dans le but d'évaluer le statu immunitaire, et la nature de l'infiltrat inflammatoire et le statu apoptotique des cellules de notre tissu d'intérêt (le foie). Cela est réalisé par le biais des anticorps primaires suivants:

- ❖ Anticorps monoclonal anti-CD3, dirigé contre l'antigène membranaire CD3, représente le marqueur de lignage des lymphocytes T le plus spécifique et le plus sensible, y compris NK et NKT
- ❖ Anticorps monoclonal anti-CD163, pour la détection des macrophages de tissu hépatique (les cellules du Kupffer) qui exprime l'antigène CD163 à la surface. l'expression régulée à la hausse de ce récepteur est l'un des changements majeurs dans le passage des macrophages de phénotype M2 à d'autres phénotypes activés M1 dans l'inflammation.
- ❖ Anticorps monoclonal anti-BCL2, pour la détection des cellules contenant l'antigène BCL2, qui est une protéine membranaire mitochondriale qui bloque la mort apoptotique (anti-apoptotique).

### **II.1.2. Matériel non biologiques**

La réalisation de notre étude nécessite l'utilisation d'une variété d'appareillages et de réactifs. L'ensemble du matériel est illustré dans le tableau II de l'annexe.

## **II.2. Méthodes**

### **II.2.1. Mise en œuvre expérimentale (Figure 4. Annexe)**

#### **II.2.1.1. Capture des animaux**

Notre étude a porté sur 25 psmmomyss obesus dont le poids corporel varie entre 120 et 160g, capturés dans la région de M'Sila-Biskra.

La chasse commence à 8h du matin jusqu'à midi. Les différentes étapes de la chasse sont résumées dans la Figure 10.



Figure 10| Les différentes étapes de la chasse du *Psammomys obesus* (original, 2017)

La capture des animaux consiste à inonder les terriers à partir du trou le plus élevé à l'aide d'un camion-citerne. Les animaux sont saisis à la main gantée à la sortie des autres orifices. Cette méthode est très rentable car nos rongeurs creusent leurs terriers sur des terrains argileux et les galeries sont très profondes. On récupère les *Psammomys obesus* dans des grandes cages où les plantes leurs sont données « ad libitum » jusqu'à leur arrivée à l'animalerie de l'USTHB.

### **II.2.1.2. Conditionnement de l'animal au laboratoire**

Avant toute expérimentation, les animaux sont soumis à une période d'acclimatation aux conditions de température et d'hygrométrie du laboratoire.

Dès leur arrivée à l'animalerie, les animaux sont placés dans des cages individuelles en plastique équipées d' :

- ❖ Une litière en sciure renouvelée trois fois par semaine.
- ❖ Une petite cage en bois (18cm×18cm×11cm) munie de deux ouvertures qui permettent à l'animal d'entrer et de sortir et de recréer les conditions naturelles de son terrier.
- ❖ Des morceaux de bois pour aiguïser ses incisives dont la croissance est trop rapide.

Dans l'animalerie la température est réglée 24 à 26°c et le degré hygrométrique 60 à 80%.

### **II.2.1.3. Répartition des lots**

Après 2 semaines qui caractérise la période d'adaptation ; les animaux ont été divisés en 2 lots :

**A. lot témoin :** Il comporte 10 *Psammomys* qui continuent à recevoir le régime naturel jusqu'au moment du sacrifice. La prise journalière de l'animal est de 50g/j ce qui correspond à 20-22 cal/j.

**B. Lot expérimental :** Il est constitué de 15 *Psammomys* soumis au régime hypercalorique sous forme de cookies pendant une période de 9 mois avec une prise journalière de 10g ce qui correspond à 32,5 cal/j ; Les animaux ont reçu 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.

### **II.2.1.4. Le régime alimentaire**

Le régime naturel (RN) de *Psammomys* est constitué de plantes halophiles de la famille des chénopodiacées de différentes espèces :

- Traganum nudatum*, *salsola foetidia* et ;
- suaedia mollis*.

Les photographies de la figure 11 montrent les différentes plantes halophiles, de la famille des chénopodiacées et l'aspect du biotope de ces plantes.

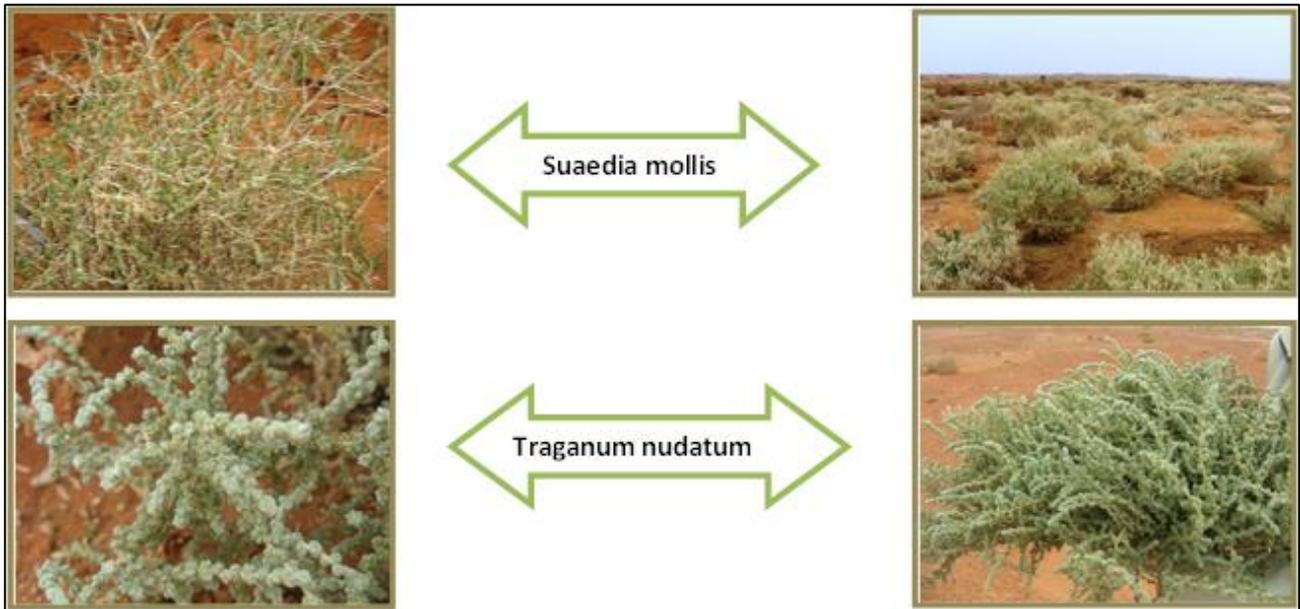


Figure 11| Les différentes plantes halophiles, de la famille des chénopodiacées (original, 2017)

A leur arrivée au laboratoire, nous avons continué de nourrir les *Psammomys* de plantes halophiles de leur milieu pendant une semaine, que nous avons remplacé progressivement par d'autres plantes de la même famille qui poussent en bordure de mer (Anse de Kouali à Tipaza).

Le régime naturel est caractérisé par une teneur en eau de 80,8% et en sels de 6,9%. La valeur énergétique des plantes fraîches est estimée à 450 calories/kg, avec une prise journalière de 50g/j ce qui correspond à 20-22 cal/j. Par contre, la valeur énergétique du régime hypercalorique (RHC) de laboratoire est estimée à 325 cal/ 100g de tout aliment.

Le tableau II donne la composition en nutriments du régime naturel (RN), hypocalorique et de laboratoire standard, hypercalorique (RHC).

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

Tableau II| La composition alimentaire pour 100g de régime naturel et hypercalorique.

### **II.2.1.5. Contrôle du poids corporel**

Afin de contrôler l'évolution du poids corporel, les animaux sont pesés régulièrement de façon hebdomadaire.

### **II.2.1.6. Prélèvement sanguin**

Pour l'analyse des paramètres biochimiques, des prélèvements sanguins sont effectués mensuellement sur l'animal vigile par des ponctions au niveau du plexus rétro-orbital de l'œil (Figure 12), à l'aide d'une pipette pasteur préalablement héparinée. Le sang est prélevé sur des tubes héparinés pour l'évaluation des différents paramètres biochimiques (Glucose, Cholestérol, Triglycérides et insuline). Après centrifugation, les sérums et plasmas sont récupérés et conservés à -80°C. Afin d'éviter l'influence du nyctémère, les piqûres de sang ont été pratiquées systématiquement à jeun entre 8h et 10h, chez les animaux ayant jeûné pendant 18h.



**Figure 12| Prélèvements sanguins au niveau du sinus rétro orbital de l'œil du *Psammomys obesus*. (Original, 2017)**

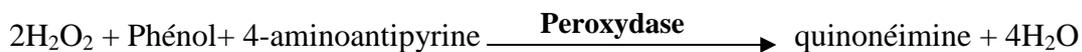
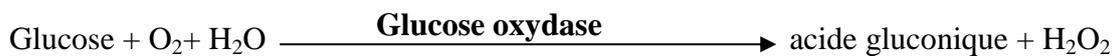
### **II.2.1.7. Prélèvement des organes**

Après une durée de 9 mois et au terme de l'expérimentation, les animaux sont sacrifiés chaque trois mois après anesthésie par une injection intra péritonéale d'uréthane 25%, à raison de 0,4 ml/100g du poids corporel. Pour l'étude de l'apparition des altérations cellulaires et moléculaires hépatique dus à l'évolution du diabète, le foie de *psammomys* est prélevé et rapidement rincé à l'eau physiologique, puis fixés dans le formol 10%, pour la réalisation des coupes histologiques et la réalisation de l'étude immunohistochimique.

## II.2.2. Techniques analytiques

### II.2.2.1. Dosage du glucose

**Principe du dosage :** Le taux de glucose a été mesuré par la méthode enzymatique oxydase-peroxydase (GOD-POD). Après oxydation enzymatique en présence de glucose oxydase, le peroxyde d'hydrogène formé réagit avec le phénol et le 4-aminoantipyrine pour former la quinonéimine, indicateur de couleur rouge violette, est proportionnel à la quantité de glucose, mesurable en spectrophotométrie à 500 nm. selon les réactions suivantes :



**Solution réactionnelle :** Le réactif et l'étalon utilisé doivent être conservés à 2-8°C. Les réactifs préparés en solutions sont fournis prêts à l'emploi

**Mode opératoire :** Dans des tubes à hémolyse jetable, on applique le protocole de dosage indiqué dans le tableau suivant :

	Tubes	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif				
Etalon		—	10 µl	—
Echantillon		—	—	10 µl
Réactif		1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml

Tableau III| Protocole de dosage des solutions réactionnelles, dosage de glucose

- ❖ Agitation et incubation des tubes pendant 5 minutes à 37°C au bain marie.
- ❖ La lecture est effectuée au spectrophotomètre, à une longueur d'onde  $\lambda = 500 \text{ nm}$  :
  - Réglage du zéro de l'appareil avec de l'eau distillée
  - Lire l'absorbance (A) de l'étalon puis de l'échantillon

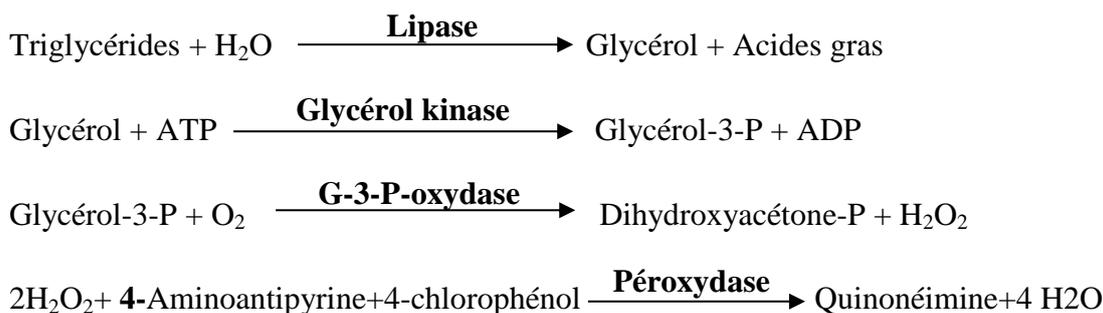
**Méthodes de calcul :** La concentration C de glucose dans le sérum est obtenue à partir de la relation suivante :

$$C \text{ glucose} = (A \text{ Echantillon} / A \text{ Etalon}) \times n$$

A = absorbance  
 n = concentration de l'étalon  
 n = 100mg/dl  
 n = 1 g/l  
 n = 5,56 mmol

II.2.2.2. Dosage des triglycérides

**Principe du dosage:** Les triglycérides plasmatiques sont dosés par la méthode enzymatique à la lipoprotéine lipase. Le glycérol libéré lors de l'hydrolyse des triglycérides par la lipoprotéine lipase est dosé après phosphorylation par le glycérol kinase et oxydation par le glycérol 3 phospho-oxydase. La quinonéimine, produit de la réaction de la 4-aminoantipyrine et le chlorophénol avec les molécules de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est révélé à 500 nm, selon les réactions suivantes :



L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en triglycérides dans le sérum.

**Solution réactionnelle :** Le réactif et l'étalon de triglycérides doivent être conservés à 2-8°C. Réactif (A) et étalon (S) sont prêts à l'emploi.

**Mode opératoire :** Dans des tubes à hémolyse jetable, on applique le protocole de dosage indiqué dans le tableau suivant :

Tubes	Blanc	Etalon	Echantillon
<b>Réactif</b>			
<b>Etalon de triglycérides (S)</b>	—	<b>10 µl</b>	—
<b>Echantillon</b>	—	—	<b>10 µl</b>
<b>Réactif (A)</b>	<b>1,0 ml</b>	<b>1,0 ml</b>	<b>1,0 ml</b>

Tableau IV | Protocole de dosage des solutions réactionnelles, dosage des triglycérides.

- ❖ Agitation et incubation des tubes pendant 5 minutes à 37°C au bain marie.
- ❖ La lecture est effectuée au spectrophotomètre, à une longueur d'onde λ = 500 nm :
  - Réglage du zéro de l'appareil avec de l'eau distillée
  - Lire l'absorbance (A) de l'étalon puis de l'échantillon

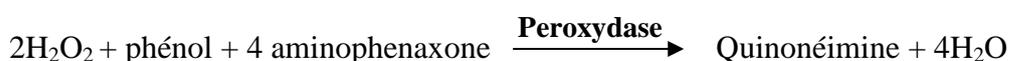
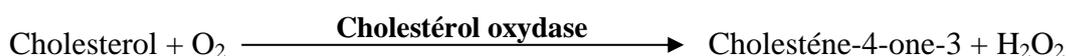
**Méthodes de calcul :** La concentration C dans le sérum est obtenue à partir de la relation suivante :

$$C \text{ triglycérides} = (A \text{ Echantillon} / A \text{ Etalon}) \times n$$

A= absorbance  
n= concentration de l'étalon  
n= 2g/l

### II.2.2.3. Dosage du cholestérol

**Principe du dosage:** Le principe du dosage du cholestérol total (estérifié+ libre) est enzymatique. Le cholestérol est libéré par le cholestérol estérase à partir des esters de cholestérol, puis oxydé par le cholestérol oxydase en cholesténe-4-one-3, parallèlement à la libération des molécules H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les taux de quinonéimine produite par l'action de la peroxydase sont définis par la mesure de la densité optique à 500 nm. Le cholestérol actuel dans l'échantillon lance un complexe coloré selon les réactions suivantes :



L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du cholestérol total dans le sérum.

**Solution réactionnelle :** Le réactif (R1 amortiseur + R2 enzyme) et l'étalon doivent être conservés à 2-8°C, L'étalon est prêt à l'emploi.

Réactif de travail : mélanger des volumes égaux de réactif R1 et R2 et bien agiter.

**Mode opératoire :** Dans des tubes à hémolyse jetable, on applique le protocole de dosage indiqué dans le tableau suivant :

Tubes	Blanc	Etalon	Echantillon
<b>Réactif</b>	—	—	—
<b>Etalon</b>	—	<b>10 µl</b>	—
<b>Echantillon</b>	—	—	<b>10 µl</b>
<b>Réactif de travail</b>	<b>1,0 ml</b>	<b>1,0 ml</b>	<b>1,0 ml</b>

Tableau V| Protocole de dosage des solutions réactionnelles, dosage du cholestérol.

- ❖ Agitation et incubation des tubes pendant 5 min à 37°C au bain marie
- ❖ La lecture est effectuée au spectrophotomètre, à une longueur d'onde  $\lambda = 500 \text{ nm}$  :
  - Réglage du zéro de l'appareil avec de l'eau distillée
  - Lire l'absorbance (A) de l'étalon puis de l'échantillon

**Méthodes de calcul :** La concentration C du cholestérol dans le sérum est obtenue à partir de la relation suivante :

$$C \text{ cholestérol} = (A \text{ Echantillon} / A \text{ Etalon}) \times n$$

n = concentration de l'étalon  
 n = 200mg/dl  
 n = 2 g/l

#### II.2.2.4. Dosage de l'insuline

Le dosage repose sur la compétition entre l'insuline marquée à l'iode 125 et l'insuline contenue dans les standards ou les échantillons à mesurer, vis-à-vis d'un nombre donné et limité de sites d'anticorps anti insuline fixés sur la phase solide des tubes. A la fin de la période d'incubation, l'excès de tracteur est aisément éliminé par une étape de lavage. La quantité d'insuline marquée liée à l'anticorps est inversement proportionnelle à la quantité d'insuline non marquée présente dans l'essai.

#### II.2.3. 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 :

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

xi : est la valeur individuelle  
N : effectif

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

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

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

**Erreur standard à la moyenne**

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

$$T = \frac{m_1 - m_2}{\delta^2 \sqrt{1/N_1 + 1/N_2}}$$

m : moyenne

Pour une ddl de  $(N_1 + N_2) - 2$  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 moyennes :

- Peu significative si  $P < 0,05$  (\*)
- Significative si  $P < 0,01$  (\*\*)
- Très significative si  $P < 0,001$  (\*\*\*)
- Très hautement significative si  $P < 0,0001$  (\*\*\*\*)

Cette analyse statistique a été appliquée aux poids corporels et aux paramètres biochimiques.

#### **II.2.4. La technique histologique**

**(Martoja, 1967 ; Gabe, 1968 ; Reive, 1984)**

Après avoir prélevé l'organe (Foie), nous avons réalisé une étude histologique, qui a pour but de visualiser in situ des tissus et de mettre en évidence la localisation, configuration et structure de leurs organites et molécules, permettant de comprendre leur fonctionnement, afin de découvrir éventuellement certaines anomalies. Cette technique comprend différents étapes (Figure 5. annexe), principalement:

##### **La fixation**

La fixation est une étape primordiale, qui a pour but de maintenir les différentes structures cellulaires et tissulaires dans un état aussi proche que possible de l'état vivant, leur durcissement et de prévenir l'autolyse et la putréfaction des tissus. Elle doit se faire immédiatement après le prélèvement, par immersion du matériel dans du fixateur.

Dans notre étude, les organes prélevés après sacrifice sont rapidement fixés dans le formol 10%, pendant 6 heures.

##### **La réception**

Chaque prélèvement doit être identifié puis enregistré sous un numéro de référence qui l'accompagne dans les différentes étapes de la technique.

##### **La décalcification**

Les prélèvements calcifiés (contiennent des sels de calcium) ne peuvent être coupés au microtome à cause de leur rigidité, ils nécessitent donc une décalcification. La durée de cette étape varie selon l'épaisseur de la pièce (2 à 24 heures). A la suite de cette étape les prélèvements sont soigneusement rincés à l'eau courante.

##### **La circulation**

Le but de cette technique est de durcir beaucoup plus le tissu, pour pouvoir confectionner des coupes histologiques minces d'environ 2 $\mu$ m. Elle consiste à faire séjourner les pièces dans une série de liquides intermédiaires, également pour préparer le tissu à l'inclusion en paraffine de nature hydrophobe, le prélèvement alors, doit d'abord subir une:

**Déshydratation** : Elle consiste à placer les cassettes contenant le prélèvement dans un panier et leur faire subir 6 bains d'alcool (éthanol) à concentration croissante (de 75% à 100%) pendant 12 h (2h pour chaque bain).

**Éclaircissement** : Consiste à remplacer l'alcool présent dans le tissu par un solvant qui est le xylène. Elle se fait pendant 8h, dans 4 bains de xylène (2h pour chaque bain).

**Imprégnation** : C'est la dernière étape de la circulation qui consiste à faire pénétrer la paraffine dans le tissu afin de le rendre plus rigide. Elle s'effectue à chaud dans 2 cuves en acier inoxydables et thermo-statées contenant de la paraffine liquéfiée. Les tissus sont tous portés dans des cassettes pérorées individuellement.

### **L'inclusion et enrobage**

Elle consiste à la confection de blocs de paraffine destinés à la coupe au microtome. L'inclusion ne se fait de façon satisfaisante que si la pièce ne contient ni eau, ni solvant après l'imprégnation.

Nos échantillons ont été délicatement retirés des cassettes avec une pince puis mis dans des moules recouverts d'une petite quantité de paraffine, avant de les remplir complètement de paraffine fondue à une température allant de 55 à 65 C°. La cassette est ensuite déposée sur le moule. 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, permettant ainsi de conserver les rapports architecturaux des structures les unes par rapport aux autres et de lui fournir un support externe à la fois pendant et après la coupe.

### **Confection des coupes**

Les blocs sont coupés à l'aide d'un microtome afin d'obtenir des rubans très fins (de 3 à 5  $\mu\text{m}$ ). Cette épaisseur permet aux rayons lumineux du microscope de traverser la préparation et d'éviter la superposition tissulaire.

### **Etallement des coupes**

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

### **La coloration à l'Hématéine-éosine (HE)**

Il s'agit d'une coloration histologique topographique de routine permettant l'obtention d'une topographie générale de l'échantillon, donc la mise en évidence des noyaux et du cytoplasme. Elle se compose d'un colorant nucléaire, l'hématoxyline de Harris et d'un colorant cytoplasmique, l'éosine.

L'hématoxyline de Harris est un colorant basique, qui a une affinité pour les éléments cellulaires acides dits basophiles. Il colore notamment les noyaux en bleu violet, en se fixant sur les acides nucléiques. Par contre, l'éosine est un colorant acide, qui a une affinité pour les éléments cellulaires basiques dits éosinophiles. Il colore le cytoplasme en rose et les autres éléments cellulaires basiques en rose rouge plus ou moins vif selon leur acidophilie.

A cause de la nature hydrophile des colorants, il est nécessaire de passer par les étapes suivantes:

**Déparaffinage:** passage des lames dans 3 bains de xylène, 5 minutes chacun.

**Réhydratation:** passage des lames dans 3 bains d'éthanol de concentration décroissante (100 %, 90%, 70%), 3 minutes chacun. Dans le but de retirer le xylène et de le remplacer par de l'eau.

**Rinçage:** passage des lames dans l'eau courante pour éliminer l'excès d'éthanol, pour préparer le tissu à accepter le colorant (affinité tinctoriale).

**Coloration à l'hématoxyline de Harris:** passage des lames dans un bain de l'hématoxyline de Harris pendant 5 minutes, pour colorer les noyaux, puis rincées à l'eau courante pour enlever l'excès d'hématoxyline. Par la suite, effectuer un passage rapide des lames dans un bain d'alcool acide à 0.5% (Différentiation), suivi par un rinçage à l'eau courante, puis dans l'eau ammoniacale à 0.2%, pendant 30 secondes à une minute jusqu'à l'obtention d'une couleur bleu (Bleuitement), suivi par un rinçage à l'eau courante.

**Coloration à l'éosine:** passage des lames dans l'éosine alcoolique pendant une minute pour colorer le cytoplasme en rose.

**Rinçage:** lavage des lames à l'eau courante.

**Déshydratation:** passage des lames dans 3 bains d'éthanol de concentration croissante (80%,90% et 100%) d'une minute chacun.

**Eclaircissement:** passage des lames dans 3 bains de xylène pour éclaircir les tissus.

**Montage des lames:** il est effectué en milieu hydrophile avec une goutte de résine synthétique Eukitt, sur la lame et la recouvrir par une lamelle en évitant toute formation de bulles d'air qui pourrait gêner la lecture. Le montage permet une protection mécanique des coupes, ainsi qu'une protection chimique des colorants.

### **Observation microscopique**

Une fois le protocole est terminé, la préparation tissulaire est maintenant prête à être examinée et visualisée à l'aide d'un microscope photonique à différents grossissements (X100, X200, et X400). Les images obtenues sont prises en photos, enregistrées, analysées et interprétées afin d'en tirer les conclusions de notre étude.

### **Calcul du grossissement final**

Le grossissement est calculé en prenant compte du grossissement de l'objectif et de l'indice du microscope selon la formule :

$$Gf = G.oc \times G.ob$$

Gf = grossissement final ; G.oc = grossissement de l'oculaire ; G.ob = grossissement de l'objectif.

### **II.2.5. Etude immunohistochimique**

L'examen immunohistochimique consiste à mettre en évidence la localisation de protéines tissulaires, cytoplasmiques, membranaires ou nucléaires, spécifiques pour un type ou une fonction tissulaire in situ et l'évaluation de leur expression. Elle se fait par une réaction antigène-anticorps qui est absolument spécifique. Le complexe formé étant rendu visible, donc localisable par une substance fluorescente ou une enzyme conjuguée à l'anticorps mono ou polyclonal, en donnant une coloration facile à voir au microscope optique.

Dans notre étude, l'intérêt de l'immunohistochimie est de chercher la présence ou l'absence des protéines CD3, CD163 et la Bcl-2 dans le parenchyme hépatique de *Psammomys Obesus* de groupe témoin et expérimental; pour mettre en évidence les altérations moléculaires impliquées lors de l'induction du diabète par un régime hypercalorique. La méthode employée est LSAB (Labelled Streptavidin-Biotine) (Figure 6, annexe), 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, peroxydase de Raifort (HRP); celle-ci, va se fixer sur l'anticorps secondaire biotynilé. L'activité de la peroxydase induira la coloration d'un chromogène.

un grand nombre de molécules de biotine peut être fixé sur l'anticorps et donc de nombreuses molécules de streptavidine-enzyme pourront se fixer et amplifier le signal.

Après coupe des blocs déjà confectionnés, les rubans sont étalées sur des lames silanisées chargées positivement pour assurer l'adhésion des tissus et réduire le risque de décollement des

coupes hors de la manipulation; les lames sont ensuite déposées sur la plaque chauffante à 75°C, puis placées dans l'étuve à 37°C.

### **1. Procédure de 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 :

- Diluer la solution de démasquage des cibles au 1/50<sup>ème</sup> 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 (20x) dilué, à une température ambiante pendant 1 à 5 minutes.

**Blocage des peroxydases endogènes:** Avant de réaliser cette étape, le fragment doit être délimité, à l'aide d'un stylo hydrophobe et insoluble dans l'alcool (DAKO pen), pour indiquer le siège et empêcher la diffusion des anticorps sur la lame. Afin de bloquer les peroxydases endogènes, on dépose une solution de blocage à base d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 1/20<sup>ème</sup>, 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 bains de tampon de lavage (TBS) pendant 5 minutes chacun. Dans notre cas, trois anticorps sont utilisés : CD3, CD163 et Bcl-2.

**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 bains de tampon de lavage pendant 5 minutes chacun, pour éliminer l'excès de l'HRP.

**Révélation:** 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 de l'eau ammoniacale pour éliminer l'excès du colorant (Bleuitement), 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:** Une goutte de résine (Eukitt) est déposée sur la lame puis recouverte par la lamelle.

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

## **II.2.6. Le score histologique de la stéatose hépatique non alcoolique**

Les lésions hépatiques ont été évaluées par le score d'activité NAFLD (SAF) :

**La stéatose (0-3)**

- 0: < 5 %
- 1: 5-33 %
- 2: 34-66 %
- 3: 67-100 %

**La ballonnisation (0-2)**

- 0 : absence
- 1 : peu
- 2 : beaucoup

**L'inflammation lobulaire (0-2)**

- Grade 0 : aucun foyer inflammatoire ;
- Grade 1 ≤ 2 foyers/lobule ;
- Grade 2 > 2 foyers par lobule.

**La fibrose (0-4)**

- Stade 0 : absence de fibrose;
- Stade 1 : fibrose périsinusoïdale ou portale [1a: fibrose légère la zone3, 1b: fibrose modérée zone 3, 1c: fibrose portale seulement];
- Stade 2 : fibrose périsinusoïdale et portale / périportale;
- Stade 3 : septum ou fibrose de pontage;
- Stade 4 : cirrhose.

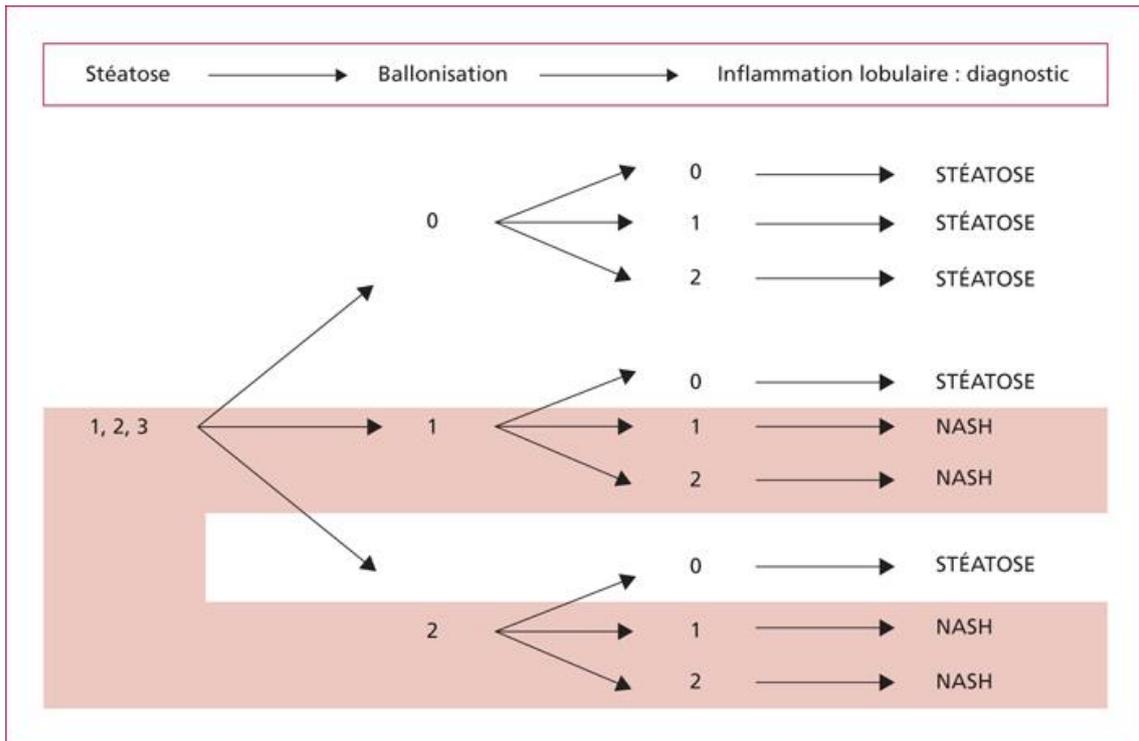


Figure 13| score histologique des lésions hépatique selon la SAF (Pariente, 2015)

### III.1. Résultats

Notre étude a pour objectif l'installation d'un diabète type 2 chez les rats de sable *Psammomys obesus*, par régime hypercalorique, de mettre en évidence les altérations cellulaires et moléculaires hépatiques et d'étudier la susceptibilité de ces rats à la stéatose hépatique non alcoolique, et de son évolution à la stéatohépatite voir la cirrhose en évaluant le poids corporel de ces derniers et, en effectuant des dosages biochimiques plasmatiques dont la glycémie, la cholestérolémie, la triglycéridémie, ainsi que l'insulinémie. Une étude histologique et un immunomarquage du parenchyme hépatique des rats témoins et expérimentaux est réalisée.

Les résultats analytiques sont réunis sous forme de tableaux et de graphiques, chaque tableau récapitulatif présentant la totalité des données individuelles est consigné dans les annexes. Les valeurs moyennes de chaque paramètre sont affectées de l'erreur standard à la moyenne (Test de Student). Ces derniers ainsi que les graphiques correspondants sont insérés dans le texte.

#### III.1.1. Evaluation du poids corporel des *Psammomys obesus*

Le poids corporel dans les deux groupes, témoin nourris au régime naturel et expérimental soumis à un régime hypercalorique, était régulièrement évalué tous les trois mois. Le poids corporel au sacrifice est représenté sur le tableau VI

Poids corporel (g)		
Période/mois	Témoin (n = 10)	Expérimental (n = 15)
0 mois	68,80± 1,13	77,40± 0,78
3 mois	78,70± 1,51	104,40± 0,97****
6 mois	89,80± 1,51	116,67± 0,84****
9 mois	97,30± 1,44	121,33± 0,81****

**Tableau VI| Poids corporel de groupe témoin et expérimental de *Psammomys obesus* au moment du sacrifice.** Chaque valeur représente la moyenne ± ESM. \*\*\*\* (P < 0,0001).

Les rats de sables *psammomys obesus* soumis au RN pendant 9 mois présentent une évolution pondérale à faible amplitude avec une moyenne qui varie entre 68.80±1.33 g et 97.30±1.44 g en fin d'expérimentation. Contrairement aux *psammomys obesus* soumis au RHC pendant la même période qui développent au bout de 3 mois de régime hypercalorique une augmentation pondérale progressive et importante, allant de 77.40±0.78 g à 121.33 ± 0.81 g en fin d'expérimentation (Figure 14) ; (Tableaux III et IV annexe).

Les animaux du groupe expérimental, nourris avec un régime hypercalorique, ont atteint un taux de croissance plus rapide que le groupe témoin, cette augmentation du poids corporel est

considérée comme un indicateur de l'utilisation de l'énergie. En effet la moyenne de calorie consommée par jour suite au régime hypercalorique était de 32 cal, qui est 2 fois la moyenne de calories consommé par les rats témoins nourris avec un régime naturel (22 cal).

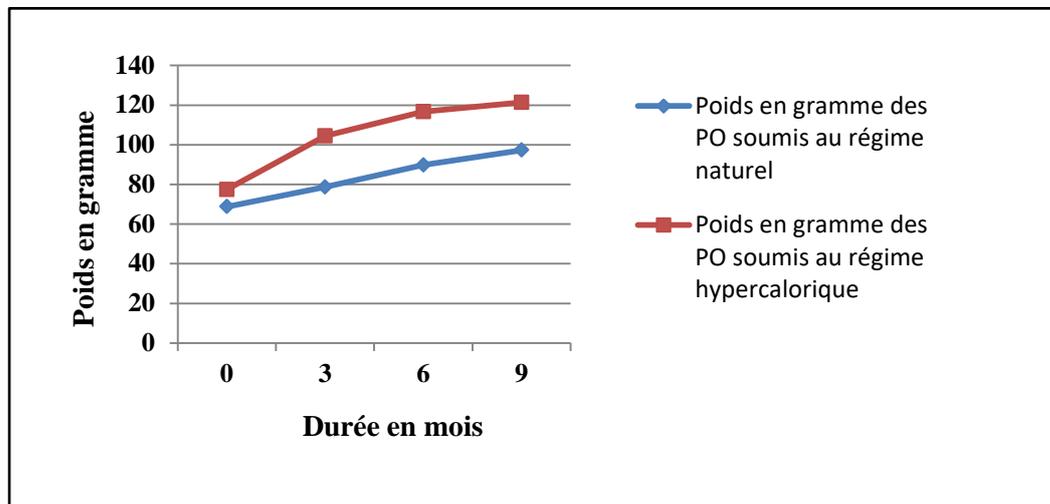


Figure 14 : Graphique linéaire de l'évolution pondérale dans les groupes témoins et expérimentaux de *Psammomys obesus*.

### III.1.2. Paramètres métaboliques et biochimiques

Tout au long de l'expérience (9 mois), des paramètres métaboliques, dont la glycémie, les triglycérides, la cholestérolémie et l'insulinémie ont été évalués chez les *Psammomys* témoins et expérimentaux. Les résultats obtenus sont représenté dans le tableau VII

Période / mois	Glucose (mg/100mL)		Triglycérides (mg/100mL)		Cholestérol (mg/100mL)		Insuline ( $\mu$ UI/ml)	
	T	Exp	T	Exp	T	Exp	T	Exp
0 Mois	64,7 $\pm$ 1,12	63,13 $\pm$ 0,65	67,70 $\pm$ 0,85	76,67 $\pm$ 0,95	54,9 $\pm$ 0,78	52,60 $\pm$ 0,56	26,2 $\pm$ 0,48	22,07 $\pm$ 0,42
3 Mois	63,7 $\pm$ 1,18	183,2 $\pm$ 4,82	64,50 $\pm$ 0,91	197,8 $\pm$ 5,35	64,8 $\pm$ 0,88	133,1 $\pm$ 4,51	24,4 $\pm$ 0,45	265,6 $\pm$ 6,31
6 Mois	67,00 $\pm$ 0,97	198,3 $\pm$ 5,08	68,30 $\pm$ 0,99	234,4 $\pm$ 7,15	60,3 $\pm$ 1,03	135,8 $\pm$ 3,70	25,3 $\pm$ 0,38	280,4 $\pm$ 6,13
9 Mois	73,10 $\pm$ 1,02	201,13 $\pm$ 7,12	73,80 $\pm$ 0,98	243,53 $\pm$ 6,92	58,0 $\pm$ 1,10	137,20 $\pm$ 3,80	27,5 $\pm$ 0,44	364,07 $\pm$ 7,30

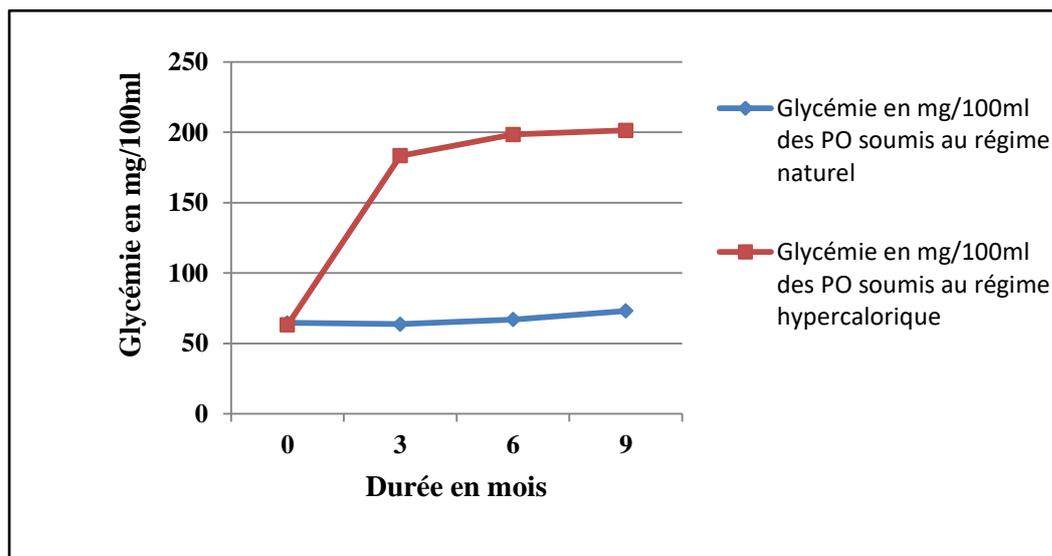
Tableau VII| Valeurs moyennes de glucose sanguin (mg / 100ml), d'insuline plasmatique ( $\mu$ UI / mL), de triglycérides plasmatiques (mg /100m l) et de cholestérol total plasmatique (mg /100m l) chez des *Psammomys obesus* témoins et expérimentaux.

### III.1.2.1. La glycémie

Nous avons observé que les animaux du groupe témoin sont restés normoglycémiques, alors que, ceux du groupe expérimental sont devenus hyperglycémiques au cours de l'étude comme indiqué sur la figure 15

Sur le plan biochimique, la glycémie des rats des sables soumis au RN est de l'ordre de  $64.70 \pm 1.12$  mg/100ml de plasma et ne subit pas de variations significatives pendant toute la durée du régime. En fin d'expérimentation elle arrive à une valeur de  $73.10 \pm 1.02$  mg/100ml.

Contrairement aux rats soumis au RHC où les valeurs glycémiques subissent une augmentation importante dès le troisième mois du RHC pour la plupart des *Psammomys*, pour arriver à une moyenne de 201.33 mg/100ml à la fin de l'expérimentation (Figure 15) ; (Tableaux III et IV annexe).



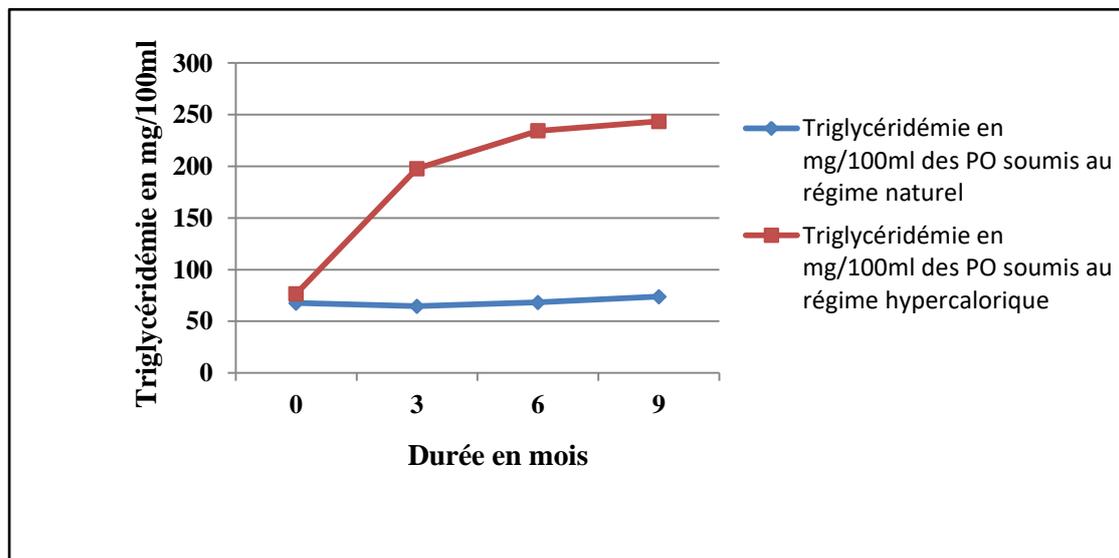
**Figure 15 :** Graphique linéaire de l'évolution de la glycémie plasmatique dans les groupes témoins et expérimentaux de *Psammomys obesus* au cours de 9 mois de l'étude.

### III.1.2.2. La triglycéridémie

Comme c'est le cas de la glycémie, les résultats concernant le triglycéride plasmatique et au début de l'expérimentation, ne montrent aucune différence significative du triglycéride entre les deux groupes. Par ailleurs, ils ont montré une augmentation très hautement significative ( $P < 0,0001$ ) chez les *Psammomys* nourris avec un régime hypercalorique en comparaison avec le groupe témoin nourris avec un régime naturel à partir de troisième mois.

Pour les *Psammomys* témoins soumis à un RN pendant 9 mois, les valeurs des triglycérides passent d'une moyenne de 67.70 mg/100ml pour arriver à une moyenne de 73.80 mg/100ml à la fin de l'expérimentation, soit une évolution de triglycéridémie peu importante, donc ils ont maintenu une normotriglycéridémie

Contrairement aux PO soumis au RHC où la triglycéridémie passe de  $76.67 \pm 0.95$  mg/100ml au début de l'expérimentation pour atteindre une valeur de  $243.53 \pm 6.92$  mg/100ml à la fin de l'expérimentation (Figure 16) ; (Tableaux III et IV annexe).



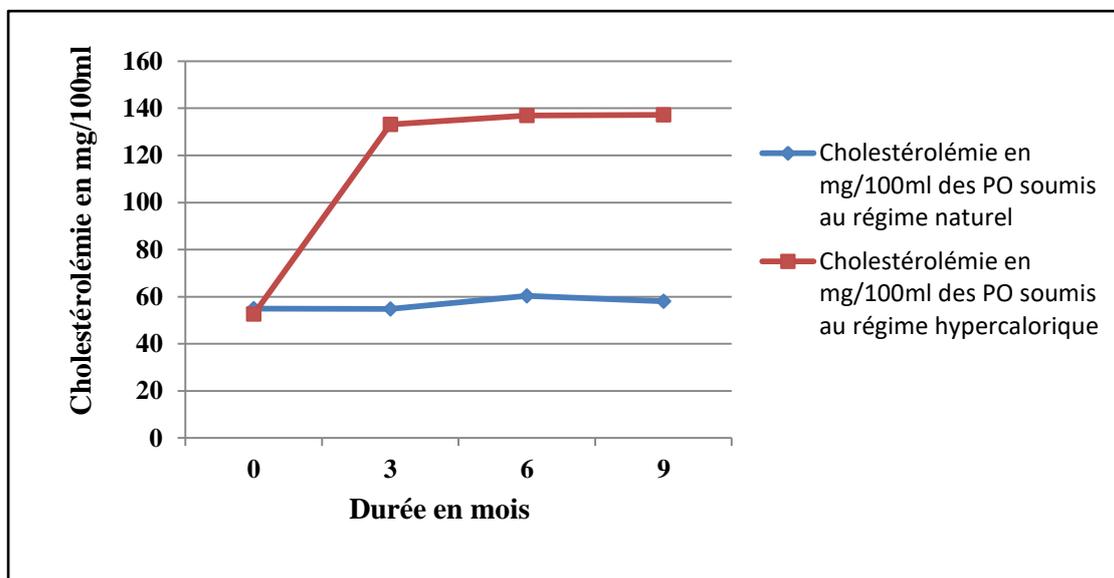
**Figure 16 :** Graphique linéaire de l'évolution de la triglycéridémie plasmatique dans les groupes témoins et expérimentaux de *Psammomys obesus* au cours de 9 mois de l'étude.

### III.1.2.3. La cholestérolémie

Les taux de cholestérol ne différaient pas significativement entre *Psammomys* nourris au régime hypercalorique et ceux nourris au régime naturel au début de l'expérimentation (0 mois).

Pour les *Psammomys* témoins soumis au RN la cholestérolémie fluctue légèrement, la valeur passe de  $54.90 \pm 0.78$  mg/100ml à  $58.00 \pm 1.10$  mg/100ml de plasma. Ils ont donc maintenu une normocholestérolémie tout au long de la période de l'expérimentation

Alors que pour les rats des sables soumis au RHC, le cholestérol total passe d'une moyenne de 52.60 mg/100ml à 137.20 mg/100ml après 9 mois de régime hypercalorique (Figure 17) ; (Tableaux III et IV annexe).

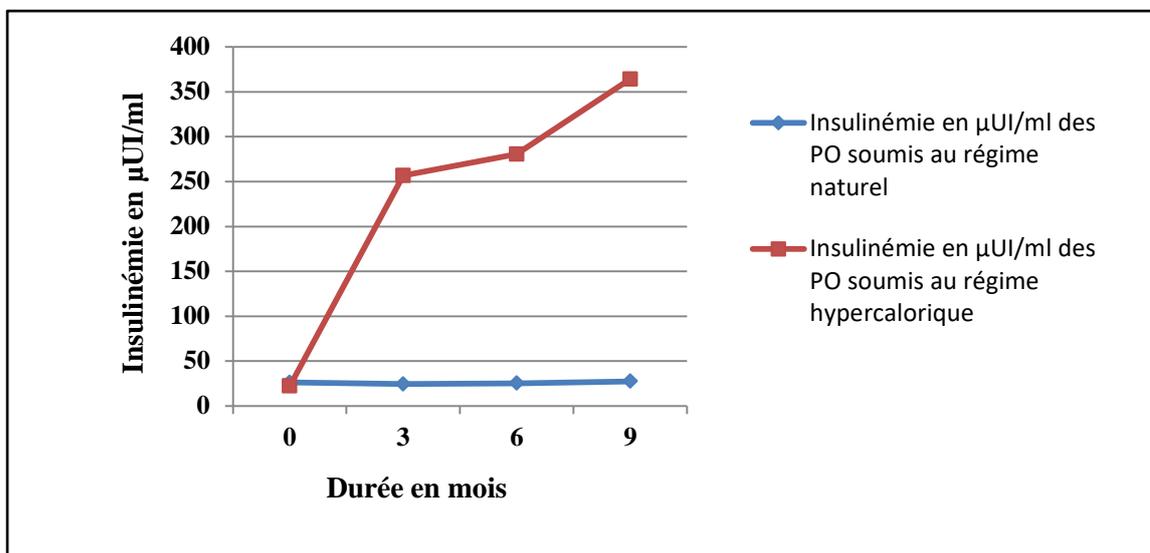


**Figure 17 :** Graphique linéaire de l'évolution de la cholestérolémie plasmatique dans les groupes témoins et expérimentaux de *Psammomys obesus* au cours de 9 mois de l'étude.

### III.1.2.4. L'insulinémie

L'insuline immunoréactive plasmatique chez les animaux nourris aux plantes halophiles est de l'ordre de  $26.20 \pm 0.48 \mu\text{UI/ml}$  de plasma. Une légère variation de ce paramètre est observée à la fin de l'expérimentation et l'on enregistre une valeur de  $27.50 \pm 0.44 \mu\text{UI/ml}$  de plasma. On présente donc une maintenance d'une normoinsulinémie du début à la fin de l'expérience.

L'administration d'une alimentation hypercalorique au *Psammomys* a entraîné une hyperinsulinémie qui a été observée à partir de troisième mois ( $265,60 \pm 6,31 \mu\text{UI/ml}$  vs  $24,40 \pm 0,45 \mu\text{UI/ml}$  chez les témoins) L'hyperinsulinémie est devenue encore plus évidente après le sixième mois de régime hypercalorique et continue d'augmenter et atteignent des valeurs jusqu'à  $364.07 \pm 7.30 \mu\text{UI/ml}$  de plasma (Figure 18) ; (Tableau III et IV annexe).



**Figure 18 :** Graphique linéaire de l'évolution de l'insuline plasmatique dans les groupes témoins et expérimentaux de *Psammomys obesus* au cours de 9 mois de l'étude.

En effet, le régime hypercalorique chez les *Psammomys obesus* révèle leur résistance sous-jacente à l'insuline, qui conduit très rapidement à une hyperglycémie. Ce fait est démontré par le développement concomitant et rapide de l'hyperinsulinémie et de l'hyperglycémie, tandis que le poids et l'hypertriglycéridémie sont relativement lents. La résistance à l'insuline innée dans les conditions désertiques contribue à épargner l'utilisation du glucose dans les muscles pour le bénéfice de l'apport d'énergie au cerveau (Neel, 1962). En présence d'un excès alimentaire relatif, cela provoque une hyperglycémie et une stimulation compensatoire de la sécrétion d'insuline pancréatique.

### III.1.3. Étude histologique du foie de *Psammomys Obesus*

Les coupes histologiques des foies colorés à l'hématoxyline éosine (H&E), des *Psammomys Obesus* du groupe témoin nourri au régime naturel et ceux de groupe expérimental soumis à un régime hypercalorique ont été observés, dans le but de mettre en évidence les éventuelles altérations cellulaires et tissulaires provoquées par ce régime hypercalorique.

#### III.1.3.1. Etude architecturale et structurale de tissu hépatique des rats témoins

L'analyse des coupes histologiques du foie de *Psammomys* témoin à différents grossissement permet de comprendre l'architecture hépatique. La micrographie de la figure 19, et avec le grossissement X100 par une coloration HE nous a permis d'observer une structure d'un parenchyme hépatique, constitué des lobules hépatiques, l'unité structural du foie. Ce lobule possède une forme hexagonale limité par des espaces portes EP (aux angles de l'hexagone) et centré par une veinule Centro lobulaire VCL plein d'hématies. 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, converger vers la veinule Centro lobulaire.

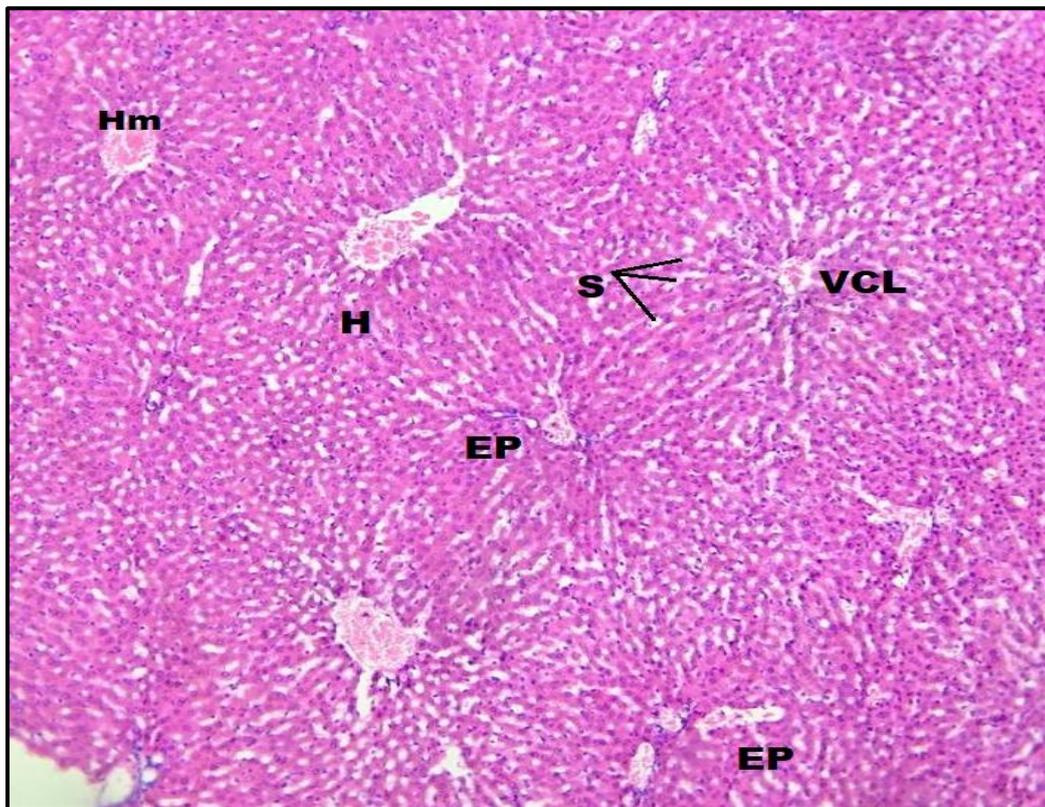
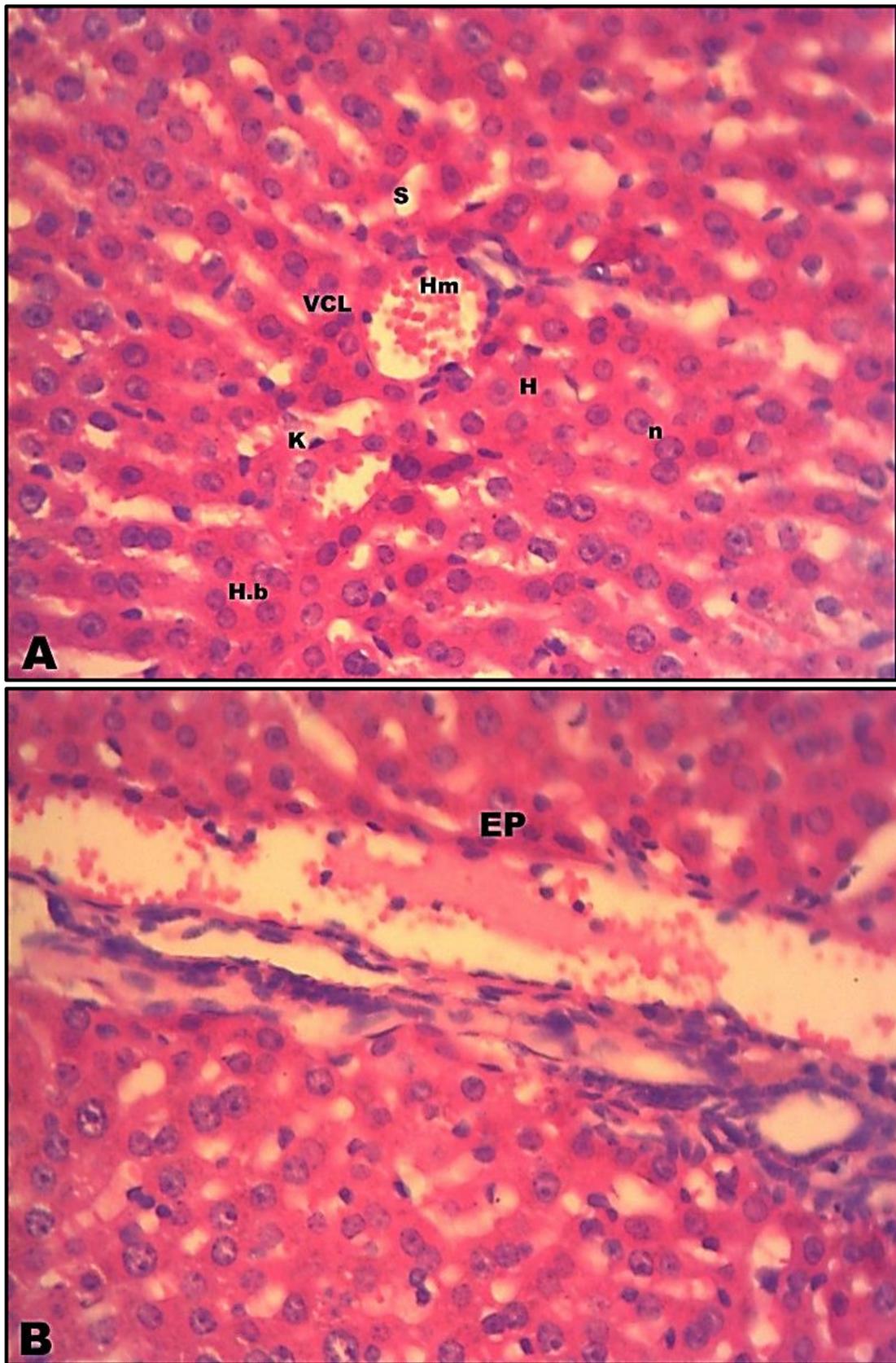


Figure 19| Parenchyme hépatique, chez *Psammomys obesus* témoin; Coloration Hématoxyline-éosine, X 100 ; micrographie originale. EP : espace porte, H : Hépatocyte, Hm : Hématie, S : Sinusoïde, VCL : Veine Centro lobulaire.

Avec le grossissement X400, nous observons dans la figure 20.A la veine Centro lobulaire VCL, bien délimité et pleine d'hématies. On observe aussi les hépatocytes, des cellules épithéliales avec cytoplasme abondant et granuleux et un noyau arrondi (ovoïde) et clairement délimité par une enveloppe nucléaire bien visible dont la chromatine est observable, Des hépatocytes binucléaires s'observent également (ce qui signifie la régénération du foie par division cellulaire karyocinétique et directe, si le nombre des hépatocytes binucléaires augmente en nombre cela reflète un dysfonctionnement du foie). Entre ces hépatocytes nous observons l'installation des capillaires sinusoides (espace peu colorés), de diamètre normal qui s'organisent sous forme de réseaux anastomose. On observe un type de cellules parmi les cellules bordant les sinusoides, les cellules de Kupffer K qui sont de volumineux amas de cellules phagocytaires appartiennent au système de défense monocytes- macrophages. Ces capillaires sont débouchés dans la VCL. La Figure 20.B au grossissement X400 nous permet d'observer les hépatocytes avec un noyau aplati qui sont proches à l'espace porte et l'entourent, entre les quelles se trouvent les sinusoides. Cette couche d'hépatocytes bordant l'espace porte est appelée lame limitante.



**Figure 20| Parenchyme hépatique, chez *Psammomys obesus* témoin; Coloration Hématoxyline-éosine, X 400 ; micrographie originale.** La coupe histologique montre la Veine Centro lobulaire **A**; et l'Espace porte **B**. EP : espace porte, H : Hépatocyte, Hm : Hématie, H.b : Hépatocyte binucléé, K : cellule du Kupffer, n : noyau, S : Sinusoïde, VCL : Veine Centro lobulaire.

### **III.1.3.2. Etude architecturale et structurale de tissu hépatique des rats expérimentaux**

Chez l'animal diabétique, le métabolisme glucidique, protéique et lipidique est perturbé, et l'accumulation de graisses dans le foie par suite de l'insulinorésistance, est la première étape du développement de la stéatose hépatique non alcoolique

Chez les *Psammomys* soumis à un régime hypercalorique et au 3<sup>ème</sup> mois, (Figure 21. A Gr X100), nous observons la présence d'une stéatose diffuse importante, de score 3 (3 : > 66-100%). Avec le grossissement X400, (Figure 21.B) Infiltration dans le cytoplasme des hépatocytes graisseuse macrovacuolaire où les vacuoles ont une taille supérieure à celle du noyau cellulaire et il est déplacé vers la périphérie cellulaire et infiltration microvacuolaire où les vacuoles ont une taille inférieure à celle du noyau cellulaire et ne le déplacent pas en périphérie, étaient les résultats les plus frappants alors qu'il était presque absent dans le groupe témoin. Ces résultats sont reflétés dans le score de foie gras. (La technique histologique a provoqué la dissolution des lipides, qui sont apparus tels que des zones vides dans les hépatocytes.).

La dilatation des sinusoides, le ballonnement, la fibrose cellulaire ou la nécrose ainsi que les cellules inflammatoires n'ont pas été observés. Ainsi, à ce stade, le rat de sable *Psammomys*, est un modèle de stéatose.

Selon le score d'activité NAFLD (SAF) et selon les résultats histologiques hépatiques qu'on a obtenus dans le 3<sup>ème</sup> mois chez les *Psammomys obesus* expérimentaux :

La stéatose (0-3) = 3: 67-100 %

La ballonisation (0-2) = 0 : absence

L'inflammation lobulaire (0-2) = Grade 0 : aucun foyer inflammatoire

La fibrose (0-4) = Stade 0 : absence de fibrose;

Ainsi, à ce stade, le rat de sable *Psammomys*, est un modèle de stéatose.

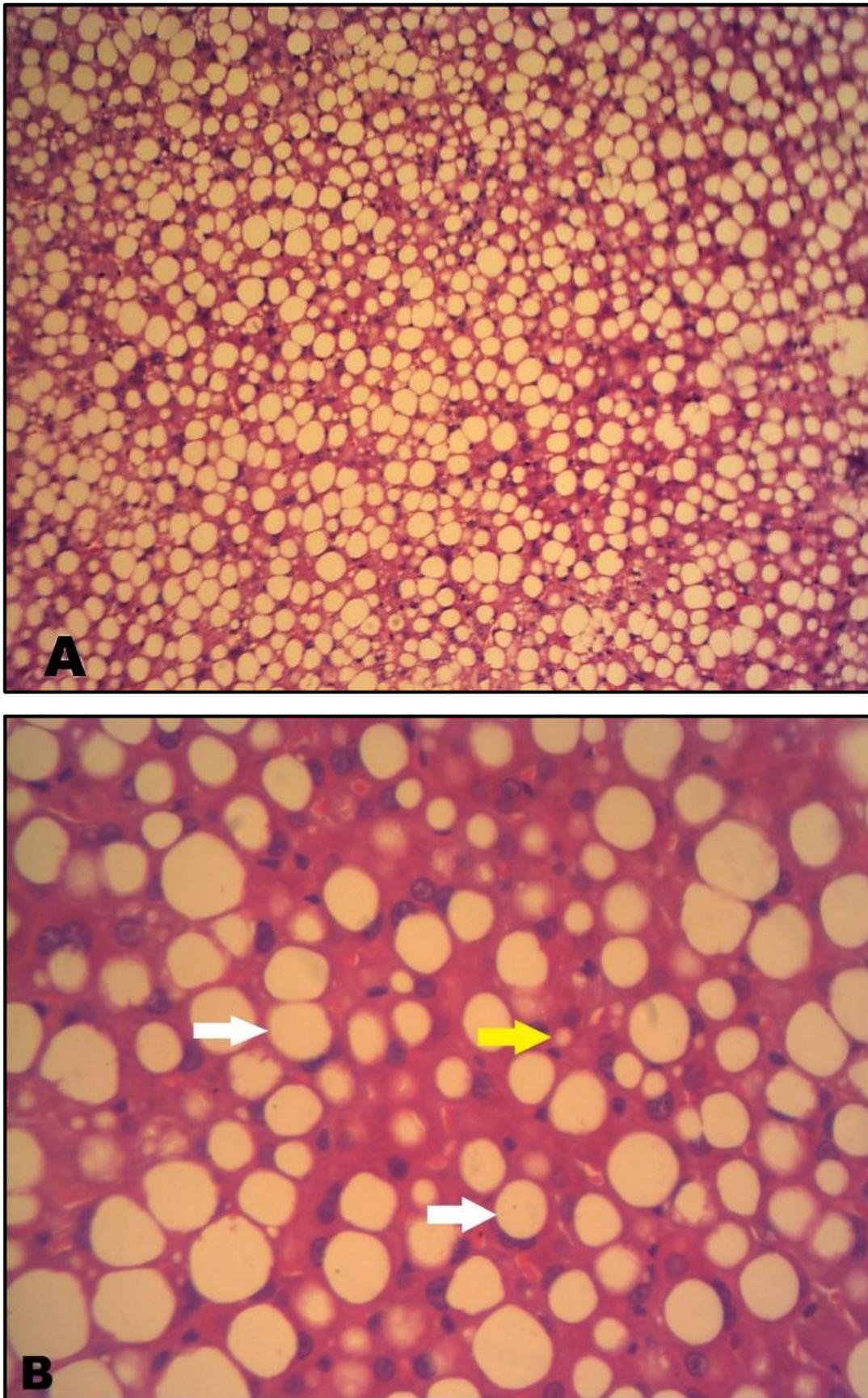


Figure 21| Parenchyme hépatique, chez *Psammomys obesus* expérimentaux (3<sup>ème</sup> mois); Coloration Hématoxyline-éosine, X100 (A) X 400 (B) ; micrographie originale. Flèche blanche : Macrovacuole ; Flèche jaune : Microvacuole.

Après six mois, nous observons une stéatose à prédominance macrovaculaire, et une stéatose microvaculaire avec quelques hépatocytes hypertrophiés (ballonnés) où le cytoplasme s'éclaircit. Nous pourrions également observer la présence d'un infiltrat inflammatoire lobulaire au sein des travées hépatocytaires (Figure 22.A). La figure 22. B, montre la présence d'un infiltrat inflammatoire portal, on observe des clusters qui comporte les mêmes cellules que l'infiltrat lobulaire (neutrophiles, lymphocytes).

La figure 22.C et D nous permet de mettre en évidence la présence d'un infiltrat lymphocytaire au niveau de la lame bordante hépatocytair (hépatocytes au contact d'un espace porte ou d'une travée de fibrose). On observe également un début de formation d'un tissu cicatriciel qui remplace les cellules hépatiques endommagées autour de l'espace porte, c'est la fibrose. La fibrose observer s'agit d'une fibrose légère périportal de stage C1

Selon le score d'activité NAFLD (SAF) et selon les résultats histologiques hépatiques qu'on a obtenus dans le 6<sup>ème</sup> mois chez les *Psammomys obesus* expérimentaux :

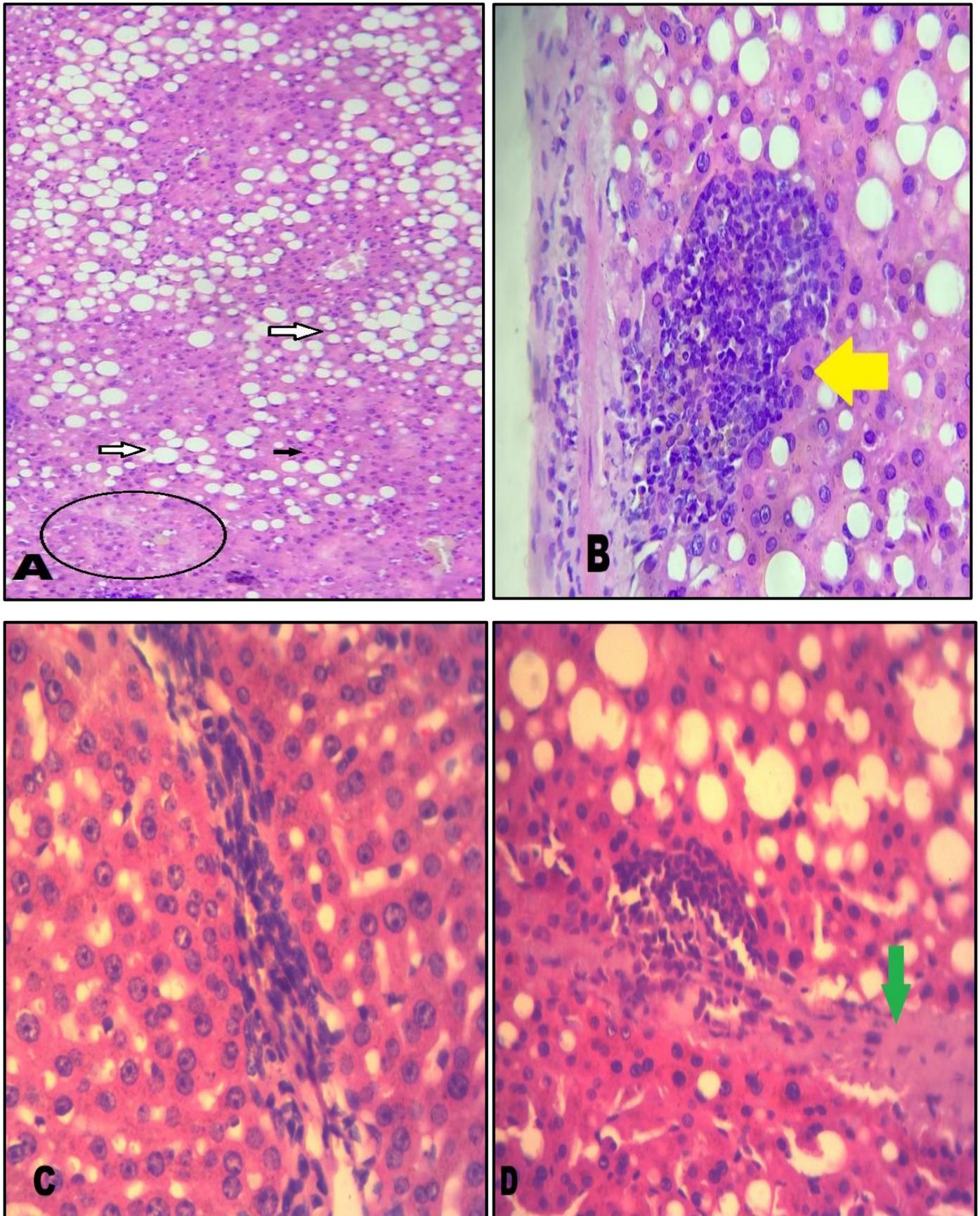
La stéatose (0-3) = 3: 67-100 %

La ballonnisation (0-2) = 1 : peu

L'inflammation lobulaire (0-2) = Grade 1 ≤ 2 foyers/lobule

La fibrose (0-4) = Stade 1 : 1c: fibrose portale seulement; (léger)

Ainsi, à ce stade, le rat de sable *Psammomys*, est un modèle de NASH.



**Figure 22| Parenchyme hépatique, chez *Psammomys obesus* expérimentaux (6<sup>ème</sup> mois); Coloration Hématoxyline-éosine, X100 (A) X 400 (B, C, D) ; micrographie originale. Circle : clarification ; Flèche blanche : Macrovacuole ; Flèche noir : infiltrat inflammatoire lobulaire ; Flèche jaune : Infiltrat inflammatoire portal, Flèche verte : début de fibrose.**

Si de plus on lui rend vulnérable aux complications du diabète, les hépatocytes perdent leur architecture structural. C'est exactement ce que l'on observe au neuvième mois de régime hypercalorique dans ce groupe de *Psammomys*. On observe dans la figure 23.A que les hépatocytes ont perdu leur architecture structural et la membrane qu'ils étaient entourés par est devenue invisible. Nous voyons que les noyaux sont devenus fortement condensés, un signe qu'ils ont perdu leur activité, ce qui finit par engendrer la mort des hépatocytes. Ce phénomène est associé à la clarification des hépatocytes.

Ce processus de lésions des cellules hépatocytaires, commence au tour de la veine Centro lobulaire et l'espace porte, c'est ce que la figure 23.B le montre. On observe que la stéatose macrovulaire commence à disparaître au tour de la veine Centro lobulaire, et est remplacée par des hépatocytes altérés. Nous observons également la présence de fibrose, qui remplace les cellules hépatiques endommagées autour de l'espace porte des *psammomys* expérimentaux, qui au contraire aux témoins, l'espace porte est entouré par des hépatocytes d'une architecture structural normal (Figure 23.C).

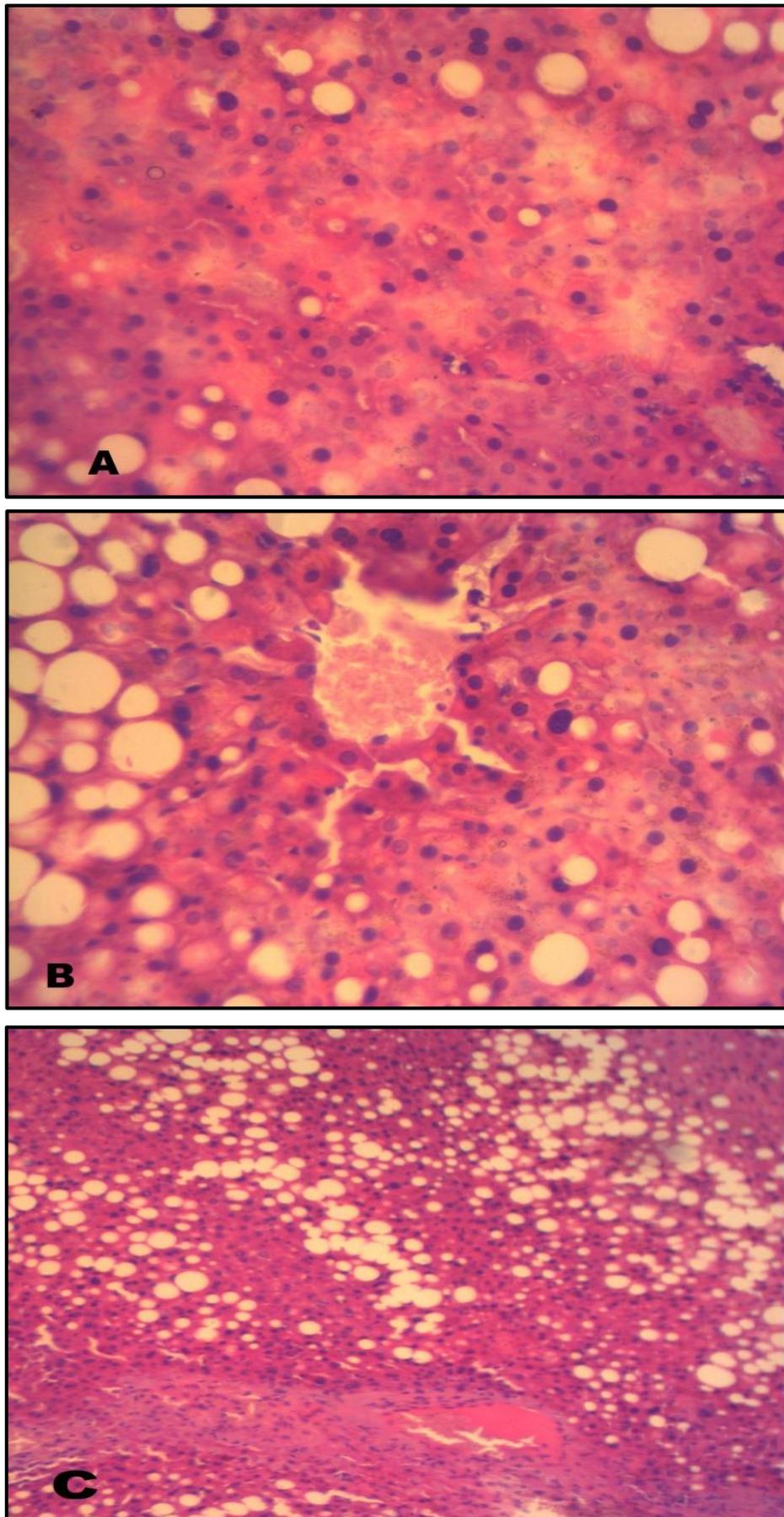


Figure 23| Parenchyme hépatique, chez *Psammomys obesus* expérimentaux (9<sup>ème</sup> mois); Coloration Hématoxyline-éosine, X100 (C) X 400 (A, B) ; micrographie originale.

### III.1.4. Immunmarquage de molécules du foie de *Psammomys* témoins et expérimentaux

Dans notre étude, nous avons évalué l'expression immunohistochimique de différents anticorps, au cours de développement de diabète vers une stéatose hépatique non alcoolique et son progression vers la stéatohepatite et fibrose chez des *psammomys* témoins et expérimentaux, dans le but d'évaluer le statu immunitaire, apoptotique et le comportement des cellules de notre tissu d'intérêt, le foie par le biais des anticorps primaires monoclonaux d'ériger contre : CD3, CD163 et le Bcl-2. Les résultats obtenus sont les suivants :

#### II.1.4.1. Expression de Bcl-2

Bcl-2 est une protéine cellulaire anti-apoptose. Après marquage des coupes histologiques des deux groupes, nous avons observé que l'expression de Bcl-2 dans le groupe expérimental étaient aussi faibles ou totalement absente que dans les tissus normaux de groupe témoin (Figure 24).

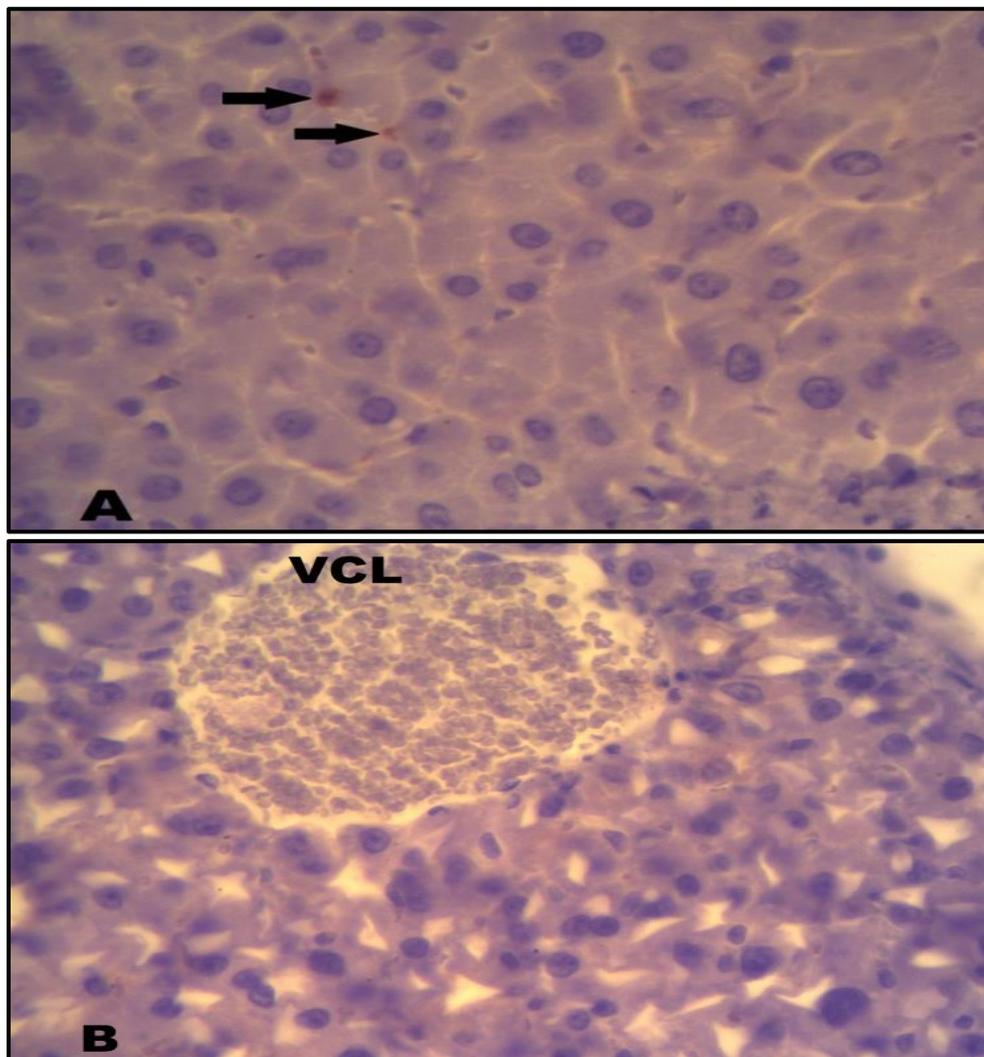


Figure 24| Expression immunohistochimique de la protéine Bcl-2 dans le parenchyme hépatique, chez *Psammomys obesus* témoin et expérimentaux; X 400 (A, B) ; micrographie originale. Expression immunohistochimique de Bcl-2 chez le groupe témoin A ; expression immunohistochimique de Bcl-2 chez le groupe expérimental (3<sup>ème</sup> mois). Flèche noire : expression de Bcl-2, VCL ; veine Centro lobulaire.

### III.1.4.2. Expression de CD3

L'expression de CD3 qui aide à activer à la fois la cellule T cytotoxique et aussi les cellules T auxiliaires été différente dans les deux groupes (Figure 25). Dans le groupe témoin nous avons observé l'expression de CD3 au niveau des cellules endothéliales qui tapisse la sinusoïde hépatique. Tandis que dans le groupe expérimental et avec la progression de la stéatose hépatique non alcoolique, nous avons observé une diminution de l'expression de CD3 par rapport de ce que nous avons trouvé dans le groupe témoin. Cette faible expression est corrélée avec l'activité histologique sévère.

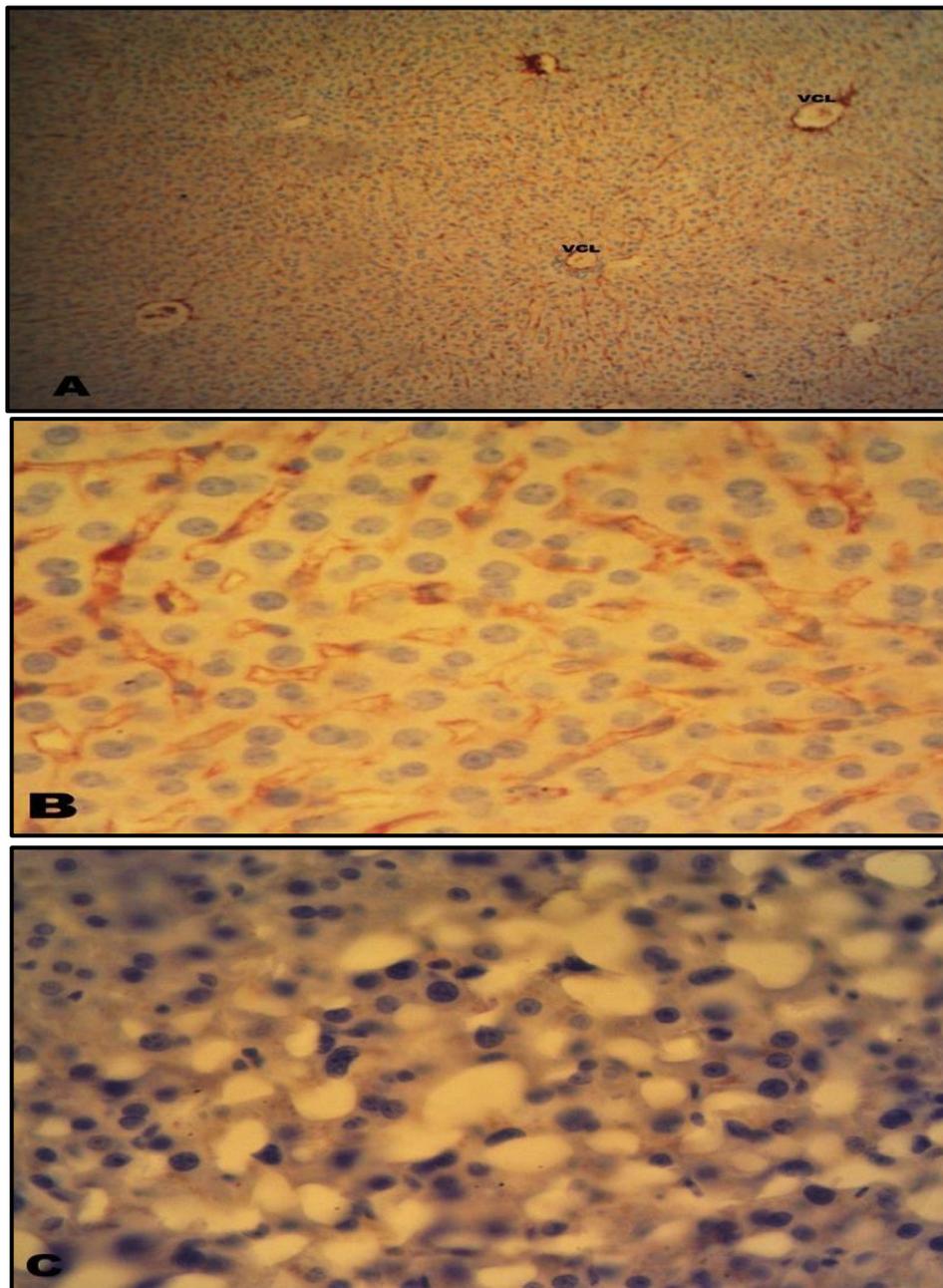


Figure 25| Expression immunohistochimique de la protéine CD3 dans le parenchyme hépatique, chez *Psammomys obesus* témoin et expérimentaux; X100 (A) X 400 (B, C) ; micrographie originale. Expression immunohistochimique de CD3 chez le groupe témoin A, B ; expression immunohistochimique de CD3 chez le groupe expérimental (9<sup>ème</sup> mois) C.

### III.1.4.3. Expression de CD163

le CD163 qui joue le rôle de récepteur scavenger est exprimé presque exclusivement sur les macrophages de type M2, y compris les cellules de Kupffer hépatiques et dans les macrophages infiltrés dans les sites inflammatoires. L'immun marquage de ce récepteur nous a révélé que la population des macrophages CD163-positifs était exprimée avec un taux faible au niveau des sinusoides hépatique chez les témoins. Ainsi que ceux des expérimentaux de 3 mois. Cependant chez les rats expérimentaux de 6<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup> mois, en plus des macrophages CD163-positifs exprimées dans les sinusoides du foie, nous avons observé l'agrégation de quelque cellule autour des hépatocytes stéatosiques. Le nombre des cellules CD163 positive chez les expérimentaux n'a pas été augmenté (Figure 26).

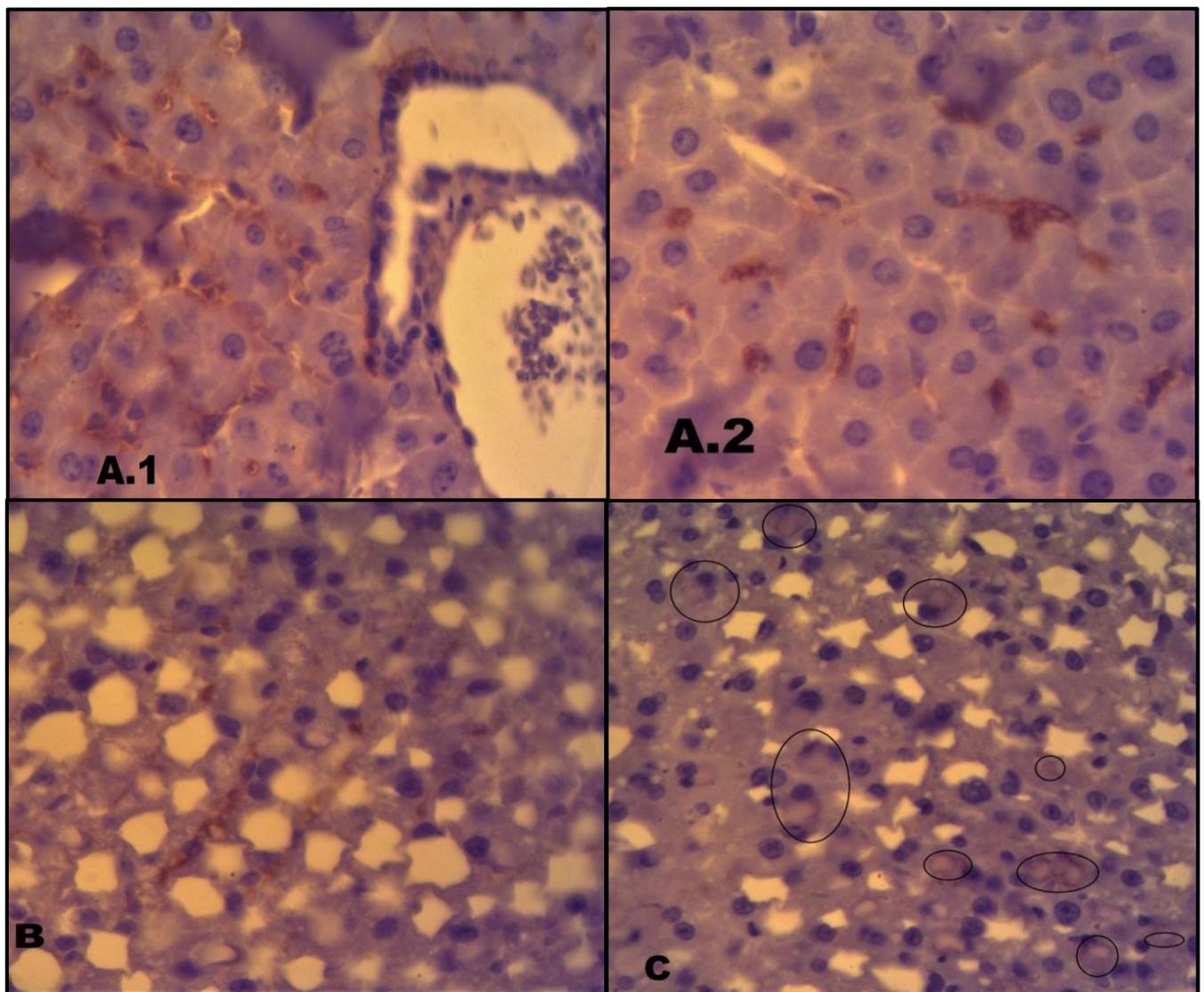


Figure 26| Expression immunohistochimique de la protéine CD163 dans le parenchyme hépatique, chez *Psammomys obesus* témoin et expérimentaux; X 400 ; micrographie originale. Expression immunohistochimique de CD163 chez le groupe témoin A.1, A.2 ; expression immunohistochimique de CD163 chez le groupe expérimental (3 et 9<sup>ème</sup> mois) B, C. Circle : expression de CD163.

### **III.2. Discussion**

Des modèles animaux de résistance à l'insuline et de diabète de type 2 sont nécessaires pour l'étude du mécanisme de ces phénomènes et pour une meilleure compréhension des complications du diabète dans les populations humaines. Le but de cette étude était d'examiner les effets à long terme d'un régime de laboratoire qui représente un régime hypercalorique pour les rats de sable *Psammomys obesus*, sur le schéma métabolique du syndrome diabétique et sur le développement des lésions hépatiques chez ces rats. Cette étude nous a permis d'analyser, dans un ordre chronologique, l'apparition du diabète type 2 et les altérations métaboliques et histopathologies hépatiques associées au passage NAFLD / NASH chez *P. obesus*.

Notre étude montre que lorsque le *P.obesus* se met dans des conditions proches de son biotope naturel ne développe aucune pathologie, par contre lorsqu'il est soumis à un régime riche en calories, il développe une obésité associée à une hyperglycémie dès le troisième mois du régime hypercalorique (RHC). De plus, les animaux obèses présentaient une hyperinsulinémie et une dyslipidémie, tous des composantes du syndrome métabolique humain. L'hyperglycémie est devenue encore plus significative après le neuvième mois de RHC. Ces perturbations métaboliques indiquent un stress diabétique au niveau de son organisme. En effet, le changement brutal du régime alimentaire a bouleversé très rapidement son équilibre métabolique. Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Kahn et al. (2000)** et **Donath et al (1999)** qui ont montré que, lorsque la gerbille *P.obesus* est soumis à un RHC, développe rapidement une hyperglycémie associée à une hyperinsulinémie. La concentration plasmatique du glucose a augmenté de 2.01 g / l, au neuvième mois de notre étude, ce qui est supérieur au niveau glycémique requis pour considérer *P. obesus* comme un animal diabétique, niveau qui s'établit à 1,4g / l (**Leibowitz et al., 2001**) et sont considérés comme hyperinsulinémiques lorsque les taux plasmatiques d'insuline non à jeun dépassent 150 µU / ml. (**Kalderon et al., 1986**) qui dans notre étude a augmenté vers 265,6 µU / ml au troisième mois.

**Selon Schwarz et al. (2014)**, le diabète de types 2 ou non insulino-dépendants survient lorsque l'organisme développe une résistance à l'insuline au niveau des tissus périphériques (muscle, tissu adipeux et foie) et perd sa capacité à absorber et à métaboliser le glucose. Par conséquent, et dans un premier temps et, chez les individus prédiabétiques pour compenser le manque du glucose, les cellules  $\beta$  pancréatiques sécrètent d'avantage d'insuline, un état qualifié de l'hyperinsulinémie, afin de diminuer l'hyperglycémie sanguin. Donc cela explique l'augmentation de la glycémie et l'insuline plasmatique de nos rats *psammomys* expérimentaux.

En 1964, **Schmidt-Nielsen** de l'Université Duke et ses collaborateurs ont été les premiers à rapporter que le diabète survient chez la plupart des *Psammomys* qui suivent un régime hypercalorique de laboratoire, mais pas sur un régime végétal. L'évolution du diabète chez *Psammomys* est progressive, telle que définie par **Kalderon et al. (1986)** et suit plusieurs étapes définies: Le stade A est normoglycémique et normoinsulinémique, le stade B est normoglycémique et hyperinsulinémique, le stade C est hyperglycémique et hyperinsulinémique (insulino-résistance), et enfin le stade D est hyperglycémique de longue durée, au diabète décompensé sévère, à la perte de cellules bêta et à l'hypoinsulinémie. La progression du stade A vers le stade C est réversible et peut être évitée en limitant le régime alimentaire, mais le stade D est irréversible, caractérisé par la destruction des cellules bêta et est irréversible (**Shafir et al., 2006**).

Dans notre étude, les *psammomys* soumis à un régime hypercalorique ont maintenus une hyperglycémie et une hyperinsulinémie du 3<sup>ème</sup> mois jusqu'à la fin de l'étude (9 mois), donc c'est le stade C, et selon **Kalman et al., (2012)**, La vitesse de progression du stade A vers les autres stades dépend de la quantité d'énergie digestible dans l'alimentation.

Afin de déterminer si la carence d'insuline bioactif est une cause possible de l'hyperglycémie, un groupe de chercheurs **Ziv et al. (1986) et (1996)** ont administré des implants sous-cutanés fournissant de l'insuline bovine exogène. Ils ont conclu que ce n'est pas la carence en insuline qui provoque l'hyperglycémie chez les *Psammomys*. En outre, l'hyperinsulinémie induite par l'insuline bioactive exogène n'a pas entraîné d'hypoglycémie même chez les *Psammomys* normoglycémiques nourris avec le régime pauvre en énergie. Ces mêmes auteurs ont supposé l'existence possible d'une résistance primaire à l'insuline chez *Psammomys obesus*. Cependant, afin de mieux définir la nature de la résistance, une pince hyperinsulinémique, euglycémique a été réalisée. En conséquence, *Psammomysobesus* a développé une résistance à l'insuline prononcée à la fois au niveau du muscle et du foie lorsqu'il est maintenu à un régime de laboratoire hyper calorique par rapport au régime alimentaire naturel. Ceci est évident à cause de la diminution de l'absorption du glucose musculaire et de l'activation de la gluconéogenèse hépatique en présence d'hyperinsulinémie (**Ziv et al., 1986**). L'activation du récepteur induite par l'insuline, condition préalable à la transduction du signal intracellulaire, est inhibée dans le stade hyperinsulinémique-hyperglycémique C, ce qui indique que la résistance est localisée au site de récepteur de l'insuline (**Kanety et al.,1994; Ziv et al., 1996**). Il a été démontré par **Kanety et al.(1994)** que la résistance à l'insuline chez *Psammomys* peut être une caractéristique inhérente même chez les animaux de stade A normoglycémiques-normoinsulinémiques du régime faible en énergie. De même, la capacité de *Psammomys* à résister à l'effet hypoglycémiant des implants d'insuline ne pouvait pas être expliquée

par une augmentation massive de la glycolyse pendant le sommeil ou entre les repas ou de la gluconéogenèse hépatique pendant un jeûne prolongé. Cependant, la phosphoénol pyruvate carboxy kinase hépatique (PEPCK), l'enzyme gluconéogénique limitant la vitesse, a été réduite seulement en partie par l'hyperinsulinémie, ceci indique que la gluconéogenèse était en cours et pourrait compenser l'absorption de glucose périphérique induite par l'insuline. Il est également concevable que la rareté des récepteurs de l'insuline hépatique et musculaire chez cette espèce animale et leur fonction compromise en présence d'hyperinsulinémie n'ont pas entraîné une élimination excessive du glucose plasmatique.

Il a été noté par **Adam et al., (2017)**, que *P. obesus* était prédisposé au diabète par l'existence de traits génétiques. Cette suggestion était basée sur le fait que ces animaux sont devenus diabétiques lorsque leur régime végétal naturel a été remplacé par des aliments de laboratoire standard, en supposant que les plantes trouvées dans la nature étaient suffisantes pour prévenir le diabète. Le PDX1 est un facteur de transcription présent dans les cellules pancréatiques qui régule la production et la fonction de l'insuline. Ce facteur n'a pas encore été identifié chez le rat de sable ou chez d'autres membres de la sous-famille des gerbilles. Les chercheurs ont donc supposé que la sous-famille des gerbilles pourrait avoir perdu le PDX1 durant l'évolution et devenir vulnérable à l'acquisition du DT2.

D'autre part, des travaux ultérieurs ont montré que le métabolisme glucidique du *P.obesus* se distingue par sa glycémie très basse (la moitié de celle du rat Wistar) et un taux d'insuline naturellement élevé. Cette particularité lui permet d'activer le processus de lipogenèse *de novo* et de limiter l'oxydation du glucose, fourni par la synthèse endogène, aux tissus insulino-dépendants. Le changement du régime alimentaire bouleverse très rapidement l'équilibre métabolique des *P.obesus* (**El-Aoufi et al., 2007**). Les AG à longue chaîne, substrats énergétique des cellules  $\beta$  du pancréas, sont lipotoxiques à concentration chroniquement élevée pour ces cellules comme le sont également des concentrations élevées de glucose, la part relative de la glucotoxicité et de la lipotoxicité dans la destruction des cellules  $\beta$  n'a pas été établie mais ces deux mécanismes sont impliqués de la survenue du diabète de type 2 (**Poitont et Robertson, 2002**).

Toutefois, (**Johan et al., 2007**) par l'étude de la nature de l'insuline circulante a montré que l'insuline est en grande partie constituée de pro-insuline et de ses dérivés. De ce fait, ces mêmes auteurs ont démontré, que lorsque les îlots de langerhans sont exposés à des concentrations élevées du glucose et la présence dans la circulation sanguine d'acide gras à longue chaîne, l'insuline est sécrétée en abondance en réponse au surplus du glucose. En outre, **Magnan (2006)**, a mentionné que cette insulino-résistance entraîne d'une part un dysfonctionnement du métabolisme glucidique

par une diminution de la capture du glucose par les cellules normalement insulino-sensible, une augmentation de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse hépatique, et d'autre part un dysfonctionnement du métabolisme lipidique par l'inhibition de la lipogenèse et l'augmentation de la lipolyse intracellulaire. Par conséquent, ces perturbations métaboliques conduisent à une baisse de l'utilisation intracellulaire du glucose compensée par une augmentation de l'utilisation des AG, de ce fait, une hyperglycémie et une hyperlipidémie chronique s'installent ce qui constitue des facteurs d'aggravation de l'insulinorésistance (**Guillausseau et Laloi-Michelin, 2003**). De plus, selon ces mêmes auteurs, l'hyperlipidémie chronique provoque une hypertrophie et une hyperplasie du tissu adipeux qui entretient et aggrave ce phénomène. Dans ce même contexte, nos résultats ont montré une perturbation du métabolisme lipidique, le taux de cholestérol a augmenté dès le 3<sup>ème</sup> mois du RHC, ceci est probablement dû au fait que l'insuline module l'activité de plusieurs enzymes clés du métabolisme lipidique. Pour cela, il est admis que toute situation au cours de laquelle l'action de l'insuline est altérée, telle l'insulinorésistance, s'accompagne d'anomalies lipidiques souvent importantes contribuant à accroître les complications hépatiques (**Verges, 2001**). Nos résultats ont montré également une augmentation significative de TG. Ce dernier est considéré comme un paramètre clé dans la gravité de l'atteinte du métabolisme lipidique.

D'autre part, le diabète est un stress métabolique qui peut développer des affections et des atteintes différentes du foie selon l'état d'aggravation, pour établir la corrélation entre ces différents facteurs, nous avons réalisé une étude histologique pour mieux comprendre ces changements et ces altérations. L'étude de **Scherzer et al, (2000)** ont montré que, après une alimentation riche en énergie, le *P.obesus* devient hyperglycémique et hyperinsulinémique et développe le diabète. 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 études histologiques en microscope photonique, du foie des *P.obesus* témoins ont montré une importante similitude entre son parenchyme hépatique et celui de l'homme sain. Le foie apparaît sous forme de lobules hépatiques, au centre des lobules se trouvent la veine centrolobulaire qui collecte le sang. Le parenchyme hépatique est composé de divers types de cellules adjacentes aux hépatocytes, elles montrent des noyaux arrondis bien visible en microscopie photonique, elles sont organisées de façon complexe pour assurer d'une part la production et l'écoulement de la bile où, les canalicules biliaires sont positionnés du côté apicale des hépatocytes, et d'autre part les échanges avec le sang. La circulation sanguine intrahépatique se fait à travers les espaces sinusoides formés par les cellules endothéliales et à travers des quelles s'invaginent les cellules de Kupffer et

les cellules Pit (analogues aux cellules tueuses NK). Les cellules de Ito sont localisées dans l'espace perisinusoïdal de Disse dans la région periportale (**Valentin et al., 2011**).

Les perturbations métaboliques dans notre étude ont apparues au 3<sup>ème</sup> mois de l'expérimentation, au même période, *P. obesus* présentaient des lésions pathologiques hépatiques. Ceci peut s'expliquer par une adaptation du métabolisme du glucose conduisant à un remodelage du parenchyme hépatique. Nos observations histologiques étaient parfaitement corrélées avec les résultats de l'analyse biochimique, se traduisaient par une accumulation de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes. Étaient également similaires aux études utilisant le rat israélien *Psammomys* (**Shafrir et Ziv, 1998**).

**Smith et al. (2011)** et **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 lipogénèse hépatique, et une diminution de l'élimination et de l'oxydation des AG.

La résistance à l'insuline est considérée une étape clé dans l'accumulation des lipides au niveau hépatique et dans l'initiation de la NAFLD. Dans des conditions d'insulino-résistance, le tissu adipeux et le muscle oxydent de préférence les lipides, ce qui a pour conséquence d'augmenter la quantité d'acides gras libres dans la circulation sanguine (**Leclercq et Sempoux, 2006 ; Lewis et Mohanty, 2010**). Le tissu adipeux joue un rôle important dans l'homéostasie systémique des lipides et du glucose. Dès que sa capacité à estérifier les acides gras provenant de la circulation sanguine et à les stocker au sein des adipocytes est dépassée (ce qui se produit en cas d'excès alimentaire riche en graisses et sucres et en cas d'insulinorésistance), les acides gras libres sont délivrés au foie, responsable d'une lipotoxicité provoquant une stéatose (**Lewis et al., 2002**).

La disponibilité hépatique des lipides dépend aussi de l'expression des certains transporteurs d'acides gras. L'activation des facteurs de transcription, ou certains récepteurs nucléaires induit la synthèse hépatique d'acides gras (**Canbay et al., 2007**). Il a été démontré que la quantité d'acides gras libérés dans la circulation sanguine est proportionnelle à la masse grasse tant chez l'homme que chez la femme (**Mittendorfer et al., 2009**). D'autres études, ont montré, une expression augmentée de certaines protéines chez les sujets obèses avec une NAFLD, comme les lipases hépatiques ou bien le transporteur FAT/CD36, permettant l'absorption des acides gras du plasma tant au niveau hépatique que musculaire (**Greco et al., 2008 ; Fabbrini et al., 2009**).

**Shimomura et al. (1999)** ont suggéré que, chez le rat, l'hyperinsulinémie seule stimule l'accumulation de graisses dans le foie, activant *de novo* la synthèse des acides gras (lipogénèse) via

le facteur de transcription, protéine de liaison aux éléments de réponse au stérol-1c (SREBP-1c), qui active la plupart des gènes impliqués dans la lipogenèse. Il est intéressant de noter que la contribution de la lipogenèse à la production de triglycérides (TG) intrahépatiques est limitée chez les sujets normaux, tandis que elle est beaucoup plus importante chez les sujets atteints de NAFLD (**Fabbrini et al., 2010**).

De façon intéressante, **Fabbrini et al., (2008)** rapportent que la sécrétion de VLDL augmente linéairement avec la concentration de TG intrahépatiques chez les sujets sans NAFLD, tandis que cette sécrétion atteint un pic chez les sujets avec NAFLD. Les mécanismes responsables de ce phénomène ne sont pas connus, mais ils peuvent être dus à la taille de VLDL excédant le diamètre de sinusoides qui empêcherait leur libération par les hépatocytes (**Horton et al., 1999**). Quant à l'oxydation hépatique des acides gras, bien que des données issues des modèles animaux montrent que son augmentation diminue l'accumulation de lipides dans le foie et, vice-versa, son inhibition induit une stéatose hépatique (**Zhang et al., 2007, Stefanovic-Radic et al., 2008**). La  $\beta$ -oxydation des acides gras se produit au niveau mitochondrial, des altérations structurelles et fonctionnelles des mitochondries sont souvent rencontrées dans les foies stéatosiques (**Fabbrini et al., 2010**).

Des biopsies hépatiques ont été réalisées pour la première fois en 1980 par **Ludwig et al., (1980)** sur des patients avec une maladie hépatique alcoolique; montrant que la stéatose pourrait évoluer vers une stéato-hépatite. Le fait que l'inflammation puisse contribuer à ce processus a été soutenu, d'une part, par la présence de cellules immunitaires importantes infiltrant les sinusoides, et, d'autre part, par l'apparition de lésions inflammatoires qui accompagnaient l'intense activité phagocytaire médiée par le Cellules de Kupffer.

Dans notre étude, à partir du sixième mois de RHC, en plus de la persistante du métabolisme perturbé, l'examen microscopique du tissu hépatique nous a permis d'observer un infiltrat inflammatoire avec clarification de certains cellules hépatiques, et au neuvième mois, l'infiltrat inflammatoire été associée à la destruction du parenchyme hépatique et une désorganisation de l'architecteur histologique du tissu avec une expansion de la fibrose. D'après **Jaafar et al., (2014)**, les cellules du foie perdent leurs délimitations cytoplasmiques ce qui induit leurs dégénérescence. En effet, **Deugnier (2005)**, a montré que la fibrose constitue un obstacle à la circulation sanguine à l'intérieur du foie, le sang provenant de la veine porte, dont le débit est important, trouve un obstacle au niveau du foie, ce qui induit une sur-pression ce qui cause un risque d'hémorragie.

La NASH est définie par la présence de stéatose et d'inflammation, avec ou sans développement de fibrose. Actuellement, la théorie la plus largement acceptée pour la progression de la NAFLD vers la NASH est la «Hypothèse 2-Hit» proposée en 1998 (**Day et James 1998**) dérivée des grandes réponses immunitaires adaptatives induites par des lésions cellulaires provoquées par des AG libre hépatiques excessifs.

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. Les cellules activées de Kupffer sécrètent non seulement des cytokines pro-inflammatoires excessives telles que le TNF $\alpha$  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**).

Selon **Julien, (2010)**, les atteintes morphologiques et fonctionnels du foie évoluent en deux phases, une étape initiale et réversible caractérisée par une hypertrophie des lobules et des cellules hépatiques associée à un hyperfonctionnement et une augmentation de volume tant chez l'humain que dans différents modèles expérimentaux. Plus tard, le développement d'une fibrose hépatique, caractérisable par une accumulation des fibres de collagènes occupant le tissu hépatique définit le stade de lésions organiques peu ou pas réversibles. Les principales protéines de la MEC qui s'accumulent, sont notamment les collagènes de type I, III et IV, ainsi que la fibronectine. Cette accumulation résulte à la fois d'une augmentation de synthèse des fibres mais aussi d'une diminution de leur dégradation par les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire.

De plus de la lipotoxicité intrahépatique, la NASH promue par DT2 peut également dériver de crosstalk avec les tissus périphériques. Sous des états résistants à l'insuline, la lipolyse induite par le tissu adipeux blanc favorise la libération d'AG libre, entraînant le recrutement et l'activation des macrophages dans le tissu adipeux. Les macrophages M1 activés sécrètent à leur tour de grandes quantités de cytokines, notamment la protéine chimiotactique monocyttaire 1, le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ , qui induisent non seulement le cercle vicieux de la résistance locale à l'insuline, mais favorisent également l'infiltration de cytokines pro-inflammatoires. Dans le foie. En effet, des études cliniques ont montré que les individus atteints de NASH présentaient des taux sériques de TNF $\alpha$  et IL-6 significativement plus élevés que les individus stéatosiques simples, et que le taux de

TNF $\alpha$  était également augmenté chez les NASH, tant dans le foie que dans le tissu adipeux (**Hu et al., 2017**).

Au cours des dernières années, il a été montré que le tissu adipeux n'est pas simplement un organe de stockage des lipides, mais un tissu ayant une activité endocrine et des fonctions immunitaires importantes. En effet, les adipokines (adiponectine et leptine), libérées par les adipocytes, modulent également l'état inflammatoire lors de l'installation de cette pathologie (**Khan, 2006**).

Le stress oxydant se produit dans la stéatose où elle est considérée comme centrale dans la pathogenèse de la NASH et dans sa progression vers la fibrose/cirrhose. Parmi les voies de signalisation dans lesquelles les ROS jouent un rôle crucial et qui sont impliquées dans la pathogenèse de la NAFLD, on peut citer la réponse cellulaire à l'hypoxie, la régulation de l'activité des phosphatases, et la mort cellulaire induite par TNF- $\alpha$  (**Videla et al., 2004 ; Seki et al., 2002**).

Dans notre étude, l'inflammation et l'infiltration de macrophages ont été détectées par marquage du CD3 et CD163 au moyen d'études immunohistochimiques.

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 (**Svensen et al., 2017**) et que l'activation des cellules de Kupffer est un facteur causal de lésions hépatiques dans la NASH. De plus, des études récentes indiquent que l'expression hépatique des cellules CD163 + est augmentée dans un modèle de NAFLD induit par le régime chez les rongeurs (**De Vito et al., 2012**). Cependant, **Bauer et al. (2011)** Ils ne rapportaient aucune différence entre le CD163 dans la stéatose hépatique par rapport aux contrôles sains. Cette similitude des niveaux de CD163 pourrait s'expliquer par le nombre limité d'échantillons de foie. Dans notre étude, le marquage de CD163 n'a pas augmenté parallèlement à la sévérité de la NAFLD, ce qui a été en accord avec les résultats de Bauer et al. Nous supposons que ceci a été dû au nombre réduit des échantillons.

D'autre part, **De Vito et al. (2012)**, ont signalé une diminution du nombre de cellules inflammatoires CD3 + chez les enfants avec NASH. Ces observations sont en accord avec nos résultats. Ces mêmes auteurs ont mentionné que la stéatose peut être associée à une réduction des cellules NKT hépatiques, déterminant une altération de l'homéostasie des cytokines avec une augmentation des cytokines pro-inflammatoires qui rendent le foie plus sensible aux agressions nocives.

Des études sur des modèles animaux par **Guebre-Xabier et al. (2000)** et **Kremer et al. (2006)** ont montré une corrélation inversée entre la sévérité de la stéatose et le nombre de cellules NKT, ainsi que d'autres études chez l'humain avec NAFLD menées par **Xu CF et al., 2007**, ont signalé une diminution du nombre des NKT périphérique. Selon, **Eberl et MacDonald, (1998)** cette diminution du nombre des cellules NKT associée à des altérations hépatiques, étaient en corrélation avec une augmentation de la production hépatique des cytokines de la voie Th1 (telles que Tumor necrosis factor- $\alpha$ , IL-12 et interféron- $\gamma$ ) et une diminution des cytokines de la voie Th2 telle que l'IL-4. **Kremer et al. (2010)** ont suggéré que cette réduction des NKT dans la NAFLD a été due à une activation anormale des cellules de Kupffer, avec une augmentation de l'IL-12

La relation fonctionnelle entre l'apoptose (self-killing) et l'autophagie (self-eating) est complexe dans le sens où, dans certaines circonstances, l'autophagie constitue une adaptation au stress qui évite la mort cellulaire et supprime l'apoptose, alors que dans d'autres paramètres cellulaires, il constitue une voie alternative de mort cellulaire. L'autophagie et l'apoptose peuvent être déclenchées par des signaux communs en amont, ce qui entraîne parfois une autophagie et une apoptose combinées (**Maiuri et al., 2007**). Dans ce contexte et afin d'évaluer le mécanisme impliqué dans la mort cellulaire au cours de la NAFLD, un immunomarquage de la protéine régulatrice de l'apoptose, Bcl-2 a été réalisé. Les résultats ont montré une expression aussi faible ou totalement absente chez les témoins ainsi que chez les rats diabétiques. Nos résultats sont en corrélation avec une étude réalisée sur 84 patients à divers stades de la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) par **Panasiuk et al., (2006)**. Ces derniers, ont remarqué une diminution de l'expression de la Bcl-2 avec la progression de la stéatose hépatique, en particulier dans les hépatocytes non stéatosés et une augmentation de l'expression des protéines pro-apoptotiques, principalement p53. Toutefois, il a été démontré que les AG à longue chaîne suppriment les facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2 dans les modèles de rongeurs et les cellules humaines isolées (**Shimabukuro et al., 1998 ; Lupi et al., 2002**). Ces AG peuvent également jouer un rôle crucial dans le renforcement de la stéatose et dans les processus nécrotiques-inflammatoires et la dégradation de l'intégrité du lysosome, qui entraîne la libération de catépsine B et de TNF-alpha (**Feldstein et al., 2004**).

## Conclusion et perspectives

Le diabète est un syndrome métabolique chronique d'étiologie multiple, caractérisée par des niveaux élevés de glucose dans le sang, c'est l'hyperglycémie; en raison de défauts d'action ou de sécrétion d'insuline, ou une combinaison des deux. En effet, les résultats de notre étude rejoignent ceux de la littérature concernant les changements métaboliques, les modifications histologiques hépatiques et l'expression des cellules inflammatoires activées lors du développement du diabète type 2 chez un animal modèle, *Psammomys obesus* soumis à un régime hypercalorique.

Les rats de sable ont manifesté de nombreuses caractéristiques du syndrome métabolique humain. Une augmentation du poids corporel, été observé au début de l'étude. De plus, les animaux obèses présentaient des perturbations au niveau du métabolisme des glucides, des protéines et des lipides, dont une hyperglycémie, une hyperinsulinémie et une dyslipidémie, tous des composants du syndrome métabolique humain.

De plus, alors que les animaux témoins présentaient une histologie hépatique essentiellement normale, le groupe expérimental a montré une infiltration graisseuse macrovacuolaire qui, dépassait le seuil de 50% au 3<sup>ème</sup> mois, à partir du 6<sup>ème</sup> mois, un infiltrat inflammatoire lobulaire et portal se manifeste et à 9 mois, une perte d'architecture cellulaire, ballonnisation et une fibrose portale se produisent.

De plus, une étude immunohistochimique par les anticorps CD3, CD163 qui permis d'évalué la nature cellulaire de l'inflammation hépatique, et l'anticorps de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 a montré une altération au niveau de leur expression en corrélation avec la sévérité de la stéatose hépatique non alcoolique. De plus, une diminution des cellules CD3 + pourrait être impliquée dans la pathogenèse des lésions hépatiques.

Tous les résultats ci-dessus indiquent que le métabolisme de *Psammomys* connu sous le nom de métabolisme économe est bien adapté à la vie dans un environnement à faible énergie, mais il devient compromis à un apport nutritionnel élevé, en raison de l'incapacité des *Psammomys* à faire face à un apport énergétique excessif ; une exposition prolongée au régime hypercalorique conduira à des signes histologiques d'inflammation et de fibrose dans ce modèle animal, l'évaluation de la structure des cellules inflammatoires infiltrantes et hépatiques peut contribuer non seulement au diagnostic de NASH ou à la prédiction de sa progression potentielle vers la fibrose, mais aussi à l'identification de nouvelles voies impliquées dans la progression de la maladie. En outre, notre étude suggère clairement que *Psammomys obesus* est un excellent modèle animal qui reproduit parfaitement la stéatose hépatique non alcoolique humaine et est adapté à la recherche scientifique.

Les expériences sur ce modèle murin pourraient ouvrir la possibilité d'améliorer la gestion thérapeutique précoce des patients et de développer une thérapie capable d'atténuer ou empêcher la progression de la NAFLD.

En perspective, nous pouvons proposer l'extension de l'étude à une plus grande cohorte des rats témoins ainsi que expérimentaux. L'évaluation de l'implication possible d'autres populations de cellules inflammatoires et celle de la mort cellulaire plus spécifiques par l'utilisation de marqueurs complémentaires, sont certainement nécessaires.

## 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
- Adinortey, M. B. (2017). Biochemicophysiological Mechanisms Underlying Signs and Symptoms Associated with Diabetes mellitus. *Advances in Biological Research*, 11(5), 233-241. DOI: 10.5829/idosi.abr.2017.233.241
- Al-Awar, A., Kupai, K., Veszeka, M., Szűcs, G., Attieh, Z., Murlasits, Z., Török, S., Pósa, A.Varga, C. (2016). Experimental diabetes mellitus in different animal models. *Journal of diabetes research*, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9051426>
- Alberti, K. G. M. M., & Zimmet, P. F. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine*, 15(7), 539-553. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S
- American Diabetes Association, (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus, *Diabetes Care*, vol. 37, suppl 1, pp. S81–S90. doi: 10.2337/dc14-S081.
- American Diabetes Association. (2012). Executive summary: Standards of medical care in diabetes-2012. *Diabetes care*, 35, S4. DOI: 10.2337/dc12-s004
- American Diabetes Association. (2017). 2. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*, vol. 40, Supplement 1, S11-S24. <https://doi.org/10.2337/dc17-S005>
- Baliunas, D. O., Taylor, B. J., Irving, H., Roerecke, M., Patra, J., Mohapatra, S., & Rehm, J. (2009). Alcohol as a risk factor for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes care*, 32(11), 2123-2132. doi : <https://doi.org/10.2337/dc09-0227>
- Bauer, S., Weiss, T. S., Wiest, R., Schacherer, D., Hellerbrand, C., Farkas, S., Scherer, M.N., Ritter, M., Schmitz, G., Schäffler, A. et Buechler, C. (2011). Soluble CD163 is not increased in visceral fat and steatotic liver and is even suppressed by free fatty acids in vitro. *Experimental and molecular pathology*, 91(3), 733-739.
- Belkina, A. C., & Denis, G. V. (2010). Obesity genes and insulin resistance. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, 17(5), 472. doi: 10.1097/MED.0b013e32833c5c48
- Bellamy, L., Casas, J. P., Hingorani, A. D., & Williams, D. (2009). Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, 373(9677), 1773-1779. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60731-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60731-5)
- Boucher, J., Kleinridders, A., & Kahn, C. R. (2014). Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(1), a009191. doi: 10.1101/cshperspect.a009191

- Bril, F., & Cusi, K. (2016). Nonalcoholic fatty liver disease: the new complication of type 2 diabetes mellitus. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 45(4), 765-781. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecl.2016.06.005>
- Brunt, E. M. (2010). Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 7(4), 195.
- Burt AD, Mutton A, Day CP 1998. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin Diagn Pathol* 15:246-258.
- Butcher, M. J., Hallinger, D., Garcia, E., Machida, Y., Chakrabarti, S., Nadler, J., Galkina, E.V. and Imai, Y. (2014). Association of proinflammatory cytokines and islet resident leucocytes with islet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 57(3), 491-501.
- Canbay A, Bechmann L, Gerken G 2007. Lipid metabolism in the liver. *Z Gastroenterol* 45(1):35-41.
- Cefalu, W. T. (2006). Animal models of type 2 diabetes: clinical presentation and pathophysiological relevance to the human condition. *ILAR journal*, 47(3), 186-198. DOI: 10.1093/ilar.47.3.186
- Chami, M. A., Zemmour, L., Midoun, N., & Belhadj, M. (2015). Diabète sucré du sujet âgé: la première enquête algérienne. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 9(2), 210-215.
- Chang, A. M., & Halter, J. B. (2003). Aging and insulin secretion. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 284(1), E7-E12. DOI: 10.1152/ajpendo.00366.2002
- Chatterjee, S., Khunti, K., & Davies, M. J. (2017). Type 2 diabetes. *The Lancet*, 389(10085), 2239-2251. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30058-2.
- Chatzigeorgiou, A., Halapas, A., Kalafatakis, K., & Kamper, E. (2009). The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo*, 23(2), 245-258.
- Chaudhury, A., Duvoor, C., Dendi, R., Sena, V., Kraleti, S., Chada, A., Ravilla, R., Marco, A., Shekhawat, N.S., Montales, M.T. and Kuriakose, K. (2017). Clinical review of antidiabetic drugs: Implications for type 2 diabetes mellitus management. *Frontiers in endocrinology*, Vol 8, n°6. doi: 10.3389/fendo.2017.00006
- Chawla, A., Chawla, R., & Jaggi, S. (2016). Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: distinct or continuum?. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 20(4), 546. doi: 10.4103/2230-8210.183480
- Cho, N. H., Shaw, J. E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J. D., Ohlrogge, A. W., & Malanda, B. (2018). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes research and clinical practice*, 138, 271-281. doi: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023>
- Clark, J. M., & Diehl, A. M. (2002). Hepatic steatosis and type 2 diabetes mellitus. *Current diabetes reports*, 2(3), 210-215.

- Cornell, S. (2015). Continual evolution of type 2 diabetes: an update on pathophysiology and emerging treatment options. *Therapeutics and clinical risk management*, 11, 621. doi: <http://dx.doi.org/10.2147/TCRM.S67387>
- Cotoi C., Quaglia A. (2016) Normal Liver Anatomy and Introduction to Liver Histology. In: Guandalini S., Dhawan A., Branski D. (eds) *Textbook of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*. Springer, Cham. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-17169-2\\_53](https://doi.org/10.1007/978-3-319-17169-2_53)
- Couinaud, C. (1957). *Le foie: études anatomiques et chirurgicales*. Masson & Cie.
- Daly, M., & Daly, S. (1973). On the feeding ecology of *Psammomys obesus* (Rodentia, Gerbillidae) in the Wadi Saoura, Algeria. *Mammalia*, 37(4), 545-561. DOI: <https://doi.org/10.1515/mamm.1973.37.4.545>.
- Day CP, James OF 1998. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998 114:842-845.
- De Faria Maraschin, J. (2013). Classification of diabetes. In: Ahmad, S. I. *Diabetes: An Old Disease, a New Insight*. New York: Springer, (pp. 12-19). DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5441-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5441-0_2)
- De Vito, R., Alisi, A., Masotti, A., Ceccarelli, S., Panera, N., Citti, A., Salata, M., Valenti, L., Feldstein, A.E. et Nobili, V. (2012). Markers of activated inflammatory cells correlate with severity of liver damage in children with nonalcoholic fatty liver disease. *International journal of molecular medicine*, 30(1), 49-56.
- Deepa, M., Anjana, R. M., & Mohan, V. (2017). Role of lifestyle factors in the epidemic of diabetes: lessons learnt from India. *European Journal of Clinical Nutrition*, 71, 825–831. doi: 10.1038/ejcn.2017.19
- DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., Hu, F.B., Kahn, C.R., Raz, I., Shulman, G.I. and Simonson, D. C. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature reviews Disease primers*, 1, 15019. doi:10.1038/nrdp.2015.19
- Della Volpe, K. Half of Patients With Type 2 Diabetes Have Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Misea jour le 24 juillet 2017*. In : *endocrine web for healthcare professionals*, [en ligne]. Disponible sur :< <https://www.endocrineweb.com/professional/type-2-diabetes/half-patients-type-2-diabetes-have-nonalcoholic-fatty-liver-disease-rec>> (consulté le 6 juin 2018)
- Dini, L., Pagliara, P., & Carlà, E. C. (2002). Phagocytosis of apoptotic cells by liver: a morphological study. *Microscopy research and technique*, 57(6), 530-540. DOI: 10.1002/jemt.10107
- Donath, M. Y. (2014). Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start. *Nature reviews Drug discovery*, 13(6), 465-476. doi:10.1038/nrd4275
- Donath, M. Y., & Shoelson, S. E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*, 11(2), 98. doi:10.1038/nri2925
- Donath, M.Y., Gross, D.J., Cerasi, E., Kaiser, N., 1999. Hyperglycemia-induced  $\beta$ -cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes*.48,738–744.

- Dr. Oriana Ciacio, Pr. Denis Castaing. 24 Mars 2015 Le Foie et les Voies Biliaires: Anatomie. Centre Hépatobiliaire Paul Brousse. [En ligne]. [Citation : 1 juin 2018.] <http://www.centre-hepatobiliaire.org/maladies-foie/anatomie-foie.html>.
- Eberl, G., & MacDonald, H. R. (1998). Rapid death and regeneration of NKT cells in anti-CD3 $\epsilon$ -or IL-12-treated mice: a major role for bone marrow in NKT cell homeostasis. *Immunity*, 9(3), 345-353.
- Ehses, J. A., Perren, A., Eppler, E., Ribaux, P., Pospisilik, J. A., Maor-Cahn, R., ... & Fontana, A. (2007). Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes*, 56(9), 2356-2370.
- El Aoufi, S., Gendre, P., Sennoune, S. R., Rigoard, P., Maixent, J. M., & Griene, L. (2007). A high calorie diet induces type 2 diabetes in the desert sand rat (*Psammomys obesus*). *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 53(Suppl), OL943-953.
- Esser, N., Legrand-Poels, S., Piette, J., Scheen, A. J., & Paquot, N. (2014). Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*, 105(2), 141-150. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2014.04.006>
- Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, Pietka T, Abumrad NA, Patterson BW, et al 2009. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:15430-15435.
- Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S 2008. Alterations in adipose tissue and hepatic liver kinetics in obese men and women with non alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 134:424-431.
- Fabbrini, E., Sullivan, S., & Klein, S. (2010). Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*, 51(2), 679-689.
- Fanning, E., & O'Shea, D. (2018). Genetics and the metabolic syndrome. *Clinics in Dermatology*, 36(1), 9-13. doi: 10.1016/j.clindermatol.2017.09.003.
- Federation internationale du diabète. (2017). Atlas du diabète de la FID.8<sup>ème</sup> édition. International Diabetes Federation.
- Feldstein, A. E., Werneburg, N. W., Canbay, A., Guicciardi, M. E., Bronk, S. F., Rydzewski, R., Burgart, L.J. et Gores, G. J. (2004). Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- $\alpha$  expression via a lysosomal pathway. *Hepatology*, 40(1), 185-194.
- Franconi, F., Seghieri, G., Canu, S., Straface, E., Campesi, I., & Malorni, W. (2008). Are the available experimental models of type 2 diabetes appropriate for a gender perspective?. *Pharmacological research*, 57(1), 6-18. doi:10.1016/j.phrs.2007.11.007
- Fuchsberger, C., Flannick, J., Teslovich, T. M., Mahajan, A., Agarwala, V., Gaulton, K. J., ... & Rivas, M. A. (2016). The genetic architecture of type 2 diabetes. *Nature*, 536(7614), 41. doi: 10.1038/nature18642
- Gabe, M. (1968). *Techniques histologiques* (Vol. 427). Paris: Masson.

- Giacchetti, G., Sechi, L. A., Rilli, S., & Carey, R. M. (2005). The renin–angiotensin–aldosterone system, glucose metabolism and diabetes. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 16(3), 120–126. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.02.003>
- Giorda, C., Forlani, G., Manti, R., Mazzella, N., De Cosmo, S., Rossi, M. C., Nicolucci, A., Russo, G., Di Bartolo, P., Ceriello, A. and Guida, P. (2017). Occurrence over time and regression of nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 33(4), e2878. doi: 10.1002/dmrr.2878
- Gluchowski, N. L., Becuwe, M., Walther, T. C., & Farese Jr, R. V. (2017). Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14(6), 343. doi:10.1038/nrgastro.2017.32
- Göke, B. (2008). Islet cell function:  $\alpha$  and  $\beta$  cells—partners towards normoglycaemia. *International Journal of Clinical Practice*, 62(s159), 2–7. doi: 10.1111/j.1742-1241.2007.01686.x
- Gray, H., & Lewis, W. H. (2000). *Anatomy of the human body*. 20th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1918; Bartleby.
- Greco D, Kotronen A, Westerbacka J, Puig O, Arkkila P, Kiviluoto T, et al 2008. Gene expression in human NAFLD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294: G1281-1287.
- Grisham, J.W. (2009) Organizational principles of the liver, in *The Liver: Biology and Pathobiology*, 5th edn (ed. I.M. Arias), Wiley-Blackwell, Chichester, pp. 3–15.
- Guebre-Xabier, M., Yang, S., Lin, H. Z., Schwenk, R., Krzych, U., & Diehl, A. M. (2000). Altered hepatic lymphocyte subpopulations in obesity-related murine fatty livers: Potential mechanism for sensitization to liver damage. *Hepatology*, 31(3), 633–640.
- Guillausseau, P. J., & Laloi-Michelin, M. (2003). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *La Revue de medecine interne*, 24(11), 730–737.
- Hackett, R. A., & Steptoe, A. (2017). Type 2 diabetes mellitus and psychological stress—a modifiable risk factor. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(9), 547. doi:10.1038/nrendo.2017.64
- Haeusler, R. A., McGraw, T. E., & Accili, D. (2017). Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(1), 31. doi:10.1038/nrm.2017.89
- Hargreaves, A. D., Zhou, L., Christensen, J., Marlétaz, F., Liu, S., Li, F., Liu, S., Li, F., Jansen, P.G., Spiga, E., Hansen, M.T., Pedersen, S.V.H. et Biswas, S. (2017). Genome sequence of a diabetes-prone rodent reveals a mutation hotspot around the ParaHox gene cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(29), 7677–7682.
- He, W., Yuan, T., Choezom, D., Hunkler, H., Annamalai, K., Lupse, B., & Maedler, K. (2018). Ageing potentiates diet-induced glucose intolerance,  $\beta$ -cell failure and tissue inflammation through TLR4. *Scientific reports*, 8(1), 2767. DOI:10.1038/s41598-018-20909-w.

- Henriksen, E. J., Diamond-Stanic, M. K., & Marchionne, E. M. (2011). Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5), 993-999. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.005
- Henson, J., Edwardson, C. L., Davies, M. J., & Yates, T. (2018). Sedentary Behaviour, Diabetes, and the Metabolic Syndrome. In: Leitzmann, M. F., Jochem, C., & Schmid, D. *Sedentary Behaviour Epidemiology*. 1er edition. Springer Series on Epidemiology and Public Health, (pp. 193-214). DOI 10.1007/978-3-319-61552-3\_8
- Herder, C., Brunner, E. J., Rathmann, W., Strassburger, K., Tabák, A. G., Schloot, N. C., & Witte, D. R. (2009). Elevated levels of the anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist precede the onset of type 2 diabetes: the Whitehall II study. *Diabetes care*, 32(3), 421-423. Doi: <https://doi.org/10.2337/dc08-1161>
- Horton JD, Shimano H, Hamilton RL, Brown MS, Goldstein JL 1999. Disruption of LDL receptor gene in transgenic SREBP-1a mice unmasks hyperlipidemia resulting from production of lipidrich VLDL. *J Clin Invest* 103:1067-1076.
- 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
- Hupfeld, C. J., Courtney, C. H., & Olefsky, J. M. (2010). Type 2 diabetes mellitus: etiology, pathogenesis, and natural history. In: Jameson, J. L., & De Groot, L. J. *Endocrinology: Adult and Pediatric*. Seventh edition. Elsevier Health Sciences. (pp. 691-714).
- Ismail, M. H. (2011). Nonalcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus: the hidden epidemic. *The American journal of the medical sciences*, 341(6), 485-492. DOI: <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e3182018598>
- Jodi crossingham, interactive 3D liver anatomy. [en ligne]. (2008) Disponible sur: <[http://pie.med.utoronto.ca/VLiver/VLiver\\_content/VLiver\\_interactiveLiver.html](http://pie.med.utoronto.ca/VLiver/VLiver_content/VLiver_interactiveLiver.html)> (consulté le 1 juin, 2018)
- 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), E808-E815.
- 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
- Kahn, S. E., Cooper, M. E., & Del Prato, S. (2014). Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *The Lancet*, 383(9922), 1068-1083. Doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62154-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62154-6).
- Kahn, S.E., 2000. The importance of the  $\beta$ -cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Am J Med*. 108 (6), 2S–8S.

- Kalderon, B., Gutman, A., Levy, E., Shafrir, E., Adler, J.H., 1986. Characterization of stages in the development of obesity-diabetes syndrome in the sand rat (*Psammomys obesus*). *Diabetes* 35, 717–724.
- Kalman, R., Ziv, E., Lazarovici, G., & Shafrir, E. (2012). Sand rat. In *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. First edition. Academic Press. (pp. 1171-1190).
- Kanety, H., Moshe, S., Shafrir, E., Lunenfeld, B., Karasik, A., 1994. Hyperinsulinemia induces a reversible impairment in receptor function leading to diabetes in the sand rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 91, 1853–1857.
- Keddad, A. Epidémiologie du diabète dans le monde et en Algérie. [en ligne]. (2 août 2017) Disponible sur : < <https://pharmainvest.dz/epidemiologie-du-diabete-dans-le-monde-et-en-algerie/> > (consulté le 12 May, 2018)
- Khalkhal, A., Haddar, A., Semiane, N., Mallek, A., Abdelmalek, A., Castex, F., & Dahmani, Y. (2012). Obesity, insulin resistance and diabetes in the sand rat exposed to a hypercaloric diet; possible protective effect for IL1- $\beta$ . *Elsevier Masson*, 335(4), 271-278. doi:10.1016/j.crv.2012.03.003
- Khan, N. A. (2006). Inflammation et immunité: implications dans l'obésité et le diabète de type 2. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 13(5), 343-351.
- Kiernan, F. (1833). XXIX. The anatomy and physiology of the liver. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, 123, 711-770.
- King, A. J. (2012). The use of animal models in diabetes research. *British journal of pharmacology*, 166(3), 877-894. DOI:10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x
- Kremer, M., Hines, I. N., Milton, R. J., & Wheeler, M. D. (2006). Favored T helper 1 response in a mouse model of hepatosteatosis is associated with enhanced T cell-mediated hepatitis. *Hepatology*, 44(1), 216-227.
- Kremer, M., Thomas, E., Milton, R. J., Perry, A. W., Van Rooijen, N., Wheeler, M. D., Zacks, S., Fried, M., Rippe, R.A. et Hines, I. N. (2010). Kupffer cell and interleukin-12-dependent loss of natural killer T cells in hepatosteatosis. *Hepatology*, 51(1), 130-141.
- Leclercq, I., & Sempoux, C. (2006). Hépatopathie non alcoolique: de la stéatose à la cirrhose. *Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. Acta endoscopica*, 36(3), 299-314.
- Leibowitz, G., Yuli, M., Donath, M. Y., Neshier, R., Melloul, D., Cerasi, E Gross D.J., Kaiser, N. (2001). beta-cell glucotoxicity in the *Psammomys obesus* model of type 2 diabetes. *Diabetes*, 50(suppl 1), S113. Doi: <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.2007.S113>
- Lewis JR, Mohanty SR 2010 Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. *Dig Dis Sci* 55:560-578.

- Lewis, G. F., Carpentier, A., Adeli, K., & Giacca, A. (2002). Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocrine reviews*, 23(2), 201-229.
- Lewis, J. R., & Mohanty, S. R. (2010). Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. *Digestive diseases and sciences*, 55(3), 560-578.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. (2000). Overview of membrane transport proteins. In *Molecular cell biology* (4th ed., section 15.2). New York, NY: W. H. Freeman. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21592/>.
- Lupi, R., Dotta, F., Marselli, L., Del Guerra, S., Masini, M., Santangelo, C., Patané, G., Boggi, U., Piro, S., Anello, M. et Bergamini, E. (2002). Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that  $\beta$ -cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes*, 51(5), 1437-1442.
- Maedler, K., Sergeev, P., Ris, F., Oberholzer, J., Joller-Jemelka, H. I., Spinas, G. A., Kaiser, N., Halban, P.A. and Donath, M. Y. (2002). Glucose-induced  $\beta$  cell production of IL-1 $\beta$  contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *The Journal of clinical investigation*, 110(6), 851-860.
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., & Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(9), 741.
- Malek, R., Belateche, F., Laouamri, S., Hamdi-Cherif, M., Touabti, A., Bendib, W., Nechadi, A., Mekideche, F.Z. and Hanat, S. (2001). Prévalence du diabète de type 2 et de l'intolérance au glucose dans la région de Sétif (Algérie). *diabète Metab (Paris)*, vol. 27, n° 2, 164-171.
- 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.
- Martoja, R., & Martoja-Pierson, M. (1967). *Initiation aux techniques de l'histologie animale*.
- 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*. InTech. Doi: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.68771>
- Mittendorfer, B., Magkos, F., Fabbrini, E., Mohammed, B. S., & Klein, S. (2009). Relationship between body fat mass and free fatty acid kinetics in men and women. *Obesity*, 17(10), 1872-1877.
- Neel, J. V. (1962). Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *American journal of human genetics*, 14(4), 353.
- Nelson, A. J., & Nicholls, S. J. (2018). Treating Dyslipidemia in Type 2 Diabetes. *Cardiology clinics*. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2017.12.005>

- Olokoba, A. B., Obateru, O. A., & Olokoba, L. B. (2012). Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman medical journal*, 27(4), 269-273. DOI 10. 5001/omj.2012.68
- Organisation mondiale de la Santé. (2016). Rapport mondial sur le diabète.
- Organisation mondiale de la santé. Maladies non transmissibles[en ligne]. Aide-mémoire N°355, juin 2017. <http://origin.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/fr/> (consulté le 6 May, 2018)
- Osborn, O., & Olefsky, J. M. (2012). The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nature medicine*, 18(3), 363. doi:10.1038/nm.2627
- Panasiuk, A., Dzieciol, J., Panasiuk, B., & Prokopowicz, D. (2006). Expression of p53, Bax and Bcl-2 proteins in hepatocytes in non-alcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology: WJG*, 12(38), 6198.
- Pariante, A. (2015). Le système SAF et l’algorithme FLIP: des outils utiles et efficaces pour le diagnostic de stéatohépatite non alcoolique. *Hépatogastro & Oncologie Digestive*, 22(1), 74-78.
- Petta, S., Muratore, C., & Craxi, A. (2009). Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: the present and the future. *Digestive and Liver Disease*, 41(9), 615-625. doi:10.1016/j.dld.2009.01.004
- Pickup, J. C., Mattock, M. B., Chusney, G. D., & Burt, D. (1997). NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia*, 40(11), 1286. DOI: <https://doi.org/10.1007/s001250050822>
- Poitout, V., & Robertson, R. P. (2002). Minireview: secondary  $\beta$ -cell failure in type 2 diabetes—a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology*, 143(2), 339-342.
- Postic, C., Dentin, R., & Girard, J. (2004). Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes & metabolism*, 30(5), 398-408.
- Pradhan, A. D., Manson, J. E., Rifai, N., Buring, J. E., & Ridker, P. M. (2001). C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *Jama*, 286(3), 327-334.
- Prasad, R. B., & Groop, L. (2015). Genetics of type 2 diabetes—pitfalls and possibilities. *Genes*, 6(1), 87-123. doi:10.3390/genes6010087
- Pratley, R. E. (2013). The early treatment of type 2 diabetes. *The American journal of medicine*, Vol 126, n° 9A. S2-S9. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2013.06.007>
- Puchulu, F. M. (2018). Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. In: Cohen Sabban, E. N., Puchulu, F. M., Cusi, K. *Dermatology and Diabetes*. 1er édition. Springer, (pp. 7-18). Doi: 10.1007/978-3-319-72475-1\_2.
- Punthakee, Z., Goldenberg, R., & Katz, P. (2018). Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome. *Canadian Journal of Diabetes*, 42, S10-S15. doi: 10.1016/j.cjcd.2017.10.003
- Racanelli, V., et Rehermann, B. (2006). The liver as an immunological organ. *Hepatology*, 43(S1), S54-S62.

- Raccach, D. (2004). Epidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. *EMC-Endocrinologie*, 1(1), 29-42.
- Rewers, M., & Ludvigsson, J. (2016). Environmental risk factors for type 1 diabetes. *The Lancet*, 387(10035), 2340-2348. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30507-4
- Reynolds, K., Saydah, S. H., Isom, S., Divers, J., Lawrence, J. M., Dabelea, D., Mayer-Davis, E.J., Imperatore, G., Bell, R.A. and Hamman, R.F., (2018). Mortality in youth-onset type 1 and type 2 diabetes: The SEARCH for Diabetes in Youth study. *Journal of diabetes and its complications*. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2018.03.015
- Rines, A. K., Sharabi, K., Tavares, C. D., & Puigserver, P. (2016). Targeting hepatic glucose metabolism in the treatment of type 2 diabetes. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15(11), 786.
- Rines, A. K., Sharabi, K., Tavares, C. D., & Puigserver, P. (2016). Targeting hepatic glucose metabolism in the treatment of type 2 diabetes. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15(11), 786.
- Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y., & Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & molecular medicine*, 48(3), e219. doi:10.1038/emm.2016.6
- Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Comprehensive physiology*. Doi:10.1002/cphy.c130024
- Sah, S. P., Singh, B., Choudhary, S., & Kumar, A. (2016). Animal models of insulin resistance: A review. *Pharmacological Reports*, 68(6), 1165-1177. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2016.07.010>
- Scapin, G., Dandey, V. P., Zhang, Z., Prosise, W., Hruza, A., Kelly, T., Mayhood, T., Strickland, C., Potter, C.S. and Carragher, B. (2018). Structure of the insulin receptor–insulin complex by single-particle cryo-EM analysis. *Nature*, 556(7699), 122. <http://dx.doi.org/10.1038/nature26153>
- Scherzer, P., Nachliel, I., Bar-On, H., Popovtzer, M. M., & Ziv, E. (2000). Renal Na-K-ATPase hyperactivity in diabetic *Psammomys obesus* is related to glomerular hyperfiltration but is insulin-independent. *Journal of endocrinology*, 167(2), 347-354.
- Schmidt-Nielsen K., 1964. Desert animals. In: *Physiological Problems of Heat and Water*. Oxford University Press, Oxford, pp. 183–186.
- Seki, S., Kitada, T., Yamada, T., Sakaguchi, H., Nakatani, K., & Wakasa, K. (2002). In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *Journal of hepatology*, 37(1), 56-62.
- Shafir, E., & Ziv, E. (1998). Cellular mechanism of nutritionally induced insulin resistance: the desert rodent *Psammomys obesus* and other animals in which insulin resistance leads to detrimental outcome. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 9(2-4), 347-386.
- Shafir, E., Ziv, E., Kalman, R., 2006. Nutritionally induced diabetes in desert rodents as models of type 2 diabetes: *Psammomys obesus* and *Acomys cahirinus* (spiny mice). *ILAR J.* 47, 212–224.

- Shimabukuro, M., Wang, M. Y., Zhou, Y. T., Newgard, C. B., & Unger, R. H. (1998). Protection against lipopoptosis of  $\beta$  cells through leptin-dependent maintenance of Bcl-2 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(16), 9558-9561.
- Shimomura, I., Bashmakov, Y., Ikemoto, S., Horton, J. D., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1999). Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), 13656-13661.
- Shoelson, S. E., Lee, J., & Goldfine, A. B. (2006). Inflammation and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 116(7), 1793-1801. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI29069>.
- Skovsø, S. (2014). Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *Journal of diabetes investigation*, 5(4), 349-358. doi: 10.1111/jdi.12235
- Smith, B. W., & Adams, L. A. (2011). Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus: pathogenesis and treatment. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(8), 456.
- Sparks, J. L. (2017). Liver Tissue Engineering. In: Hassan, A. (eds) *Tissue Engineering for Artificial Organs: Regenerative Medicine, Smart Diagnostics and Personalized Medicine*, 297-324.
- Srinivasan, K., & Ramarao, P. (2007). Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian Journal of Medical Research*, 125(3), 451.
- Stefanovic-Racic, M., Perdomo, G., Mantell, B. S., Sipula, I. J., Brown, N. F., & O'Doherty, R. M. (2008). A moderate increase in carnitine palmitoyltransferase 1a activity is sufficient to substantially reduce hepatic triglyceride levels. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 294(5), E969-E977.
- Svendsen, P., Graversen, J. H., Etzerodt, A., Hager, H., Røge, R., Grønbæk, H., Christensen, E.I., Møller, H.J., Vilstrup, H. et Moestrup, S. K. (2017). Antibody-Directed Glucocorticoid Targeting to CD163 in M2-type Macrophages Attenuates Fructose-Induced Liver Inflammatory Changes. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 4, 50-61.
- Tard, C., Rouxel, O., & Lehuen, A. (2015). Regulatory role of natural killer T cells in diabetes. *Biomedical journal*, 38(6), 484-495. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bj.2015.04.001>
- Tekola-Ayele, F., Adeyemo, A. A., & Rotimi, C. N. (2013). Genetic epidemiology of type 2 diabetes and cardiovascular diseases in Africa. *Progress in cardiovascular diseases*, 56(3), 251-260. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2013.09.013>
- Thermo Fisher Scientific. Avidin-Biotin Complex Method for IHC Detection [en ligne]. Disponible à: <https://www.thermofisher.com/dz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/avidin-biotin-complex-method-ihc-detection.html> . [Date de consultation: 09 jun. 2018].
- Thomas, C. C., & Philipson, L. H. (2015). Update on Diabetes Classification. *Medical Clinics of North America*, 99(1), 1-16. doi: 10.1016/j.mcna.2014.08.015.

- Thomas, N., Jeyaraman, K., Asha, H. S., & Velavan, J. (2012). *A practical guide to diabetes mellitus*. New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publishers (p) Ltd. 620p.
- Vergès, B. (2001). Insulin sensitivity and lipids. *Diabetes & metabolism*, 27(2 Pt 2), 223-227.
- Vetter, C., Devore, E. E., Ramin, C. A., Speizer, F. E., Willett, W. C., & Schernhammer, E. S. (2015). Mismatch of sleep and work timing and risk of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 38(9), 1707-1713. Doi : <https://doi.org/10.2337/dc15-0302>
- Videla LA, Rodrigo R, Araya J, Poniachik J 2004. Oxidative stress and depletion of hepatic longchain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med* 37:1499-1507.
- Vijan, S. (2015). Type 2 diabetes. *Annals of internal medicine*, 162(5), ITC1-ITC1. DOI: 10.7326/0003-4819-152-5-201003020-01003
- Westermarck, P., Andersson, A., & Westermarck, G. T. (2011). Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiological reviews*, 91(3), 795-826.
- Willi, C., Bodenmann, P., Ghali, W. A., Faris, P. D., & Cornuz, J. (2007). Active smoking and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Jama*, 298(22), 2654-2664. doi:10.1001/jama.298.22.2654
- Wong, V. W. S., Adams, L. A., de Lédinghen, V., Wong, G. L. H., & Sookoian, S. (2018). Noninvasive biomarkers in NAFLD and NASH—current progress and future promise. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 1.
- Wu, Y., Ding, Y., Tanaka, Y., & Zhang, W. (2014). Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *International journal of medical sciences*, 11(11), 1185. doi: 10.7150/ijms.10001
- Xu, C. F., Yu, C. H., Li, Y. M., Xu, L., Du, J., & Shen, Z. (2007). Association of the frequency of peripheral natural killer T cells with nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 13(33), 4504.
- Yamazaki, D., Hitomi, H., & Nishiyama, A. (2018). Hypertension with diabetes mellitus complications. *Hypertension Research*, 1. doi:10.1038/s41440-017-0008-y
- Young, B., O'Dowd, G., & Woodford, P. (2015). *Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater*. 2eme édition. De Boeck Supérieur.437p.
- Zhang, D., Liu, Z. X., Choi, C. S., Tian, L., Kibbey, R., Dong, J Cline, G.W., Wood, P.A et Shulman, G. I. (2007). Mitochondrial dysfunction due to long-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency causes hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(43), 17075-17080.
- Zheng, Y., Ley, S. H., & Hu, F. B. (2017). Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews Endocrinology*. doi: 10.1038/nrendo.2017.151.

- Ziv, E., Adler, J.H., Lior, O., Bar-On, H., 1986. Insulin uptake by the liver of the sand rat. *Diabetes* 35, 158A.
- Ziv, E., Kalman, R., Herskop, K., Barash, V., Shafir, E., Bar-On, H., 1996. Insulin resistance in the NIDDM model *Psammomys obesus* in the normoglycaemic, normoinsulinaemic state. *Diabetologia* 39, 1269–1275.
- Zoltowska, M., Ziv, E., Delvin, E., Lambert, M., Seidman, E., & Levy, E. (2004). Both insulin resistance and diabetes in *Psammomys obesus* upregulate the hepatic machinery involved in intracellular VLDL assembly. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(1), 118-123.

## Annexe

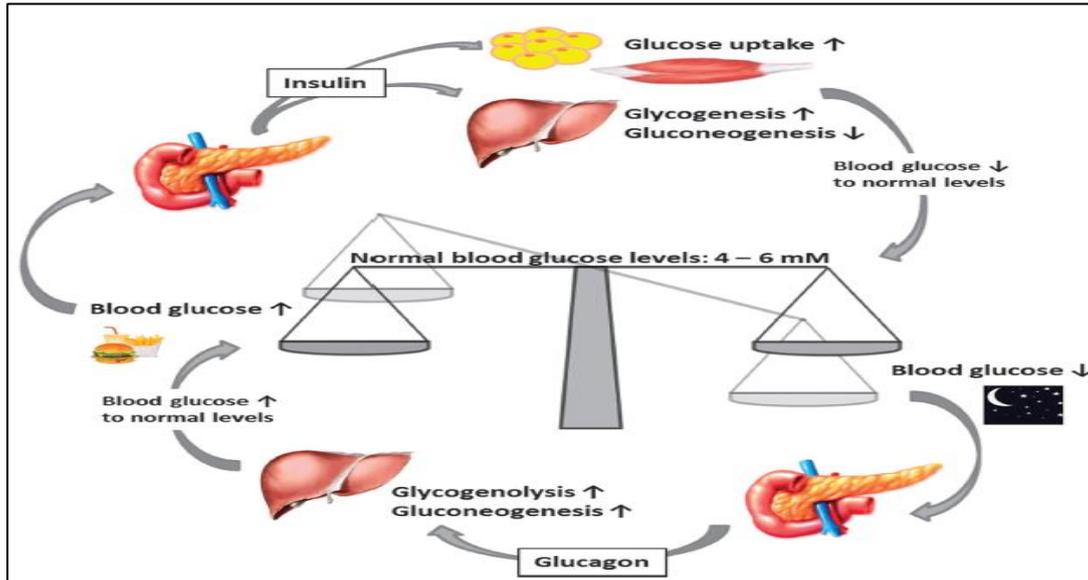


Figure 1| Maintien des niveaux de glucose dans le sang par le glucagon et de l'insuline. (Röder et al., 2016).

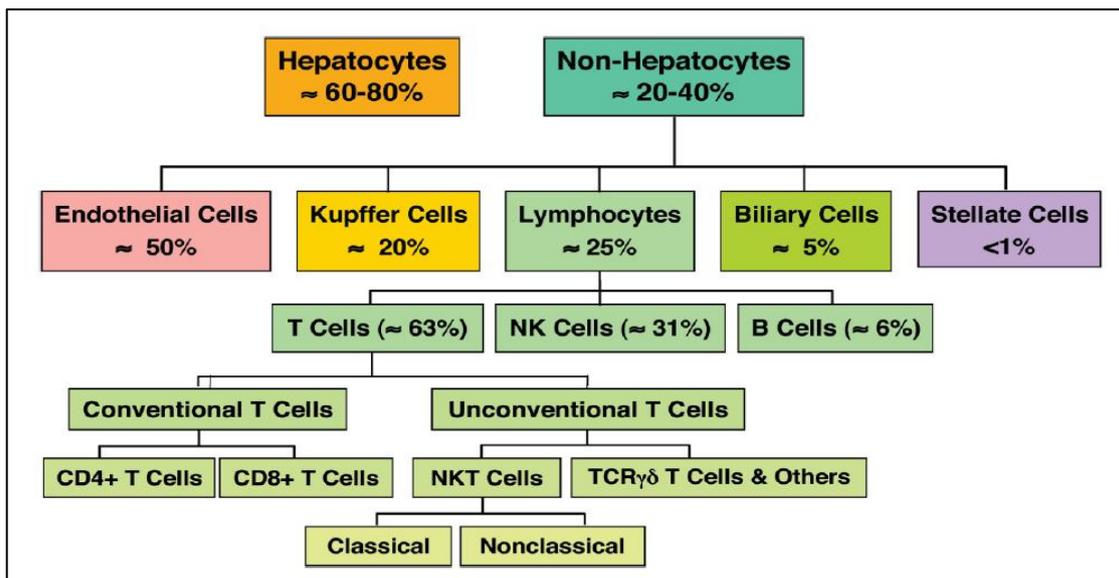


Figure 2.A|Composition cellulaire du foie sain. (Racanelli et Rehermann, 2006)

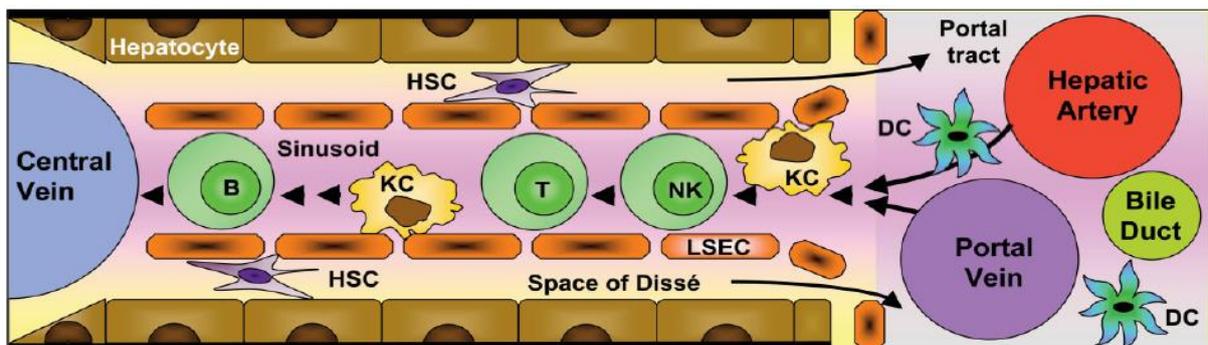


Figure 2.B| Les cellules immunitaires dans le foie en bonne santé. (Racanelli et Rehermann, 2006)

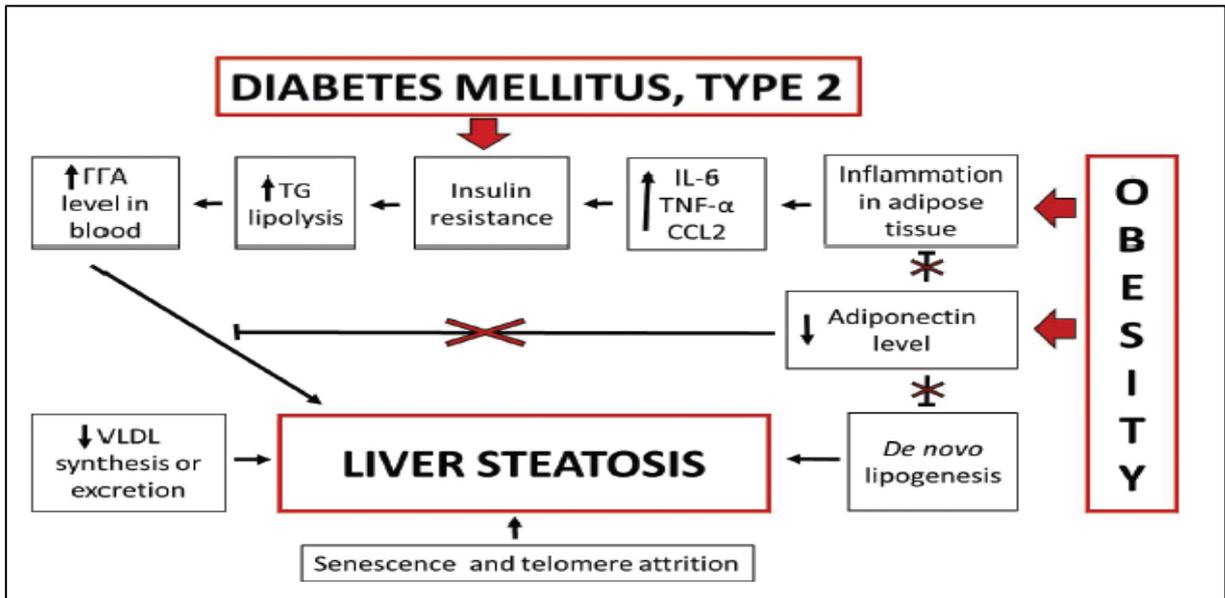


Figure 3.A| Pathogenèse de la stéatose hépatique (Mezale et al., 2017)

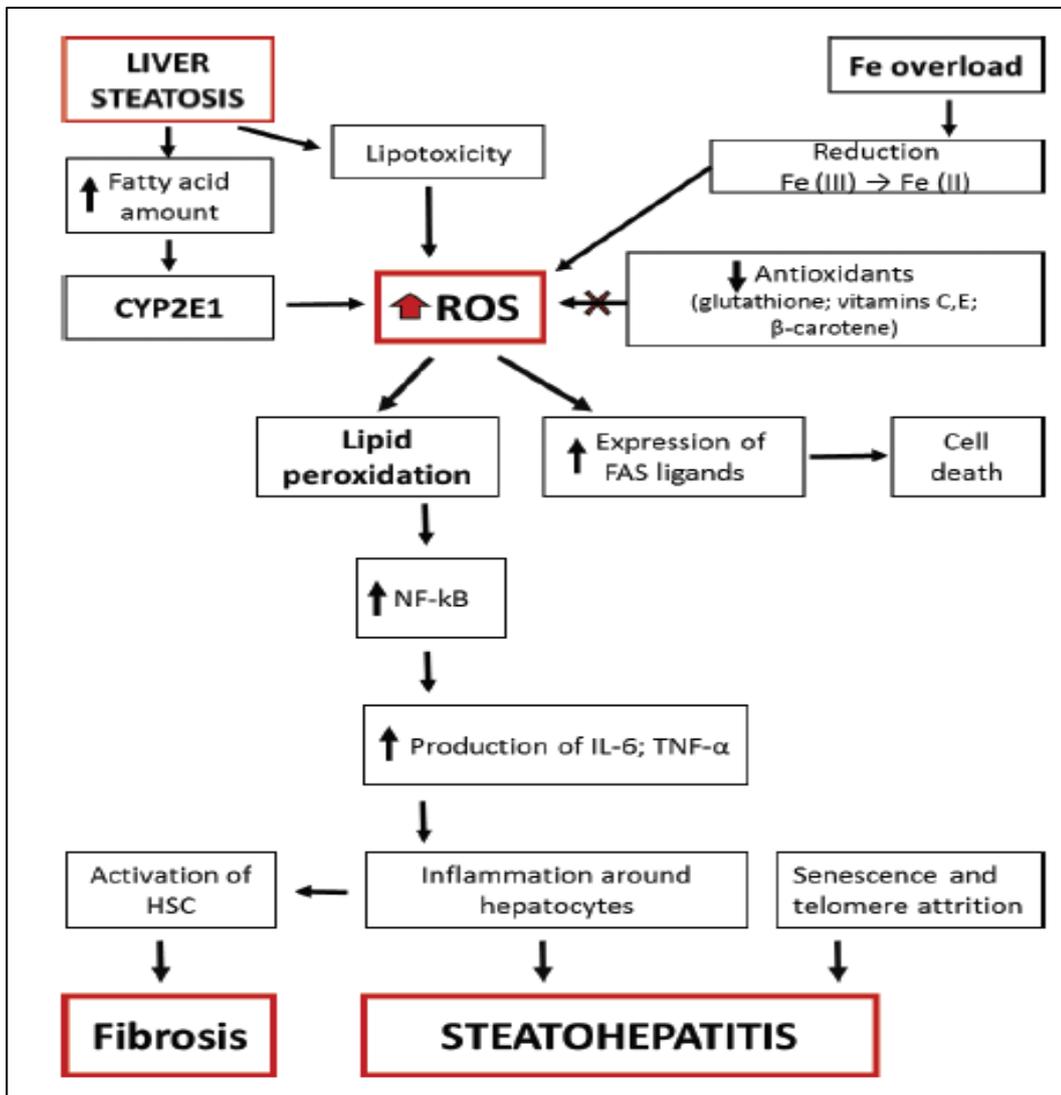


Figure 3.B| Pathogenèse de la stéatohépatite non alcoolique (Mezale et al., 2017)

Figure 4 | le protocole expérimental (Original)

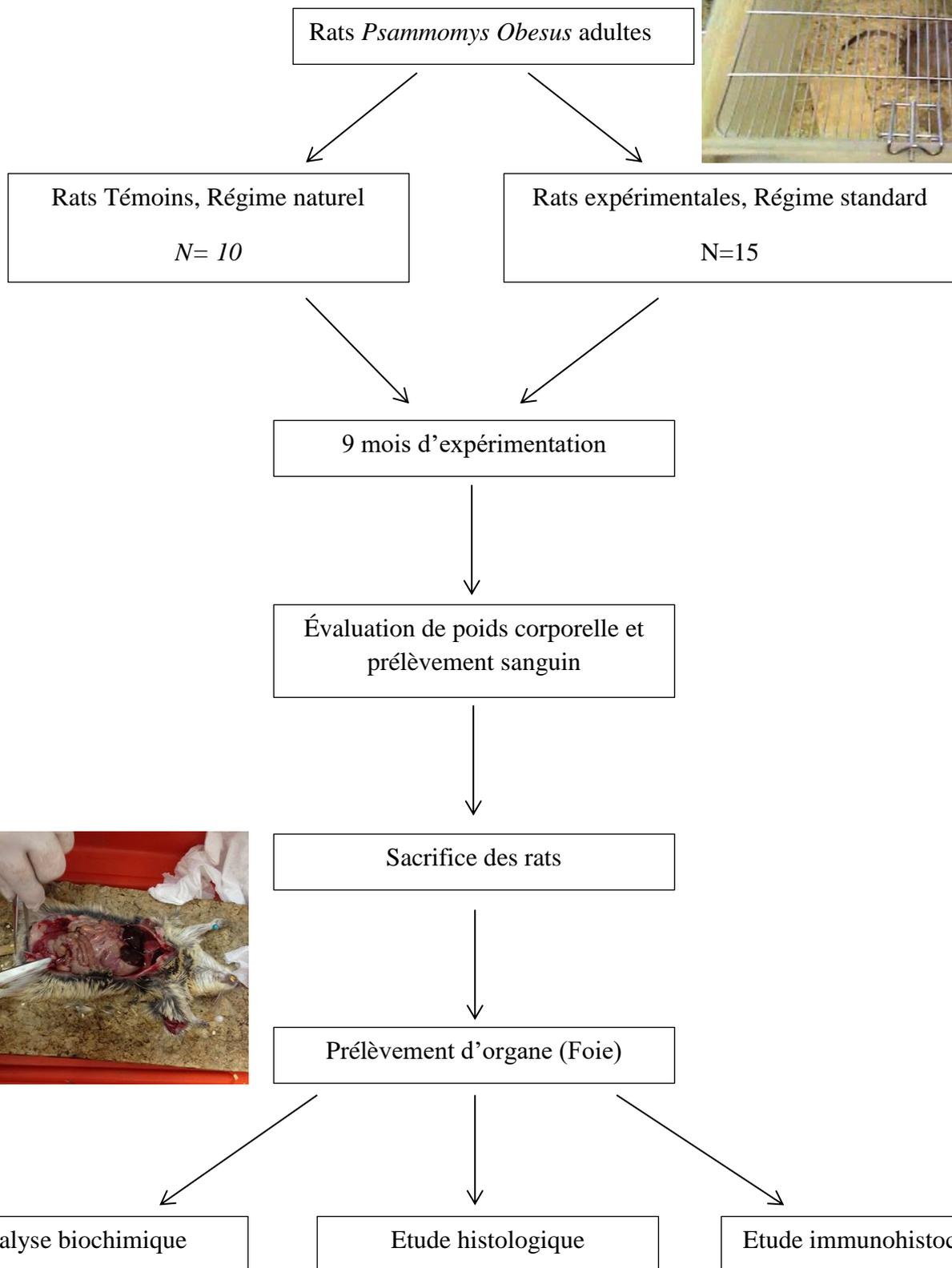


Figure 5 | Schéma des différentes étapes de l'étude histologiques. (Original)



Prélèvement d'organe (Foie)

Fixation

Formole à 10%

Déshydratation

Ethanol de degrés croissant

Éclaircissement

Xylène

Imprégnation

Paraffine liquide



Inclusion (Enrobage)

Blocs de paraffine

Réalisation des coupes

Microtome

Étalement des coupes

Déparaffinage

Xylène

Réhydratation

Éthanol de degrés décroissant

Coloration à l'hématoxyline-éosine

Déshydratation

Ethanol de degrés croissant

Eclaircissement

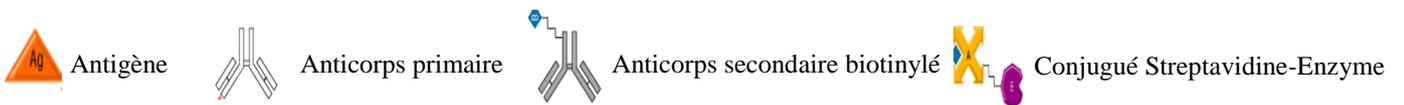
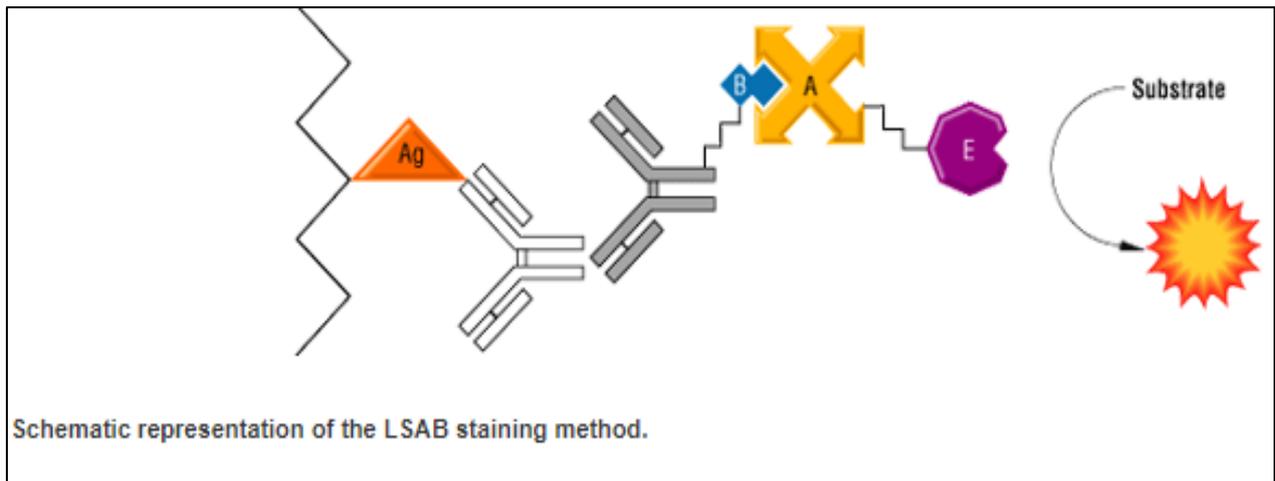
Xylène

Montage des lames

Observation microscopique



**Figure 6| Méthode de marquage à la streptavidine-biotine (LSAB) (Thermo Fisher Scientific)**



**Tableau I| Facteurs de risque du diabète type 2 (original).**

Modifiables		Non modifiables	
Facteurs	Références	Facteurs	Références
Surpoids et Obésité	Belkina et Denis, 2010	Age	Chang et Halter, 2003
Tabagisme	Willi et al., 2007	Antécédents familiaux	Tekola-Ayele et al., 2013
La consommation d'alcool	Baliunas et al., 2009	Facteurs génétiques	Fuchsberger et al., 2016
mauvaise alimentation/nutrition	Kahn et al., 2014	Dyslipidémie	Nelson et Nicholls, 2018
inactivité physique/sédentarité	Henson et al., 2018	Diabète gestationnel	Bellamy et al., 2009
stress psychologique/dépression	Hackett et Steptoe 2017		

**Tableau II: Appareillages et réactifs utilisés dans l'étude. (Original)**

consommables	Appareillages	Matériel et verreries	Réactifs et solutions
Seringues	Balance	Cages	Formol (formaldéhyde à 10%)
Pipette pasteur	Centrifugeuse	Biberons à embouts métalliques	Ethanol
Tubes à essai	Congélateur	Micropipettes	Xylène
Sciure de bois	Automate de circulation (Leica)	Paire de ciseaux	Paraffine
	Appareil d'enrobage (Leica)	Pinces	Hématoxyline de Harris
	Plaque refroidissante	Cassette en plastique	Eosine
	Microtome (Leica)	Moule en métal	Eukitt (Résine synthétique de montage)
	Bain marie	Pinceau	Eau distillé
	Plaque chauffante (Leica)	Panier port lame	Eau salée
	Etuve (Nuve)	Lame en verre ordinaire	Eau physiologique
	Hotte aspirante pour le montage (Labopur)	lames silanisées	Eau ammoniacuée
	PT LINK (DAKO)	Lamelle en verre	Anesthésiés par le chloroforme
	Appareil de l'immunohistochimie automatique (DAKO)	Erlenmeyer	Solution de démasquage
	Microscope optique (Leica)	Stylo hydrophobe (DAKO pen)	Tampon de lavage (TBS) Envision™ FLEX
	Appareil photo numérique		PBR (Peroxydase Blocking Reagent)
			Chromogène de la peroxydase (DAB)
		Alcool acide	

**Tableaux III : Valeurs des poids et de certains paramètres biochimiques des Psammomys obesus soumis au RN pendant 9 mois.**

Temps 0 avant le régime naturel					
Rats	Poids en g	Glycémie en mg/100ml	Triglycérides en mg/100ml	Cholestérol en mg/100ml	Insuline en $\mu$ UI/ml
1	67	64	75	56	25
2	60	54	64	49	24
3	70	49	50	43	22
4	72	56	62	47	23
5	74	63	71	53	26
6	80	85	79	62	32
7	59	74	71	68	20
8	55	73	67	60	28
9	61	67	72	55	27
10	90	62	66	56	53
MOYENNE	68,80	64,70	67,70	54,90	26,20
Ecart type	10,21	10,10	7,64	7,02	4,33
ESM	1,13	1,12	0,85	0,78	0,48

3 mois de régime naturel					
Rats	Poids en g	Glycémie en mg/100ml	Triglycérides en mg/100ml	Cholestérol en mg/100ml	Insuline en $\mu$ UI/ml
1	70	56	70	64	22
2	80	69	65	50	20
3	77	52	47	41	21
4	68	45	60	45	25
5	82	66	57	56	24
6	92	75	76	65	28
7	62	71	70	69	18
8	67	70	64	58	26
9	78	54	74	64	28
10	111	79	62	56	32
MOYENNE	78,70	63,70	64,50	64,80	24,40
Ecart type	13,57	10,62	8,20	7,93	4,05
ESM	1,51	1,18	0,91	0,88	0,45

6 mois de régime naturel					
Rats	Poids en g	Glycémie en mg/100ml	Triglycérides en mg/100ml	Cholestérol en mg/100ml	Insuline en $\mu$ UI/ml
1	84	60	72	56	24
2	88	72	67	49	21
3	83	56	50	45	23
4	75	52	66	50	24
5	90	67	56	60	25
6	101	74	78	66	27
7	77	76	79	69	21
8	89	73	77	70	26
9	86	61	70	72	30
10	125	79	68	66	32
MOYENNE	89,80	67,00	68,30	60,30	25,30
Ecart type	13,59	8,75	8,91	9,26	3,41
ESM	1,51	0,97	0,99	1,03	0,38

9 mois de régime naturel					
Rats	Poids en g	Glycémie en mg/100ml	Triglycérides en mg/100ml	Cholestérol en mg/100ml	Insuline en $\mu$ UI/ml
1	90	65	80	54	25
2	95	77	70	40	23
3	89	60	54	47	26
4	86	58	73	47	24
5	102	71	67	62	23
6	112	78	77	64	30
7	87	82	88	71	26
8	93	86	82	65	31
9	90	72	76	69	33
10	129	82	71	61	34
MOYENNE	97,30	73,10	73,80	58,00	27,50
Ecart type	12,95	9,14	8,85	9,91	3,93
ESM	1,44	1,02	0,98	1,10	0,44

**Tableaux IV : Valeurs des poids et de certains paramètres biochimiques des *Psammomys obesus* soumis au RHC pendant 9 mois.**

Temps 0 avant le régime hypercalorique					
Rats	Poids en g	Glycémie en mg/100ml	Triglycérides en mg/100ml	Cholestérol en mg/100ml	Insuline en $\mu$ UI/ml
11	75	46	61	61	26
12	77	74	90	39	20
13	81	76	75	59	30
14	85	50	75	60	25
15	93	56	80	62	27
16	82	59	76	49	30
17	65	69	57	43	18
18	58	72	59	59	20
19	73	71	70	55	17
20	70	61	65	53	12
21	99	62	78	59	18
22	63	62	90	40	15
23	84	58	77	49	27
24	76	73	99	45	17
25	80	58	98	56	29
moyenne	77,40	63,13	76,67	52,60	22,07
Ecart type	10,93	9,06	13,24	7,90	5,92
ESM	0,78	0,65	0,95	0,56	0,42
	0,06480	0,69641	0,06851	0,47222	0,07513

3 mois de régime hypercalorique					
Rats	Poids en g	Glycémie en mg/100ml	Triglycérides en mg/100ml	Cholestérol en mg/100ml	Insuline en $\mu$ UI/ml
11	95	74	105	70	154
12	99	80	149	97	119
13	102	215	180	230	318
14	109	219	213	238	352
15	105	196	217	93	340
16	106	229	270	110	320
17	137	235	287	240	380
18	130	228	252	217	318
19	103	218	265	115	314
20	97	229	170	117	288
21	111	247	347	100	331
22	98	232	178	120	250
23	96	190	117	82	210
24	91	85	119	90	120
25	87	72	98	77	170
Moyenne	104,40	183,27	197,80	133,07	265,60
Ecart type	13,52	67,42	74,96	63,11	88,35
ESM	0,97	4,82	5,35	4,51	6,31
	0,00014	0,00001	0,00001	0,00077	0,00000
	****	****	****	****	****

6 mois de régime hypercalorique					
Rats	Poids en g	Glycémie en mg/100ml	Triglycérides en mg/100ml	Cholestérol en mg/100ml	Insuline en $\mu$ UI/ml
11	115	80	135	75	160
12	119	219	115	188	250
13	106	97	137	199	136
14	111	248	339	98	363
15	118	215	340	100	299
16	112	102	179	97	165
17	140	250	380	225	382
18	132	219	320	229	319
19	125	187	112	102	240
20	117	263	235	137	329
21	123	290	351	99	439
22	120	273	310	123	332
23	118	219	270	112	252
24	103	90	114	89	240
25	91	223	180	165	300
Moyenne	116,67	198,33	234,47	135,87	280,40
Ecart type	11,73	71,15	100,12	51,79	85,86
ESM	0,84	5,08	7,15	3,70	6,13
	3,30169 E-05	7,16298 E-06	2,87098 E-05	0,00015	2,82071 E-09
	****	****	****	****	****

9 mois de régime hypercalorique					
Rats	Poids en g	Glycémie en mg/100ml	Triglycérides en mg/100ml	Cholestérol en mg/100ml	Insuline en $\mu$ UI/ml
11	127	75	140	97	260
12	120	340	270	114	563
13	108	280	250	100	412
14	114	89	366	235	310
15	123	74	233	259	280
16	117	256	145	103	443
17	145	270	285	150	465
18	135	245	375	135	380
19	127	190	378	128	401
20	123	83	150	179	210
21	129	319	380	176	375
22	122	293	122	94	438
23	119	280	240	102	401
24	115	130	129	87	178
25	96	93	190	99	345
Moyenne	121,33	201,13	243,53	137,20	364,07
Ecart type	11,39	99,72	96,92	53,25	102,26
ESM	0,81	7,12	6,92	3,80	7,30
	8,09514 E-05	0,00054	1,42204 E-05	0,00012	4,14437 E-10
	****	****	****	****	****