REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATTIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE YAHIA FARES –MEDEA-

Thèse de master

Département : Sciences de la Nature et de la Vie
Spécialité : Biologie et Pathologie Cellulaire

IMPLICATION DU STRESS OXYDATIF DANS L'EVOLUTION D'UN MODEL EXPERIMENTAL DE DIABETE DE TYPE II CHEZ LES SOURIS NMRI

Présenté par :

Mme. BENILLES Hafsa

Mme. AMEUR Turkia

Mlle. KAIDI Madina

Soutenu publiquement le 15 juin devant le jury composé de :

Président : Mlle. GASMI Sara	**MCA** à l 'Université Dr Farés Yahia
Examinatrice : Mr. BENAFRI Nadir	**MAB** à l 'Université Dr Farés Yahia
Promotrice : Mme. Pr. BENACHOUR Karine	Pr. à l 'Université Dr Farés Yahia
Co-promotrice : Mme. ABDELLATIF Amina	Doctorante à l 'Université Dr Farés Yahia

Médéa, 2022/2023

Remercîment

Nous exprimons d'abord notre profond remerciement à ***Allah*** *qui nous avoir donné le courage et la volonté D'achever ce travail. Nous souhaiterons remercier oustceux qui ont participé de près ou loin à sa réalisation*

Nous voudrions tout d'abord remercier grandement notre Directrice de thèse le ***Pr BENACHOUR Karine*** *pour nous avoir autorisée d'entreprendre ce travail de thèse sous sa direction, pour la confiance qu'elle nous avoir accordée, sa gentillesse, sa disponibilité et son soutien dans les moments difficiles, pour ses précieux conseils, pour son optimisme infaillible et ses encouragements. Veuillez accepter l'expression de notre gratitude et de nos plus sincères remerciements.*

Nous tenons aussi à remercier également, notre Co-promoteur ***Madame ABDELLATIF Amina.*** *Pour sa disponibilité, et surtout ses judicieux Conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion qui nous a donné une aide indispensable dans notre travail.*

Un grand MERCI à tous ***nos enseignants*** *et* ***nos enseignantes*** *pendant notre cursus universitaire.*

En fin, nos remerciements à ***nos parents*** *qui ont mis à notre disposition tous les moyens matériels et financiers nécessaires. Et* ***les amis*** *du département de BIOLOGIE, spécialement à la section masters BPC, et toutes les personnes qui ont contribué de près ou loin à la réalisation de ce travail.*

Dédicace

C'est avec profonde gratitude et sincère mots, que je dédie cet évènement marquant de ma vie à l'aide de ***Dieu*** *tout puissant, A mes chers parents*

A Mon cher ***papa***
Permettez-moi de vous exprimer mon grand amour Mon attachement et ma plus haute Considération pour Votre personne. Je suis très fière d'être votre fille et de pouvoir enfin réaliser, ce que vous avez tant espéré et attendu de moi.
Vous n'avez jamais cessé de déployer tous vos efforts afin de subvenir à nos besoins, nous encourager et nous aider à choisir le chemin de la Réussite
Votre patience, votre bonne volonté, vos conseils précieux ainsi Que votre confiance en moi ont été pour beaucoup dans ma réussite .Cher père, veillez trouver, dans ce modeste travail, le fruit de Vos sacrifices ainsi que l'expression de ma profonde Affection et ma vive reconnaissance Que Dieu vous protège et vous garde
Ma Chère ***Maman***
Si Dieu a mis le paradis sous les pieds des mères, ce n'est pas pour rien Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheu
A Mon cher mari ***Toufik***
Pour tout l'encouragement, le respect et l'amour que tu m'as offert, Je te dédis ce travail, qui n'aurait pas pu être achevé sans ton éternel soutien et optimisme. Tu es un modèle d'honnêteté, de loyauté et de force de caractère, j'éspère te comlbler et te rendre toujours heureux. Que Dieu réunisse noc chemains pour un
A mes adorables sœurs et mes moitiés : « ***Khadidja*** *», «* ***Hadjer*** *», «* ***Mazora*** *», et la petite perle «* ***Selma*** *» qui m'ont soutenu et encouragé durant toute la préparation de ce mémoire.*
A mon chère et mon bras droit mon frère ***Salah Eddine*** *qui m'a donné la force et le protège A toute*

*la famille ''****BENILLES****''*

A tous ***les enseignants*** *qui ont éclairé mon chemin et ont été la raison de mon arrivée à ce jour*

A ***mes amies*** *je vous remercie infiniment pour les cinq ans universitaires Passés, je me rappellerai toujours de tous les bons moments que nous avions partagés ensemble et qui resteront gravé dans ma mémoire, je vous souhaite que le meilleur des meilleurs.*
HAFSA

Dédicace

***Je** dédie ce modèste travail, à mon cher mari car il m'a encouragé, et m'aider durant cette periode.*

***A** mes chers enfants, **chouaib**, **nahla**, et souhaib, et à mes parents.*

A** mon beaux frère **hichèm

***A** mes collègues de travail à l'EPH de Aîn boucif, service de laboratoire.*

Turkia

Dédicace

Grâce à l'aide de dieu

Au terme de toutes ces années d'étude je dédie ce modeste travail en signe de respect et de remerciement :

-A ce qui ont donnée un sens pour mon existence, qui mon soutenu jours et nuits durant tout mon parcours, a ce qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui, A vous mes très chère et adorable parents ***KAIDI Amro*** *et* ***MOUSAOUI Berkahom****.*

- A mes adorables sœurs : Aicha, Zahra, Zineb.

-A mes très chers frères : Yousef, Rabeh, Omar, Ismail Et à toute ma famille.

-A tous les enseignants qui ont contribué à ma formation

-A tous mes amis(es) : Houda, Sabrine, Chahinaz, Fatiha, Rabéa, Imen, Najet. Sans oublie mon chère Fiancé ***Yassine Ferhet*** *qui m'a donné de l'aide.*

Madina

Résumé

Le diabète est une maladie, considérée par l'OMS comme épidémie, et dont la prévalence a augmenté de façon importante au cours de ces dernières années. 537 millions de personnes atteintes de diabète dans le monde en 2021, et le nombre continu d'augmenté à travers le temps.

Le diabète de type 2 représente la majorité des cas de diabète, se développe silencieusement, et est responsable de l'apparition de nombreuses complications, tels que, les maladies cardiovasculaires, l'insuffisance rénale et la stéatose hépatique.

De plus ce tueur silencieux est associé à plusieurs facteurs de risque, comme, l'obésité, la sédentarité, le manque d'activité physique, et l'alimentation non équilibré et hypercalorique calories.

Plusieurs études suggèrent que le diabète s'accompagne d'un stress oxydant favorise le développement et l'aggravation de la maladie, et perturbe l'insulinosécrétion en promouvant l'insulino-résistance.

Cette étude est la suite d'une étude qui a été initié l'année précédente dont le but est d'optimiser un modèle animal de diabète de type II induit par un régime hyper lipidique chez les souris NMRI. L'objectif de notre l'étude est de mesurer les paramètres de stress oxydatif au niveau du foie, pancréas et tissues adipeux viscérale, et d'observé les lésions histologiques au niveau de ces organes.

Les résultats de stress oxydatif ont montré que l'exposition des souris à un régime hypercalorique et hyperlipidique engendre une augmentation de la concentration tissulaire des marqueurs de stress (MDA), et une diminution tissulaire significative, en enzymes antioxydants, SOD, GSH, catalase, GST, dans le foie, le pancréas, et le tissu adipeux.

L'approche histologique a révélé chez souris soumise à l'alimentation hyperlipidique d'importantes perturbations architecturales au niveau de foie, un dépôt ectopique de triglycérides au sein des hépatocytes et la présence d'une stéatose microvésiculaire. De plus, une hypertrophie spectaculaire à été observé au niveau du pancréas et une inflation de tissu adipeux caractérisé par augmentation de taille des adipocytes.

Les résultats obtenus nous a permi de conclure que le régime hyperlipidique provoque une stéatose hépatique, une inflation du tissu adipeux et un stress oxydatif.

Mots clés : Insulinorésistance, stress oxydatif, diabète de type 2, régime hyperlipique, les souris NMR

Abstract

Diabetes is a disease, considered by the WHO as an epidemic, and whose prevalence has increased significantly in recent years. 425 million people with diabetes in the world in 2017. In Algeria the percentage of diabetics reached 14.4% of the population in 2018. And the number continues to increase over time. Type 2 diabetes, represents the majority of diabetes cases, develops silently, and is responsible for the appearance of many complications, such as cardiovascular disease, kidney failure, and hepatic steatosis, In addition, this silent killer is associated with several risk factors, such as obesity, sedentary lifestyle, lack of physical activity, and unbalanced and high-calorie diet. Several studies suggest that diabetes is accompanied by oxidative stress promotes the development of the disease, and it disrupts insulin secretion by promoting insulin resistance. Our objective is to study the impact of oxidative stress during the development of insulin resistance induced by a high fat diet. This study is carried out at the research laboratory level at the University Of Yahia Fares Of Medea, and for 4 months insulin resistance was induced in NMRI mice by a hyperlipidic diet. The results obtained, allowed us to conclude that the hyperlipidic diet favors histological alteration, at the level of liver, pancreas, and adipose tissue. And it causes an increase in the tissue concentration of malondialdehyde, and a significant tissue decrease, in antioxidant enzymes, SOD, GSH, catalase, GST, in the liver, pancreas, and adipose tissue. This confirms that high-fat diets generate obesity, insulin resistance, oxidative stress and ultimately diabetes.

Keywords: Insulin resistance, oxidative stress, type 2 diabetes, high fat diet, NMRI.E mice

ملخص

تعتبر المنظمة العالمية للصحة داء السكري وباءا وذلك لانه ينتشر بوتيرة جد متسارعة بين افراد المجتمع في العالم بأسره. خلال سنة 2017 بلغ عدد المصابين بالسكري 425 مليون مصاب. أما في الجزائر نسبة مرضي السكري بلغت 14،4 بالمئة من العدد الاجمالي للسكان في سنة 2018.والرقم مرشح للارتفاع باستمرار بمرور الزمن. (90) تسعون بالمئة من حالات السكري هي من النوع الثاني والذي يدعى بالقاتل الصامت ويتسبب في حدوث مضاعفات كثيرة كامراض القلب والشرايين والقصور الكلوي وتشحم الكبد.

إن هذا الانتشار السريع لداء السكري مرتبط بعدة اسباب نذكر منها على سبيل المثال السمنة واسلوب العيش المتطور اضافة الى قلة المجهود العضلي والتغذية الغير سليمة والغير متوازنة.

لقد اثبتت العديد من الدراسات العلمية ان مرض السكري مرتبط باجهاد تاكسدي الذي يساهم في تطور المرض ويؤدي الى ظهور المضاعفات الرتبطة بهذا المرض ويكون ذلك بالتاثير على افراز مادة الا نسولين من خلال المساهمة في تعزيز مقاومة الأنسولين. من أجل دراسة العلاقة بين داء السكري والاجهاد التاكسدي قمنا باجراء دراسة تجريبية على مستوى مخبر التجارب العلمية بجامعة يحى فارس بالقطب الحضري بالمدية خلال فترة أربعة اشهر قمنا بإعطاء نظام غذائي غني بالدهون لفوج لفئران من صنف ان ام ار اي ، والفوج الثاني للفئران تم اعطائها غذائها الطبيعي واعتبرناها كشاهد وهذا من اجل معرفة تاثير النظام الغذائي غني بالدهون على ظهور الاجهاد التاكسدي اثناء تطور مقاومة الانسولين و تطور السكري من الصنف 2. من خلال النتائج المحصل عليها استطعنا اكتشاف ان النظام الغذائي الغني بالدهون يتسبب في حدوث تغيرات بنيوية في الانسجة التالية وهي الكبد والبنكرياس والنسيج الدهني اضافة الى ذلك لاحظنا ارتفاع في تركيز المالون دي الدهيد وانخفاض محسوس في كل من السوبر اكسيد ديسموتاز والغلوتاتيون غيدوكتاز والغلوتاتيون بيروكسيداز والكتلاز داخل الانسجة المشار اليها سابقا.

الكلمات المفتاحية: مقاومة الأنسولين، الإجهاد التأكسدي، السكري من النوع 2 ، النظام الغذائي عالي الدهون، الفئران NMRI

Liste des abréviations

- ***ADN :*** *L'acide désoxyribonucléique*
- **ARNm :** L'acide ribonucléique messager
- **AGEs :** Advanced Glycation End Products
- **Cat :** Catalase
- **DT1 :** *Diabète de Type 1*
- ***DT2 :*** *Diabète de Type 2*
- **DO :** Densité optique
- **EDTA :** Ethylène diamine tétra acétate
- **GSH :** glutathion
- **GST :** glutathion S-transférase
- **GSH-Px :** glutathion peroxydase
- **HE :** Hématoxyline éosine
- **HFD :** High fat diet
- **IL1 :** interleukine 1
- **IGF** : Insulin like Growth factor
- **IGg :** Immunoglobuline G
- ***LDL :*** Low density lipoprotein
- **MODY :** Maturity Onset Diabetes in the Young
- **MDA :** Dosage du malondialdéhyde
- **M.O :** microscopie optique
- **NFKB :** Necrosis Factor kappa B
- **NMRI :** Naval Médical Research Institute
- ***OMS :*** *Organisation Mondiale de la Santé*
- **PUFA :(** AGPI) Acide gras polyinsaturé
- ***ROS :*** *Reactiv Oxygen Species*
- ***RHL :*** Régime hyperlipidique
- **SDS :** dodécylsulfate de sodium
- **SNC *:*** système nerveux centrale
- ***TBA :*** Acide thiobarbiturique
- **TCA :** Acide trichloracétique
- ***TNF :*** *Temor Necrosis Factor*
- **VCL :** Veine Centro Lobulaire
- ***GLP-1 :*** glucagon -like peptide
- ***ATP :*** adénosine triphosphate
- ***IR :*** insuline receptor
- ***IGF-1 :*** insuline Growth factor
- ***PI3K :*** phosphatidylinositol-3-kinase
- ***AKT :*** proteine kinase B
- ***PP1 :*** glycogène synthase phosphatase

- **FIL :** fédération internationnale de diabète
- **GLP2 :** glucagon –like peptide 2
- **G6P :** glucose -6-phosphate
- **GLUT1 :** glucose transporter 1
- **GLUT2 :** glucose trasporter 2
- **GLUT4 : glucose** transporter 4
- **Ca+2 :** calcium
- **RI :** résistance à l'insuline
- **PKC :** protéine kinase C
- **RTK :** récepteur tyrosine kinase
- **Ras /ERK** : extracellular signal regulated kinase
- **Grb2 :** growth factor receptor bound protein 2
- **MTOR :** mammalian target of rapamycin
- **PIP3 :** phosphatidylinositol 3, 4,5 trisphosphate
- **PP :** Polypeptide pancréatique
- **ADP :** adénosine diphosphate
- **GSK3** : glycogen synthase kinase 3
- **HbA1c** : Hémoglobine glyquée
- **HDL** : High Density Lipoprotein
- **T.A** : tissue adieux
- **GSK** : glycogène synthase kinase
- **Shc** : SH2-containing collagène-related protein système nerveux central
- **AGL :** acide gras libres
- **AGE :** Advanced Glycation End-product, produits de glycation avancé
- **AGPI :** Acides Gras Poly-Insaturés
- **IMC** : Indice de Masse Corporelle
- **IRS :** Insulin Receptor Substrat
- **MAPK** : Mitogen-Activated Protéin Kinases
- **RAGE :** Receptor of advanced Glycation End Produ
- **RPE :** Résonance Paramagnétique Electronique
- **SOD :** SuperOxyde Dismutase
- **TBARS** : ThioBarbituric Acid Reactive Substance
- **FFA** : acide gras libre
- **HGP** : hépatique Glucose Production
- **IL6** : Interleukine 6
- **FOXO 1** : Forkhead box proteine 1
- **SOCS** : acronyme de supressor of cytokine signaling
- **DAG**
- **NASH :** Stéatose hépatique non alcoolique
- **NADH :** Nicotiamide adéniné dinucléolid

Liste des figures

Figure 01 : Prévalence du diabète ajustée en fonction de l'âge en 2017 par pays selon la fédération internationale de diabète **06**

Figure 02 : Relations du pancréas avec les organes environnants **07**

Figure 03 : Coupe histologique d'un lobule pancréatique avec des acini et des cellules Centro acineuses **08**

Figure 04 : coupe histologique du pancréas endocrine. Photographie issue du site Histologie spéciale humaine……..…… **09**

Figure05 *:* structure biochimique d'une molécule d'insuline humaine..... **10**

Figure 06 *:* les étapes de la biosynthèse d'insuline et structure finale **11**

Figure 07 : stimulation de la sécrétion d'insuline par glucose..... **12**

Figure 08 *:* stimulation de la sécrétion d'insuline par GPL-1 ..... **13**

Figure 09 *:* structure de récepteur d'insuline..... **14**

Figure 10 : Voie de signalisation et rôle métabolique de l'insuline..... ***15***

Figure 11 *:* action de l'insuline sur foie **16**

Figure 12 *:* Schematic representation of the effect of insulin on muscle glucose disposal..... **17**

Figure 13 *:* action d'insuline sur les adipocytes..... **18**

Figure 14 : Structure de glucagon..... **19**

Figure 15 : Voies de signalisations des hormones pancréatiques..... **20**

Figure 16 : Impact des facteurs de risque génétiques et environnementaux sur l'inflammation, l'auto-immunité et le stress métabolique **23**

Figure 17 : Conséquences fonctionnelles du muscle squelettique résistance à l'insuline **25**

Figure 18 *:* Mécanismes moléculaires de la résistance à l'insuline hépatique induite par les lipides... **26**

Figure 19 : Signaling pathways involved in insulin secretion in β-cells in physiological condition (A) and mechanisms leading to dysfunction (B**)**..... **28**

Figure 20: Extrinsic factors contributing to insulin resistance..... **29**

Figure 21 : Physiopathologie de stéatose hépatique métabolique..... **32**

Figure 22 : REACTION DE FENTON ET REACTION DE HABER-WEISS..... **37**

Figure 23 : REACTION DE FENTON ET REACTION DE HABER-WEISS..... **37.**

Figure 24 : La défense enzymatique **39**
Figure 25 : Diabète et stress oxydant ..... **42.**
Figure 26: Souris NMRI utilisé dans l'expérience..... **48**
Figure 27 : Le matériel utilisé dans le sacrifice et l'animal sacrifie ..... **49.**
Figure 28: L'évolution pondérale des souris pendant 16 semaines **62**
Figure 29: Variation de la glycémie chez le groupe témoin et le groupe RHL. Comparaison avec groupe témoin..... **63**
Figure 30: Evaluation de la teneur pancréatique en MDA (A) et variation de l'activité enzymatique de quelques enzymes antioxydants GSH(B), GST(C) et SOD (D) chez le groupe control et le groupe RHL..... **64**
Figure 31 : Evaluation de la teneur hépatique en MDA (A) et variation de l'activité enzymatique de quelques enzymes antioxydants GSH(B), GPx, SOD, GST et Cat chez le groupe control et le groupe RHL..... **65**
Figure 32 : Evaluation de la teneur de tissu adipeux en MDA (A) et variation de l'activité enzymatique de quelques enzymes antioxydants GSH (B), SOD, GST et Cat chez le groupe control et le groupe RHL..... **66**
Figure 33 : Coupe histologique de pancréas chez le groupe control et HFD **68**
Figure 34 : coupes histologiques du foie chez les contrôles et le groupe HFD..... **69**
Figure 35 : coupes histologiques du tissu adipeux chez les contrôles et le groupe HFD..... **71**

Liste des tableaux

Tableau 01 : la constitution des lots des souris

Tableau 02 : Les composants utilisés pour la mesure de CAT

Tableau 03 : Les composants utilisés pour la mesure de GSH-ST

Tableau 04 : Les composants utilisés pour la mesure de GPx

Tableau 05 : Les composants utilisés pour la mesure de SOD

Sommaire

LISTE DES FIGURES LISTE DES TABLEAUX
LISTES DES ABREVIATIONS RESUME
INTRODUCTION
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 01 : Généralité sur le diabète

1.1 Définition du diabète……....04
1.2 Epidémiologie de diabète…….....05
1.2.1 Le fardeau mondial……..……...…….05
1.2.2 En Algérie…….……..……...……...…….06
1.3 Organisation anatomique et histologique de pancréas……...……..……..06
1.3.1 Anatomie macroscopique de la glande pancréatique…….……..……...06
1.3.2 Histologie de la glande pancréatique……...07
1.3.3 Les hormones pancréatiques ……...00
1.3.3.1 L'insuline ……. 00
1.3.3.1.1 Structure de l'insuline……..……...10
1.3.3.1.2 La biosynthèse de l'insuline……..……..10
1.3.3.1.3 Sécrétion de l'insuline……..……..…..11
1.3.3.1.4 Action moléculaire et voies de signalisation……..……...….13
1.3.3.1.5 Action de l'insuline sur tissus cibles……..……..……..15
1.3.3.1.5.1 Action de l'insuline sur le foie……..…….……..15
1.3.3.1.5.2 Action de l'insuline sur les muscles…….…….……..16
1.3.3.1.5.3 Action de l'insuline sur tissu adipeux…….……...……..17
1.3.3.2 Glucagon ……..….00
1.3.3.2.1 structure de glucagon……...…….……..18
1.3.3.2.2 Action de glucagonsur les tissus cibles……19.
1.3.3.2.3 Interrelation insuline –glucagon……..……..20
1.4 Diabète de type (2) ……..… 00
1.4.1 Définition……..……...…….21
1.4.2 Facteurs de risques l'étiologie……...…….……..21
1.4.3 Physiopathologie de diabète type (2) ……...……..……..23
1.4.3.1 La résistance à l'insuline…….……..23
1.4.3.1.1 Mécanisme de l'insulinorésistance…….....…….....……..24

1.4.3.1.1.1 Dans les muscles…….……..…….…..24
1.4.3.1.1.2 Dans le foie et tisssu adipeux……..26
1.4.3.2 Le dysfonctionnement des cellules Beta……..……..27
1.4.5 L'obésité, inflammation et l'insulinorésistance…….……..28
1.4.6 Les pathologies associées au diabète de type II ……....00
1.4.6.1 Les maladies hépatique non alccoliques…….…..29
1.4.6.1.1 La stéatose hépatique……..30
1.4.6.1.1.1 Définition ……..…..30
1.4.6.1.1.2 physiopatologie se stéatose hépatique……...……..30
1.4.6.1.1.2.1 Apparition de stéatose…….……..31
1.4.6.1.1.2.2Apparition de NASH……..31
1.4.6.1.1.2.3 Apparition de fibrose……...……..32
1.4.7 Modèles expérimentaux de diabète…….……33
1.4.7.1 Diabète induit par un régime hyperlipidique…….……34

Chapitre 02 : Le stress oxydative, diabète et hyperglycémie chronique

2.1 Définition de stress oxydatif……..36
2.2 Les radicaux libres……..36
2.3 la défense anttioxydante……..36
2.3.1 La défense enzymatique……..38
2.3.1.1 Syperoxyde dismutase ……..38
2.3.1.2 Glutathion……..38
2.3.1.3 Glutathion peroxydase…….……38.
2.3.1.4 Catalase……..……..……..39
2.3.2 Les Vitamines……..……..40
2.3.3 Les caroténoides……..……..40
2.3.4 Les Oligiéléménts……..00
2.4 Conséquence de l'hyperproduction des radicaux libres……...……..40
2.5 Stress oxydant et Diabète…….……....41
2.5.1 Hyperglycémie et Diabète……..…….…..42
2.5.2 Diabète 02 et hyperproduction des radicaux libres …….…...……...……..43
2.6 Hyperglycémie chronique et AGE ……..44
2.7 Effets des AGE sur la matrice extracellulaire, les protéines circulants et cellulaires…....45

Chapitre 03 : Matériel et méthodes

Etude éxpérimental ……...00
Objectif de l'étude ……00

1.Matériels……..…..……...47
1.1 Les produits chimiques……..……..47
1.2 Matériels biologiques……...……..……..47
2 Constitution des lots……...….....……..……..48
3 Conditions de l'élevage……...……..……..49
4 Sacrifices et prélèvémént des organes……..……..49
5 Traitementdes organes……..……..50
5.1 Technique histologique……..……..50
5.1.1 Préparation des tissus pour coupe en paraffine……..50
5.2 Evaluation des marqueurs du stress oxydatif au niveau tissulaire ……..……52
5.2.1 Préparation d'Homogénat……...52
5.2.2 Dosage des protéines tissulaire……...……..53
5.2.3 Dosage de MDA……..….54
5.2.4 Dosage de CAT……..55
5.2.5 Dosage de GSH……...……..56
5.2.6 Dosage de GSH-ST…….…….57
5.2.7 Dosage de GSH-Px…….…….58
5.2.8 Dosage de SOD……..59
5.2.9 Etude statistique…….……...60

Chapitre 04 : Résultats et discussions

1 Induction de Diabète …….....00
1.1 Evaluation du poids corporel…….……..62
1.2 Evaluation de glycémie…….…….….62
2.Analyse des paramètres de stress oxydant……...…….……..63
2.1 Au niveau le pancréas……..64
2.2 Au niveau le foie……...65
2.3 Au niveau le tissu adipeux……...……..……..66
3 Etude Histologique …….....00
3.1 Aspect histologique du pancréas des souris témoins et cell soumises au RHL ……..…….67
3.2 Aspect histologique du foie des souris témoins et cell soumises au RHL ……...….69
3.3 Aspect histologique du tissu adipeux des souris témoins et cell soumises au RHL ……....70
4 Disccusion ……..72
4.1 Effet de RHL sur la glycémie et poids ……..……..72

4.2 Efeet de RHL sur le stress oxydant……..……..……..73
4.3 Efeet de RHL sur les altérations hépatiques…….……....74
4.4 Efeet de RHL sur les altérations pancréatiques……...……..75
4.5 Efeet de RHL sur les altérations de tissu adipeux……...……..76
Conclusion et prespecives……...……..78
Références……...……..80
Annexes……...……..91

Introduction

Introduction :

Les modifications progressives du mode de vie favorisant l'augmentation de la prévalence de l'obésité dans les pays développés ou en voie de développement. La sédentarité et les excès caloriques, notamment la consommation d'aliments riches en glucides et en graisses, se traduisent par une progression épidémique de l'obésité et du diabète de type 2. DT2 touche majoritairement les adultes de plus de quarante ans qui présentent une surcharge pondérale. Selon la Fédération Internationale du Diabète **(FID**), si le taux de croissance actuel se poursuit, le nombre total de diabétiques dépassera les 783 millions d'ici 2045, soit une augmentation de 54% .Cette pathologie provoque chez la personne atteinte des complications macro vasculaire (maladies coronarienne, maladies vasculaires périphériques et accidents vasculaires cérébral) et micro vasculaire (neuropathie, rétinopathie et néphropathie) , et parmi les complications émergentes de cette pathologie , figurant la stéatose hépatique **(Schliger , 2013)** .

De nombreuses études suggèrent que le diabète s'accompagne d'un stress oxydant favorisant le développement de la maladie. et perturbe l'insulino-sécrétion, en promouvant l'insulino- résistance.

Ce stress oxydant est due à un déséquilibre physiologique qui existe dans l'organisme entre les molécules oxydantes et les systèmes de défenses antioxydants (**Bonnefont-Rousslot et al 2000)** endogènes et/ou exogènes.

La consommation d'un régime alimentaire riche en graisse (RHL) induit l'obésité et développe l'insulinorésistance, et a long terme ce régime inhibe l'insulinosécrétion en réponse au glucose,l'obésité est alors un facteur de risque majeur de diabète **(Max C.Petersen et al 2018)** . L'objectif de cette thèse s'inscrit dans ce contexte est consiste à étudier l'implication du régime hyperlipidique dans la genèse d'un stress oxydatif au niveau des organes insulino dépendants.

Pour répondre à notre problématique, nous avons réalisé une étude expérimentale qui se déroule en deux étapes sur un modèle animal de souris NMRI, un groupe control, soumis à un régime standard, et un groupe RHL soumis à un régime hyperlipidique pendant 16 semaines. La première étape du travail expérimental a donc consisté à développer un modèle animal d'obésité induite par régime alimentaire. La seconde étape consiste à mesurer les paramètres de stress oxydant au niveau des tissus adipeux, hépatique, et pancréatique, ainsi, qu'une étude histologique des tissus précédement citer.

Chapitre 01 :
Généralité sur le diabète

Chapitre 01 : Généralité sur le diabète

1.1 Définition du diabète

L'Organisation mondiale de la santé ***(OMS)*** a défini le terme « diabète sucré » comme : « un trouble métabolique d'étiologie multiple caractérisé par une hyperglycémie chronique avec des perturbations du métabolisme des glucides, des graisses et des protéines résultant de défauts dans la sécrétion d'insuline, l'action de l'insuline, ou les deux ». Le diagnostic de diabète est basé sur un sang à jeun concentration de glucose supérieure à 7 0 mmol/L (126 mg/dL) . ***(Linda A DiMeglio et al .,2018)*** Il existe plusieurs types de diabète :

- **Le diabète de type 1 (autrefois appelé diabète insulino-dépendant ou juvénile)** : Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie chronique grave causée par une production insuffisante d'insuline par le pancréas résultant en la défaillance de la régulation de la glycémie à l'échelle de l'organisme **(OMS, 2022).** Le DT1 appartient à la famille des diabètes sucrés caractérisés par une hyperglycémie chronique, et qui sont aujourd'hui considérés comme un enjeu de santé publique majeur dans le monde en raison de leur incidence croissante et des complications graves qu'ils engendrent chez les patients **(OMS ,2022)**
- **Le diabète de type 2, précédemment appelé « diabète non insulino-dépendant » :** Représente 90 à 95% des patients diabétiques, caractérisé par une résistance à l'action de l'insuline au niveau des organes cibles et/ou à une carence relative en insuline causée par un dysfonctionnement des cellules β pancréatiques **(Care &Suppl, 2021).**
- **Le diabète gestationnel** : est définit comme un trouble de la tolérance glucidique conduisant à une hyperglycémie de sévérité variable, débutant ou diagnostiqué pour la première fois pendant la grossesse, quels que soient le traitement nécessaire et l'évolution dans le postpartum **(Édouard .F, 2019).**
- **Autres diabètes :**

Les autres formes sont plus rares. On distingue par exemple :

- les MODY (Maturity Onset Diabetes in the Young), en général non insulino-dépendants. Sont fortement déterminés par une composante génétique.
- les diabètes secondaires à d'autres maladies telles que des maladies pancréatiques, endocriniennes ou hépatiques. L'hémochromatose ou certaines mutations de l'ADN mitochondrial.
- le diabète lipoatrophique (disparition du tissu adipeux, hyperlipidémie, stéatose hépatique, insulino-résistance majeure).
- le diabète induit par des traitements médicamenteux (ex: corticoïdes, diurétiques, neuroleptiques, certains immunosuppresseurs...). **(Heike Labud et al., 2017).**

1 .2 Epidémiologie de diabète :

1 .2.1 Fardeau Mondial :

La prévalence mondiale du diabète chez les adultes a augmenté au cours des dernières décennies. En 1964, on estimait que 30 millions de personnes souffraient de diabète **(K.Ogurtsova a et al.,*2017)**. La Fédération internationale du diabète (FIL) a estimé la prévalence mondiale à 151 millions en 2000, 194 millions en 2003, 246 millions en 2006, 285 millions en 2009, 366 millions

en 2011 et 382 millions en 2013 **(FID 2019).**

les dernières estimations montrent une prévalence mondiale de 537 millions d'adultes atteints de diabète en 2021, ce chiffre devrait continuer de croître pour atteindre 783 millions en 2045 (Forouhi&Wareham, 2022) Ce par l'augmentation mondiale de la prévalence de l'obésité et des comportements non healthy, y compris les mauvaises habitudes alimentaires et l'inactivité physique; ceux-ci sont à leur tour favorisés les changements dans la nutrition un contexte mondial (la « transition nutritionnelle »). **(Nita G et al ,. 2018).**

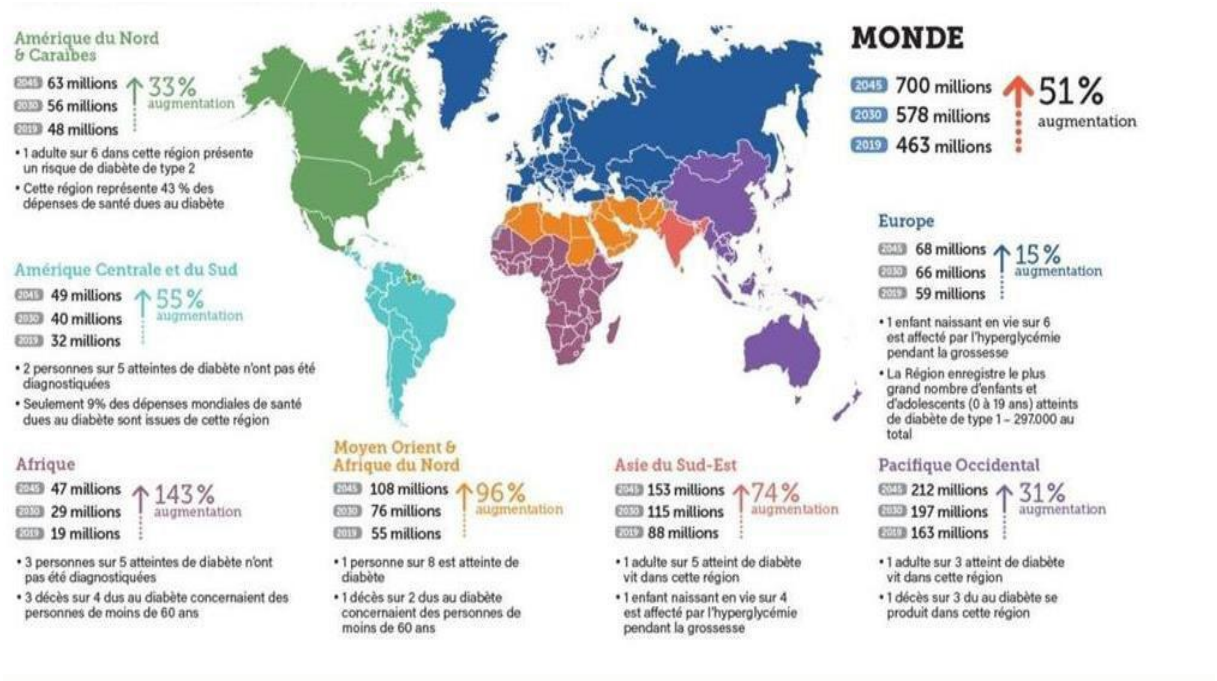


Figure 01: Prévalence du diabète ajustée en fonction de l'âge en 2019 par pays **(FID 2019).**

1 .2.2 En Algérie :

En Algérie, on observe une augmentation continue de la prévalence du diabète, atteignant 14,4% de la population âgée de 18 à 69 ans, soit environ 4 millions de personnes atteintes en 2018 **(Belhadj et al., 2019**). Les personnes âgées de 60 ans et plus représentent 7,7% de la population totale, soit 2785 000 personnes, et ce chiffre devrait atteindre 4,3 millions en 2020, 6,7 millions en 2030 **(Chami, 2015).**

Une étude menée à Oran, en Algérie, a enregistré 1 877 cas de diabète de type 1 (DT1) chez des enfants de moins de 15 ans. Cette étude a révélé une augmentation continue de l'incidence, atteignant 24,5 ± 3,8 pour 100 000 enfants de moins de 15 ans par an au cours des cinq dernières années. Cette augmentation concerne principalement les groupes d'âge de 0 à 4 ans et de 5 à 9 ans, dont l'incidence dépasse celle des 10 à 14 ans. (**Niar et al., 2015).**

1.3 Organisation anatomique et histologique de pancréas :

1.3.1 Anatomie macroscopique de la glande pancréatique :

Le pancréas est un organe allongé en communication directe avec le tube digestif. Sa fonction exocrine est indispensable pour la digestion de tous les aliments et sa fonction endocrine est à l'origine de la synthèse des principales hormones qui contrôlent la glycémie de l'organisme. Le pancréas est un organe aplati et allongé situé au niveau de la face postérieure de l'estomac dont la tête est insérée dans le cadre duodénal. Sa partie allongée comprend anatomiquement, de la droite vers la gauche, la tête, le col, le corps et la queue. Il pèseentre 60 et 80 g et mesure 12 à 15 cm de long et 2 à 4 cm de large. (**Flavien B et al ., 2021)**

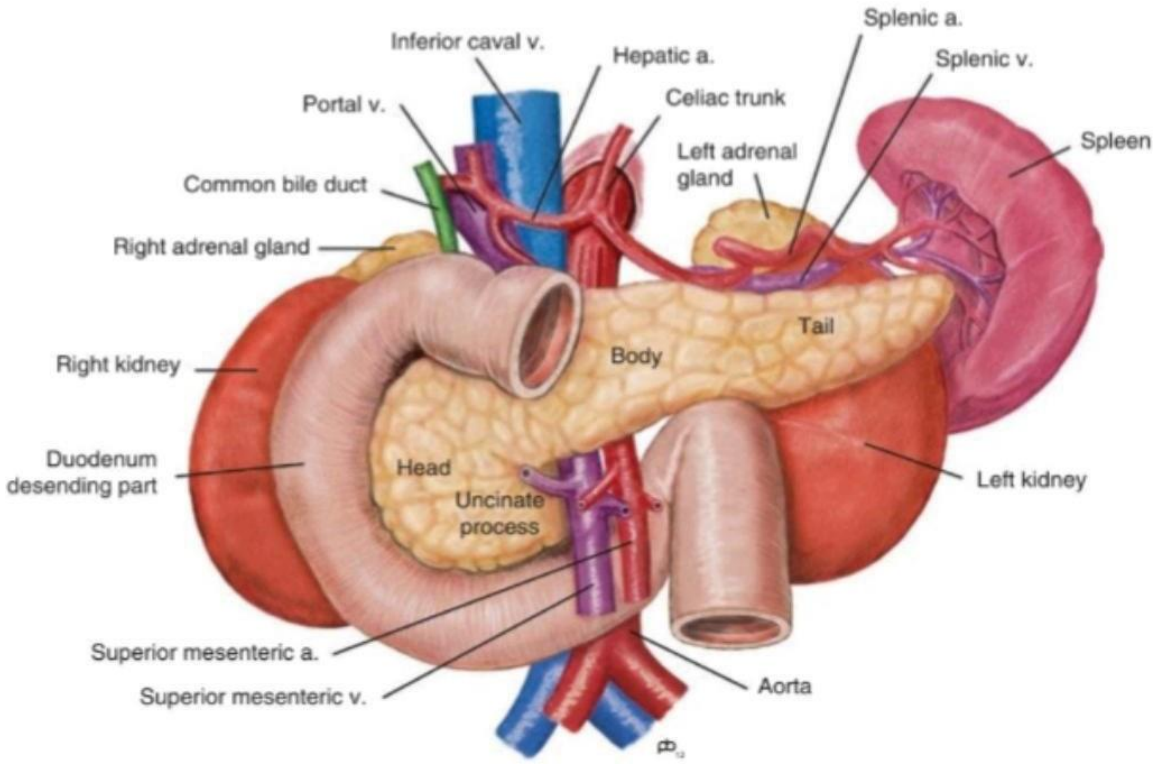


Figure 02 : Relations du pancréas avec les organes environnants **(Daniel S.et al., 2018)**

1.3.2 Histologie de la glande pancréatique :

Le parenchyme pancréatique est organisé en lobules séparés par des septa fibreux. Ces lobules contiennent essentiellement des acini et des canaux excréteurs. Les îlots de Langerhans sont dispersés dans les lobules pancréatiques :

1.3.2.1. Pancréas exocrine

Les cellules acineuses, formant les acini, sont des cellules épithéliales polarisées. Leur partie basale contient le noyau et un riche réticulum endoplasmique rugueux. La partie apicale est chargée de grains de zymogènes qui contiennent les précurseurs enzymatiques. Au sein de l'acinus pancréatique, on trouve des cellules souches multipotentes appelées les cellules centro-acineuses qui peuvent se différencier en cellules acineuses, cellules canalaires et même en cellules endocrines. Les sécrétions enzymatiques sont drainées par des canaux excréteurs (canaux intralobulaires puis interlobulaires et enfin canaux collecteurs). Les canaux sont bordés par des cellules épithéliales cubiques ou cylindriques. **(Mehdi EL AMRANI .2019)**

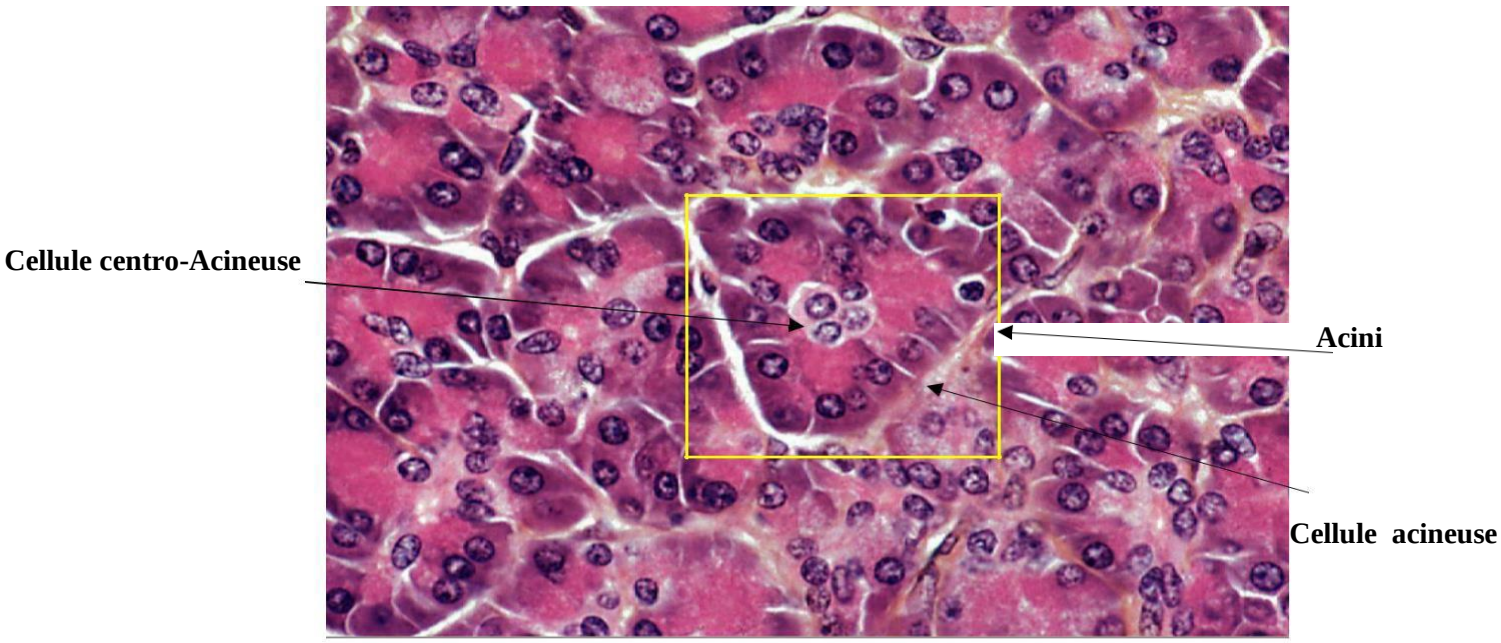


Figure 3 : Coupe histologique d'un lobule pancréatique avec des acini et des cellules Centro acineuses. **(Beaugerie et al., 2014)**

1.3.1.1. Pancréas endocrine

Les îlots de Langerhans s'organisent sous forme de travées dispersées dans le parenchyme et richement vascularisées. Les îlots de Langerhans sont formés d'une mosaïque de cellules endocrines, parmi elles on peut distinguer : les cellule β qui sécrètent l'insuline, les cellules α productrices de glucagon, les cellules δ à somatostatine et d'autres lignées cellulaires plus rares (cellules PP …) **(Mehdi EL AMRANI .2019)**

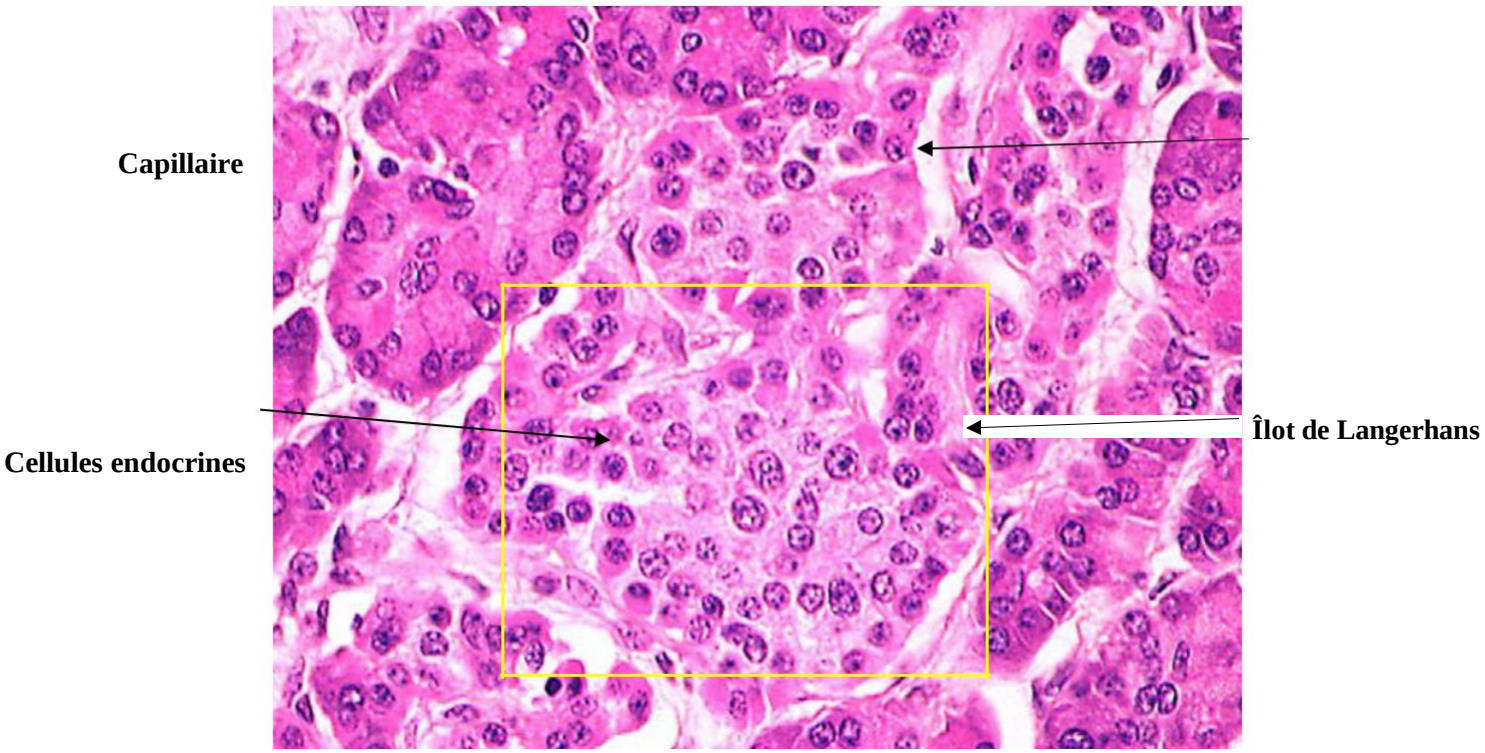


Figure 4 : coupe histologique du pancréas endocrine. **(Beaugerie et al., 2014)**

1.3.3 Les hormones pancréatiques :

1.3.3.1 L'insuline

1.3.3.1.1 Structure d'insuline

L'insuline c'est la première séquence protéique qui a été déterminée complètement. Son poids envoisinant 5 800 Kd, elle est produite par la cellule bêta des îlots de Langherhans du pancréas. L'insuline humain active c'est un peptide formé de deux chaines d'acides aminés : la chaine A composée de 21 acides aminés, chaine B comporte 30 acides aminés, ces chaines liées entre eux par deux ponts disulfures **(A. Bouglé et al., 2009).**



Figure 05 : structure biochimique d'une molécule d'insuline humain. ***(Delphine, 2021)***

1.3.3.1.2 La biosynthèse d'insuline

Le gène d'insuline s'exprime sur le chromosome 11 dans les noyaux des cellules bêta des ilots pancréatique , il est traduit en ARNm et exporté vers le cytoplasme et transféré vers les ribosome situées à la surfaces des saccules formants le réseaux complexe de réticulum endoplasmique pour synthétiser les acides aminés nécessaire à la construction de la molécules pré-pro insuline. Le segment pré est responsable à la migration de la chaine protéique vers la réticulum endoplasmique rugueux en cours d'assemblage, il est coupé par des enzymes, alors la pré-pro insuline transformé en pro insuline qui constitué d'une chaine d'acide aminés qui donneront l'insuline et un segment s'appelle peptide de connexion (peptide C) qui relié la fin de chaine A avec le début de chaine B, à la présence de Zinc les molécules de la pro insuline s'associées en hexamères.la pro insuline transférés vers les citernes cis de l'appareil de Golgi dans des petites vésicules accompagnés avec les enzymes de coupure (conversion) qui ont une activité trypsinique et carboxypeptidasique pour couper le peptide C .L'insuline mature est alors formée et n'est libéré de la cellules bêta que lorsque celle-ci stimulée par un signale approprié, en l'occurrence une augmentation de la concentration en glucose sanguin ***.(cour d'hormones peptidiques d'insuline).***

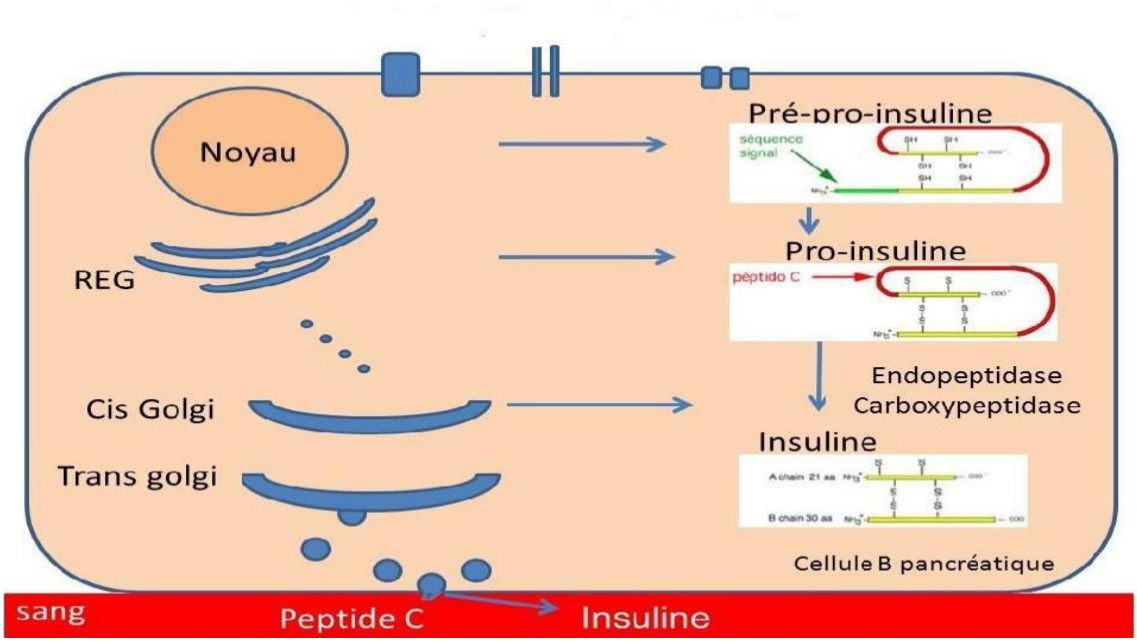


Figure 06 : les étapes de la biosynthèse d'insuline et structure finale**, (C.Magan et al , .2005)**

1.3.3.1.3 Actions moléculaire et voie de signalisation :

A) Récepteur à l'insuline (IR) :

IR est un protéine hétérotétramérique composé de deux sous-unités : alpha extra membranaire et bêta transmembranaire (le domaine tyrosine kinase) liés par des ponts disulfures. Produit par les cellules cibles de l'insuline (hépatocytes, adipocytes, les cellules des muscles striées et cellules bêta pancréatique) .il existe deux iso forme d'IR chez les mammifères :IR-A (la forme fœtal) présent dans les lymphocytes humains en culture et a une affinité très élevée pour les IGF il pourrait jouer un rôle dans tumorigenèse, et IR-B présent dans les tissus cibles de l'insuline où l'affinité à peu près équivalentes à l'insuline. **.(De Meyts et al .,.2022)**

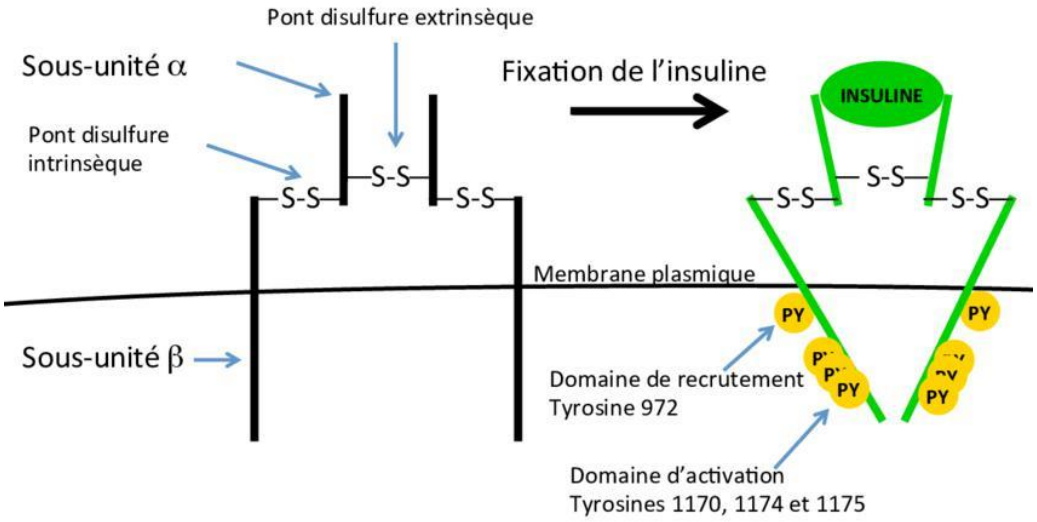


Figure 09 : structure de recepteur d'insuline . *(Daniel Mauvoisin, 2011)*

B) la voie de signalisations liée à l'insuline receptor substrats (IRS)

La liaison de l'insuline avec la sous unité alpha induit le premier changement morphologique du récepteur, déclenchant l'activité tyrosine- kinase intrinsèque de sous unité et l'activation d'une grande cascade de signalisation intracellulaire :

L'insuline se liée à son récepteur qui active les IRS et ensuit activeront la PI3K (c'est une protéine clef dans le métabolisme d'insuline), cette kinase génère des phospholipides membranaires spécifique (PIP1, PIP2) responsable au recrutement de AKT à la membrane plasmique des cellules, il sera activé par phosphorylation sur deux sites critiques : la thréonine308 (T308) dans sa boucle d'activation par PDK1, et la sérine 473(S473), dans son motif hydrophobe par le mTORC2. AKT joue un rôle important le métabolisme tissulaire. Cette cascade de signalisation conduit à la translocation des GLUT4 dans la membrane ce qui augmente la captation de glucose par la cellule .**(TanChen et al ,.2020)**.

Il y a un système de rétrocontrôle intra cytoplasmique telle que les protéines tyrosine phosphatases (PTP1B, SHIP2 et PTEN) qui catalysent la déphosphorylation des récepteur d'insuline et conduisent à l'atténuation de l'action d'insuline. **(A. Bouglé et al ., 2009).**

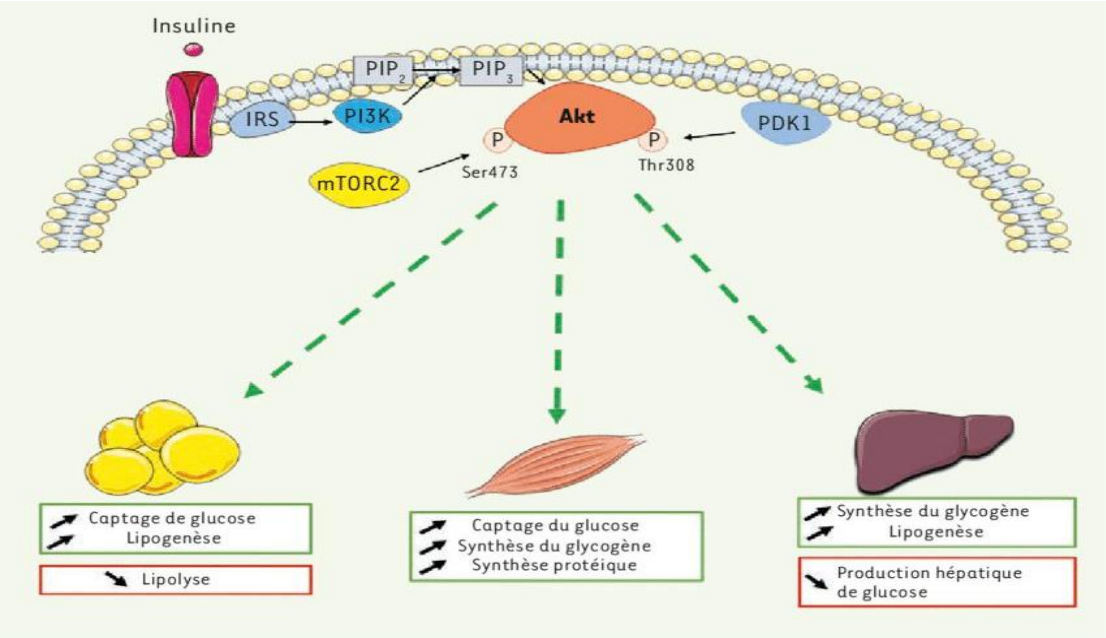


Figure 10 : Voie de signalisation et rôle métabolique de l'insuline**. (Tan-Chen et al .,2020)**

1.3.3.1.4 Action de l'insuline sur les tissues cibles

1.3.3.1.4.1 Action sur le foie :

L'insuline favorise l'absorption hépatique du glucose et son stockage sous forme de glycogène via l'activation de PP1 qui active et déphosphoryle le glycogène synthase **(Norton et al .,2022)**

L'insuline inhibe la production hépatique de glucose, elle exerce un effet direct par l'intermédiaire de ces récepteurs hépatique en diminuant la glycogénolyse en améliorant l'absorption du glucose dans le tissu musculaire et adipeux. **(A. Bouglé et al .,2009).**

Le glucose est pénètre par le transporteur de glucose GLUT2 dans le foie, tandis que le GLUT4, sensible à l'insuline, assure l'absorption du glucose dans les muscles et les graisses. La signalisation canonique majeure de l'insuline nécessaire à ce maintien des concentrations de glucose dans le sang active une protéine kinase clé Akt qui est nécessaire à la régulation des voies qui contrôlent l'homéostasie systémique du glucose, y compris le transport du glucose dans les adipocytes et les muscles, inhibition de la gluconéogenèse hépatique et de l'activation cellulaire autonome de lipogenèse hépatique. La liaison de l'insuline à sa protéine réceptrice active l'activité tyrosine- kinase, qui phosphoryle les IRS sur les résidus tyrosine, cela conduit à la phosphorylation d'AKT sur la thréonine 308, ce qui conduit à l'inhibition de glycogénèse hépatique. **(Czech et al ,.2017)**

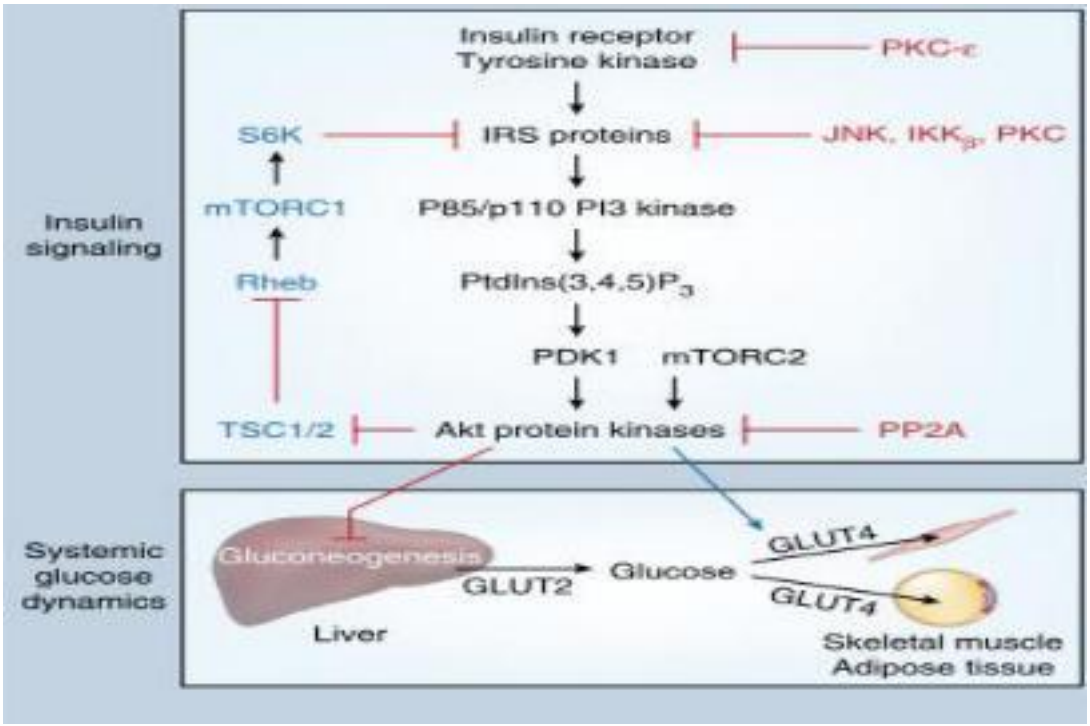


Figure 11 : action de l'insuline sur foie **(Czech, MichaelP.2017)**

1.3.3.1.4.2 Action sur les muscles squelettiques :

L'insuline exerce des effets anaboliques sur les muscles squelettiques tels que la synthèse des Protéine, l'élimination, le captage et le transport de glucose dans les muscles squelettiques ***(*Girard, J.2008)**

L'absorption de glucose augment e 10 fois en réponse à la stimulation de l'insuline, ce qui rende ce tissu est le principal contributeur à l'élimination totale du glucose corporel dans des conditions euglycémiques hyper insulinémiques. Suivant un repas, 60 à 70 % des glucides ingérés sont éliminés par le muscle, mettant en évidence le rôle primordial des Absorption musculaire du glucose dans le contrôle glycémique postprandial. Une fraction substantielle de cette élimination de glucose, environ 15 à 20 %, peut être attribué aux actions vasodilatatrices de l'insuline pour augmenter la masse musculaire perfusion. L'insuline augmente le transport du glucose dans les myocytes via le recrutement de transporteur de (GLUT4) à la membrane plasmique. L'oxydation de glucose par la Muscle squelettique est principalement déterminée par le taux de génération mitochondriales d'acétyl-CoA à partir du pyruvate, une étape régulée par l'Activation de la pyruvate déshydrogénase. **(Norton et al.,2022)**

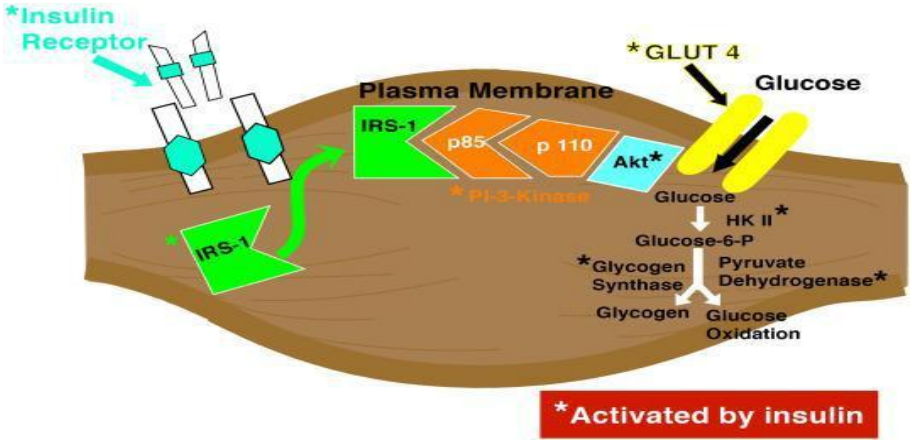


figure 12 : Schematic representation of the effect of insulin on muscle glucose disposal. **(Norton et al ..2022)**

1.3.3.1.4.3 Action sur le tissu adipeux :

L'action principale de l'insuline dans les adipocytes est la stimulation de l'adipogenèse, en favorisant la synthèse des TG, la suppression de la lipolyse et l'absorption de le glucose. Le TA est le principal site de stockage des acides gras (FA) qui sont libérés dans la circulation lors de la lipolyse (c'est-à-dire l'hydrolyse de TG en tant qu'acides gras non estérifiés (NEFA)

Le glucose est transporté dans les adipocytes par GLUT1 et GLUT4 , ce glucose est utilisé pour la synthèse glycérol-3-phosphate, car les adipocytes ne contiennent pas l'enzyme glycérol kinase, nécessaire à la synthèse de TG.

L'insuline agit par l'intermédiaire de son récepteur en activant PI3K dont les IRS-1 et IRS-2 sont les principales protéines d'amarrage. Aussi l'insuline a une action sur les lipases qui sont responsables de l'hydrolyse des TG. L'activation de PKB par l'insuline stimule la cible mammifère de la rapamycine (mTORC1) entraînant une inhibition de la triglycéride lipase du tissu adipeux (ATGL), la première étape de l'hydrolyse des TG qui aboutit à la formation de diacylglycérol et la libération d'un FA. **(Norton et al.,.2022)**

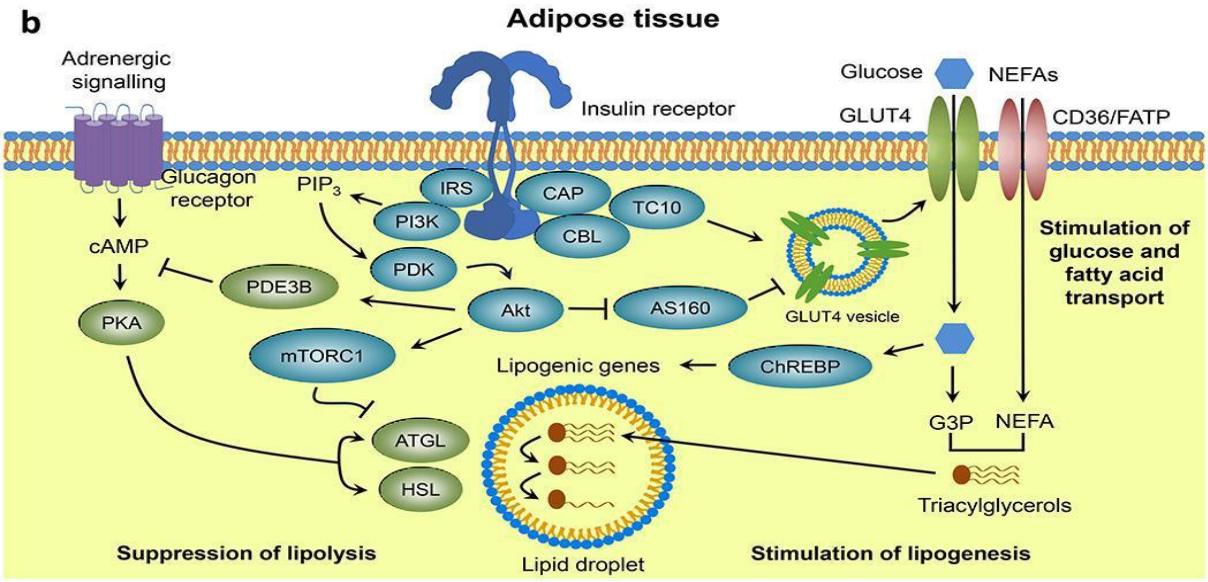


Figure *13 :* action d'insuline sur les adipocytes ***(*Thiago M et al.,.2021)**

1.3.3.2 Le Glucagon :

Le glucagon est une hormone peptidique synthetisee par les cellules α du pancreas; il constitue le principal stimulus pour la production de glucose par le foie.Sa sécretion est sous le controle de nombreux facteurs nutritionnels, neuronaux etparacrine. Le glucagon agit sur le foie en stimulant la glycogenolyse et, de facon plus limitee, la néoglucogènese **(Young A. 2005).**

1.3.3.2.1. Structure de glucagon.

Le glucagon est un polypeptide de 29 acides aminés organisés sous forme d'une chaine monocaténaire, son poids moléculaire est de 3485 Da, sans cystéine, donc sans ponts disulfures (**Horn F et al 2005**) ,sa structure secondaire étant formeé d'une seule hélice et ne possède pas une structure tertiaire.

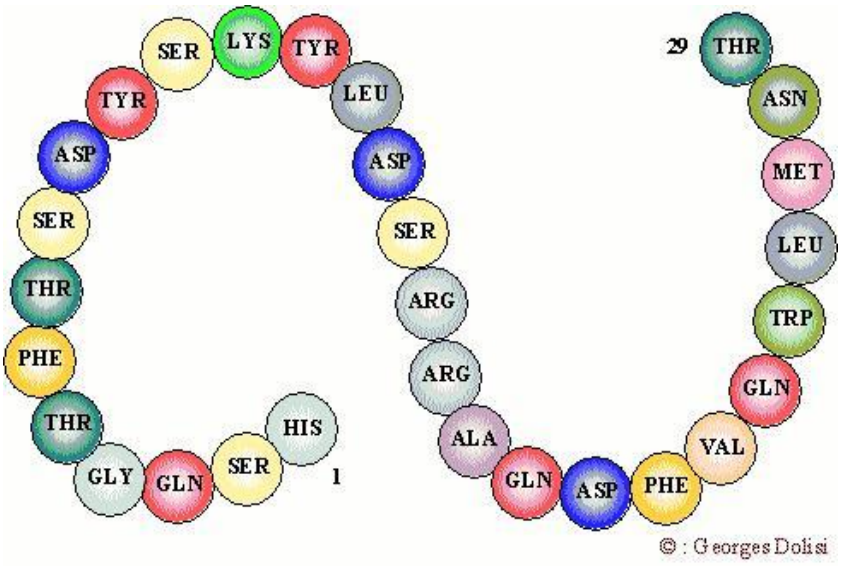


Figure 14 : Structure de glucagon. **(Dictionnaire médical).**

1.3.3.2.2 Action de glucagon sur les tissus cibles :

Le glucagon est une hormone catabolique, sa demie vie varie entre 5a10 min, elle est presque 7min chez l'homme ,a l'état basale, la concentration de glucagon dans le sang est assez faible ce taux est élevé dans les conditions d'hypoglycémie l'opposé de l'insuline le glucagon possède la meme structure pour tous les mammifères ;il permet de maintenir la normo glycémie dans les conditions physiologiques comme le jeune ou l'exercice physique . Les cibles cellulaires qui portent les récepteures de glucagon sont principalement, Les hépatocytes, mais aussi les adipocytes, les cellules béta des ilots de Langerhans, le coeur,les muscles lisses intestinales et les reins **(G .Kraft et al 2011)**,contrairement à l'insuline les muscles squelettiques striés ne possèdent pas des récepteurs de glucagon.

Le récepteur de glucagon est une protéine transmembranaire de 485acides aminés coupleé à la protéine G,sa similitude en 42% avec le récepteur de GLP1 permet au glucagon de se fixé sur le récepteur ce dernier et sur son récepteure .

La fixation de glucagon sur son récépteure déclanche une cascade de signalisation au sein de la cellule, en premier lieu le récépteure change sa conformation ce qui favorise l'activation de la protéine G via le changement de l'ADP par un ATP **(Uson CG 2002) ,** deux types de protéines G , à savoire Gs Gq sont associes au récépteure de glucagon . Gs active l'adénylate cyclase, qui libère le second méssager l'AMPc, ce dernier active le PKA qui active à son tour la phosphorylase kinase, augmentant ainsi la glycogène phosphorylase **(Calebrio MC , et al .2009).**et par conséquant la libération de glucose à partir de glycogène. AMPc phosphoryle 13 enzymes lieés au metabolisme,

parmi celles ci, les protéines kinases qui augmntent la teneur du récepteue de l'insuline en serine/ thrionine kinase, favorisant ainsi une inhibition de l'activité tyrosine kinase de récepteure de

l 'insuline et entrèine un insulinoresistance transitoire.

La Gq active la phospholipaseC(PLC) qui active IP3 . IP3 stimule la libération de calcium de réticulum endoplasmique(RE) .La libération de glucose se fait par le glycogène phosphorylase et l'augmentation du taux de calcium . Aprés de maintenir l'homeostasie le complexe glucgon-récepteure est éliminé par endocytose au niveau du foie et des reins **(Sandoval D&D, et al 2015) .** L'enzyme dipeptidyl-peptidase peut aussi désactive l'hormone **(Pospisilek. JA, et al . 2001).**

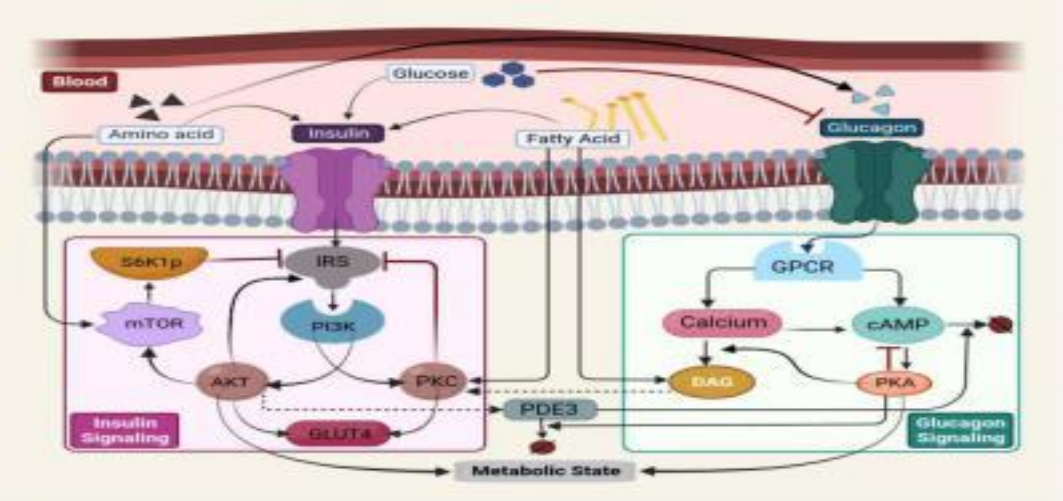


Figure 15 : Voies de signalisations des hormones pancréatiques

1.3.3.2.3 Interaction insuline –glucagon :

Des hormones tel que l'insuline et le glucagon déclanchent des cascades de signalisation régulent dynamiquement les flux par les voies métaboliques pour répondre au besoins énergétiques des cellules et maintenir l'homéostasie.

Homéostasie métabolique est de maintenir la composition extra et intracellulaire des métabolites dans différentes conditions physiologiques, tels que, aprés repas , l'éxercice physique , le jeune . . Les macronutriments comme le glucose, les acides gras, les acides amineés stimulent la sécretion d'insuline, tandit que le glucose et les acides gras inhibent la sécrétion de glucagon ,les acides aminées stimulent cette sécrétion . Dans le plasma, lorsque les niveaux des macromolécules commencent à augmenter **(**exemple post-prandiale) la signalisation de l'insuline domine sur le glucagon pour activer les voies anaboliques tel que la glycogénogenèse et la lipogenèse. . Alors que lors de dépense énergétique (jeune ou éxercice physique), la signalisation de glucagon domine sur l'insuline pour activer les voies cataboliques comme la glycogénolyse et la lipolyse . Le maintien de l'homéostasie par rétroaction négatif est le principale mécanisme par le quel les voies de signalisation homéostatique fonctionnent dans le systeme vivant **(Twrigiano G 2007) ,** et toute perturbation de ces mécanisemes de régulation liée à des états pathologiques comme le diabète ,l'obésité,la stéatose hépatique,.....

1.4 Diabète de type 2 :

1.4.1 Définition :

Le diabète de type 2 ou diabète non insulinodépendant est caractérisé par une déficience relative en insuline causée par un dysfonctionnement des cellules beta pancréatiques et une résistance à l'insuline dans les organes cibles. Il résulte de la conjonction de plusieurs gènes de susceptibilité, dont l'expression dépend de facteurs environnementaux tel que la consommation excessive de graisses saturées, de sucres rapides ainsi que la sédentarité. **(Chatterjee et al., 2017; Fuchsberger et al., 2016; Langlois, 2008; Rigalleau et al., 2007).**

• Le diabète de type 2 est caractérisé par une hyperinsulinémie accrue, une résistance à l'insuline et une insuffisance des cellules beta pancréatiques, avec jusqu'à 50% de perte cellulaire au moment du diagnostic **(Chatterjee et al., 2017).**

1.4.2 Facteurs de risque du diabète de type 2 :

De plus, plusieurs facteurs de risque sont associés à DT2 :

• **Âge** Jusqu'à il y a deux décennies, l'était habituellement présent chez les adultes et les personnes

Âgées. Cette situation était à l'augmentation de la résistance à l'insuline due à la modification de la composition corporelle (moins de muscle en faveur de tissus plus adipeux), à la capacité réduite de « Combustion du sucre » et à la diminution progressive de l'activité physique. Menant à la croissance impressionnante du taux d'obésité, l'âge moyen d'apparition est baisse, et le diabète peut Maintenant être trouvé même chez les enfants.

• **Obésité** Personne dont l'indice de masse corporelle (IMC) est égal ou supérieur à 30 kg/m2 est généralement considéré comme obèse, L'augmentation du tissu adipeux est un facteur de risque primaire dans le diabète. En fait, il existe une corrélation directe entre le pourcentage de graisse et les cellules résistantes à l'insuline, surtout si la graisse est concentrée dans la région abdominale. Environ 80% des patients DT2 sont obèses, ce qui n'est pas, cependant, une condition nécessaire pour développer le diabète.

• **Sédentarité** Un mode de vie sédentaire peut accroître le risque de DT2, l'activité physique Aide à contrôler le poids corporel et réduire la glycémie en plus de nombreux autres avantages.

• **Influences génétiques** La génétique joue un rôle très important t dans le développement du DT2, formes courantes de DT2 sont poly génétiques, donc il y a des changements dans les gènes multiples, mais il y a également certaines formes rares de diabète qui sont causées par une mutation génique unique, connue sous le nom de mono gène diabète.

(Grosclaude & Ziltener, 2010).

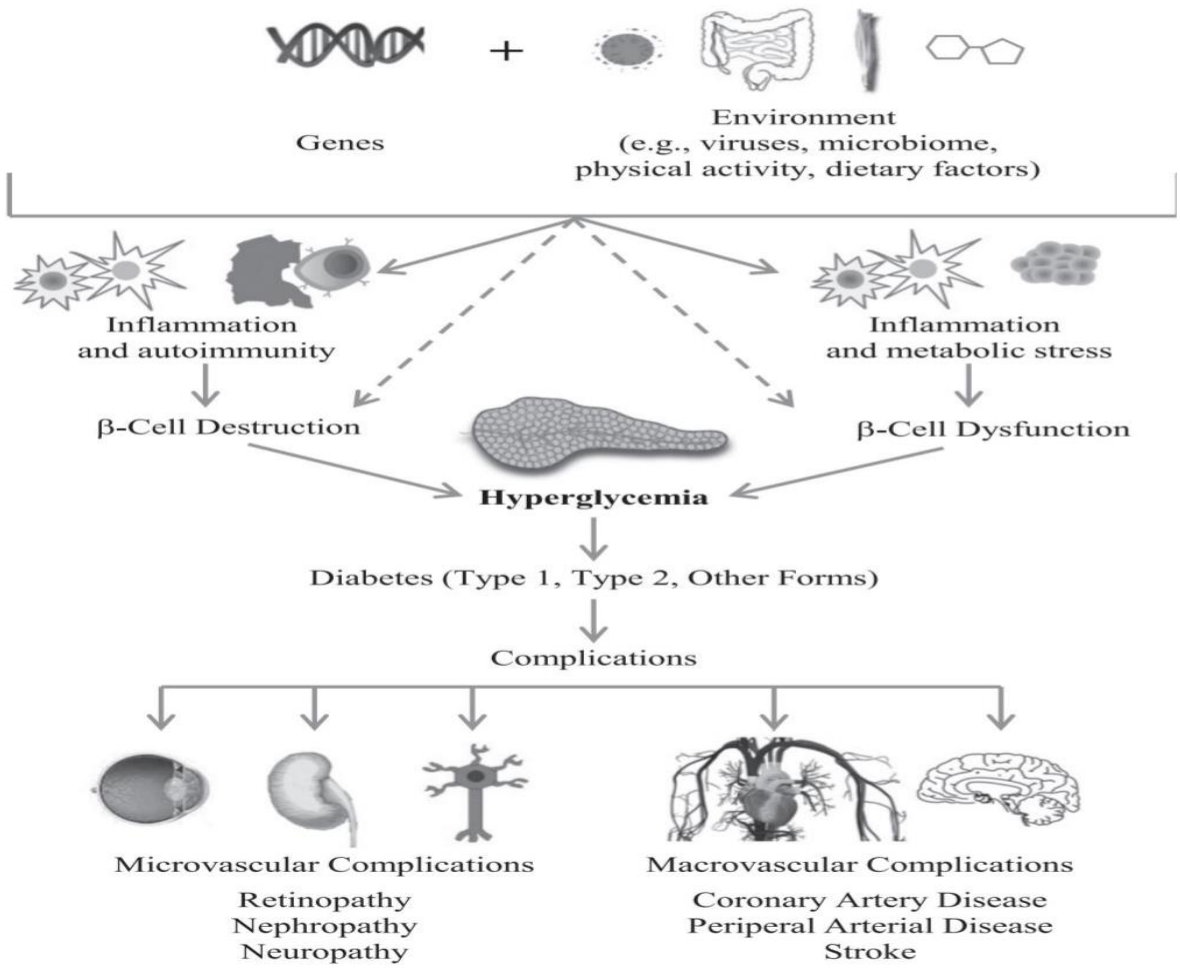


Figure 16 : Impact des facteurs de risque génétiques et environnementaux sur l'inflammation, l'auto-immunité et le stress métabolique. ***(*Angelica. A et al ., 2022).**

1.4.3 Physiopathologie de daiabète type 02 :

Le diabète de type 2 (DT2) est caractérise par une dérégulation du métabolisme des glucides, des lipides et des protéines, et résulte d'une altération de la sécrétion d'insuline, d'une résistance à l'insuline ou d'une combinaison des deux.**(DeFronzo et al., 2015).** La résistance à l'insuline et les troubles de la sécrétion d'insuline sont des facteurs majeurs dans la pathogénèse du diabète de type (**Del Prato et al.,2019 ; Kahn et al.,2003)**

1.4.3.1 La résistance à l'insuline :

La résistance à l'insuline est à la diminution de la réponse des tissus sensibles à l'insuline à l'action de l'insuline. L'insuline ne peut pas exercer ses pleines activités biologiques, L'excès de glucose reste dans la circulation sanguine ce qui provoque une hyperglycémie, et les tissus modifient leurs voies métaboliques en réponse à absorption d'énergie inadéquate, sous-jacente à des

troubles tels qu'une altération des fonctions de tissu adipeux , obésité, inflammation, dyslipidémie, production d'espèces réactives oxydatives (ROS), athérosclérose, dysfonctionnement endothélium et hypertension **(Fonseca VA.2009)**

1.4.3.1.1 Mécanisme de l'insulino-résisitance :

la résistance à l'insuline est définie comme une incapacité d'un certain type de tissus à répondre à des niveaux d'insuline normaux. Alors, les effets régulateurs du glucose tels que la suppression du HGP et de la lipolyse, l'absorption cellulaire du glucose plasmatique et la synthèse nette de glycogène ne sont pas observés dans les tissus résistants à l'insuline. Le muscle squelettique est un tissu central pour l'infexation du glucose stimulé par l'insuline, le foie et le tissu adipeux sont les sites critiques pour la signalisation de l'insuline induite par le glucose, ces tissus sont considérés comme essentiels à la compréhension des mécanismes responsables de la résistance à l'insuline :

1.4.3.1.1.1 Dans les muscles :

La principale fonction de l'insuline dans le muscle squelettique est de favoriser l'absorption cellulaire du glucose, un processus contrôlé par Translocation GLUT4 **(Petersen MC .2018)**

Alors l'IR musculaire est caractésée par une altération des capacités d'absorption du glucose par le myocyte ***(Shulman GI.2014)*** . La captation du glucose par le muscle est insulinodépendante et découle de l'expression du transporteur membranaire GLUT-4. L'atteinte de GLUT-4, résulte d'une diminution de fonction de phosphorylation de INSR altérant la cascade de transduction du signal passant par IRS-1, PI3K et la voie AKT. L'atteinte de l'activité d'AKT restreint l'expression membranaire de GLUT-4 ainsi qu'à son expression transrationnelle. En conséquence, le métabolisme glucidique s'altère avec une diminution de la glycogénèse musculaire **(Petersen MC .2018)**

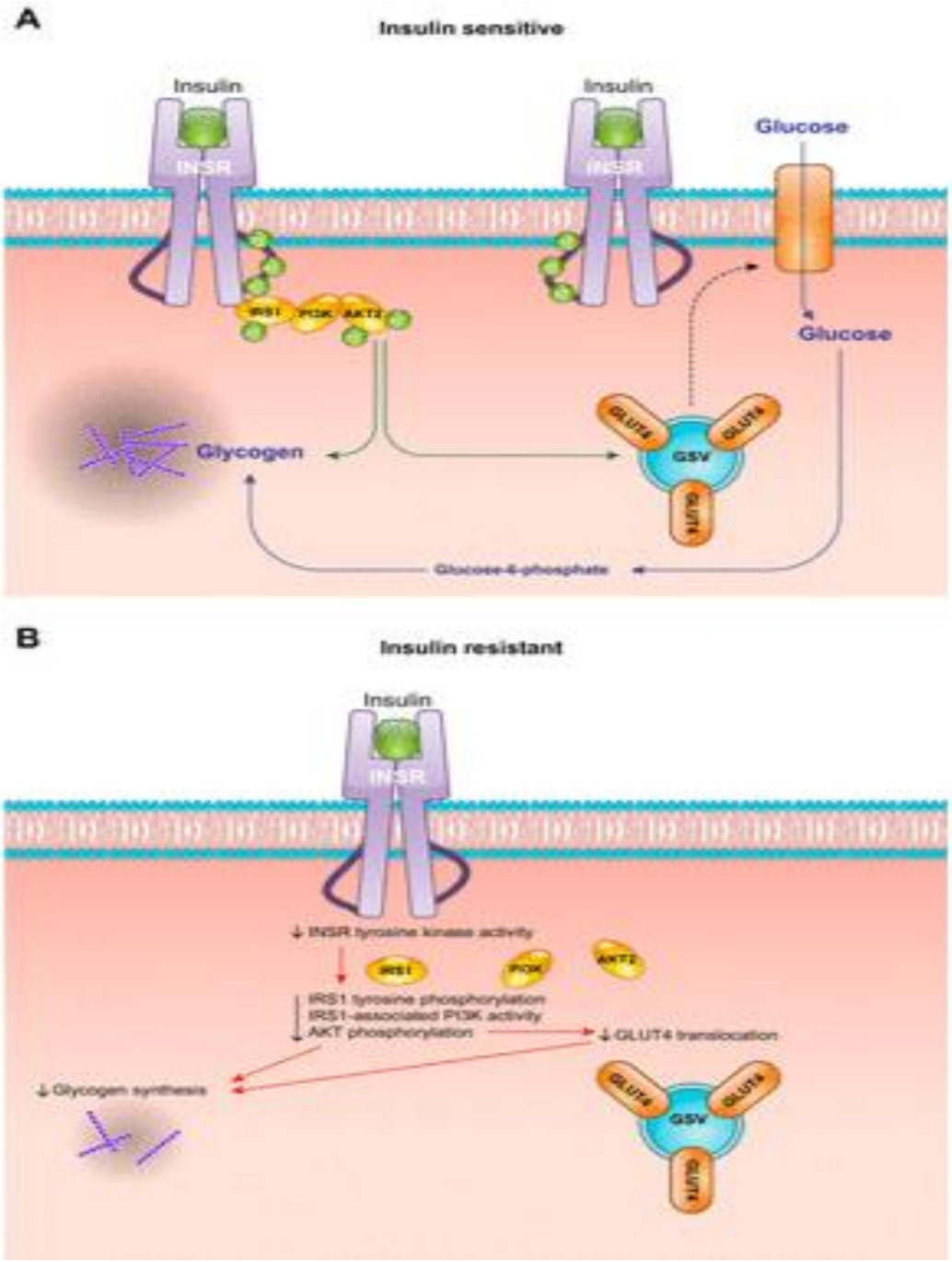


Figure 17: Conséquences fonctionnelles du muscle squelettique résistance à l'insuline **(Max C et al .,.2018)**

1.4.3.1.1.2 Dans le foie et tissu adipeux

Chez les patients atteints de l'IR, l'insuline ne peut pas réguler la synthèse hépatique du glycogène ou la production de glucose, et augmente la gluconéogenèse hépatique., cette augmentation est associée à défauts de lipolyse dans le tissu adipeux et la suppression de FOXO1**. (Lee et al .,.2022)**

Dans le foie, une augmentation transitoire du DAG qui provienne à la fois de la réestérification des acides gras et de la lipogenèse de novo, due à un déséquilibre des flux intra hépatocellulaires, entraîne l'activation de l'isoforme PKCε qui se lie et inhibe la tyrosine kinase du récepteur de l'insuline, entraînant une diminution du glycogène stimulé par l'insuline ***(*Shulman, et al ,.2014).**

• Dans le même temps, il a été montré que le tissu adipeux répond aux stress métaboliques par une sécrétion accrue de molécules pro-inflammatoires à action locale et systémique, fortement corrélée à l'insulino-résistance et ses complications métaboliques. L'infiltration macrophagique du tissu adipeux stimule la lipolyse adipocytaire, augmentant l'afflux d'acides gras dans les tissus non adipeux et stimulant la synthèse hépatique de triglycérides. **(Vigouroux, C .2019)**

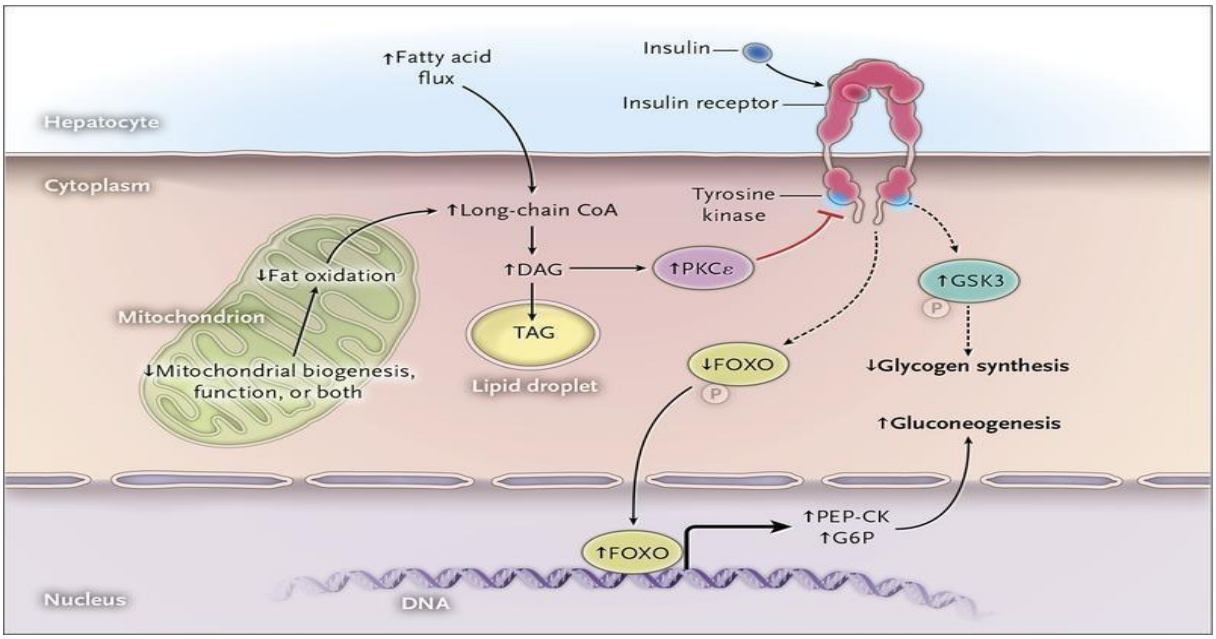


Figure 18 *:* Mécanismes moléculaires de la résistance à l'insuline hépatique induite par les lipides**. (Shulmanet al ,..2014)**

1.4.3.2 le dysfonctionnement des cellules béta :

Une caractéristique importante du DT2 est la réponse des cellules bêta afin de s'adapter face aux différents facteurs de stress en augmentant à la fois la fonction et la masse. Cependant, à mesure que la pathologie progresse et devient chronique, les cellules bêta pancréatiques devient défaillantes.**(Muoio et al., 2008).**

La défaillance des cellules bêta est la conséquence de plusieurs facteurs, notamment d'une glucotoxicité, d'un stress oxydatif, d'une inflammation et d'une perte d'expression des composants fondamentaux de la machinerie sécrétoire du granule d'insuline.

Notion de glucotoxicité : l'hyperglycémie chronique peut entraîner une diminution des granules de sécrétion d'insuline par le β cellules, diminuant la quantité d'insuline disponible pour de nouvelles réponses au glucose et induisant la mort des cellules β **.(Fonseca VA.2009)**

Notion de Lipotoxicité : des niveaux chroniquement élevés d'acides gras libres (FFA) peuvent augmenter le taux basal de la sécrétion d'insuline et affecter la synthèse ou la conversion de la pro insuline en insuline, conduisant à réserves d'insuline épuisées, il a également été observé que la lipotoxicité induisait l'apoptose des cellules β **(Donath MY 2011)**

Inflammation : L'inflammation systémique est un facteur contributeur à la résistance à l'insuline, elle se produit principalement dans les tissus adipeux et le foie **(Cai et al.,2005)**. De nombreux médiateurs de l'inflammation sécrétés par les cellules immunitaires et les adipocytes contribuent au développement de l'insulinorésistance. Des concentrations élevées en cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6 et le TNF, et un nombre important de macrophages et d'autres cellules inflammatoires sont observés dans le tissu adipeux, le foie et le sérum des patients et des animaux présentant une résistance à l'insuline **(Romeo et al.,2012)**.

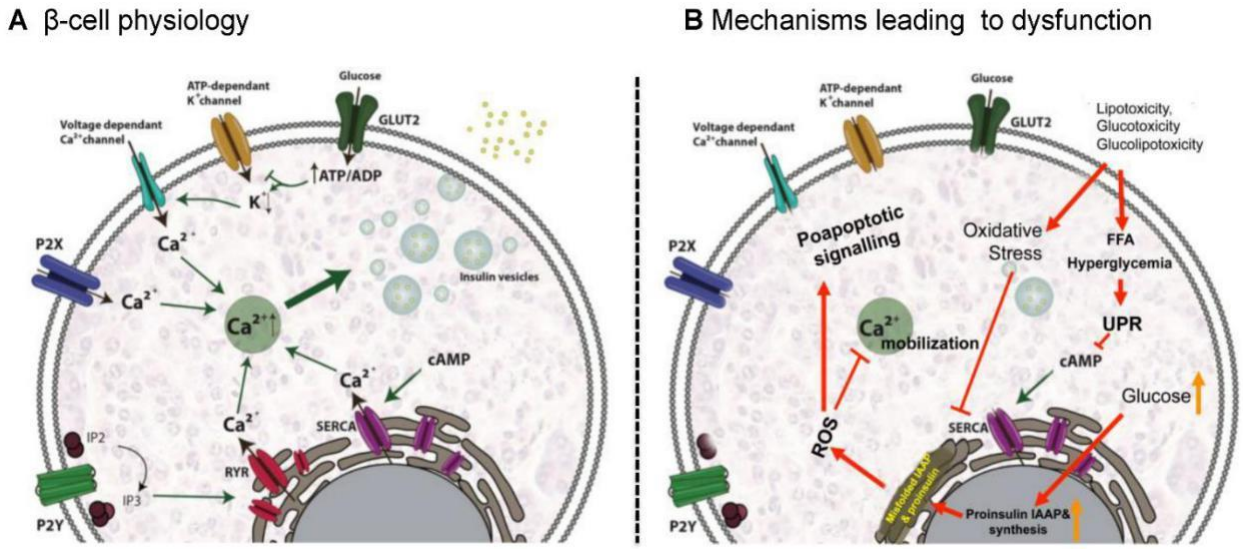


Figure 19: Signaling pathways involved in insulin secretion in β-cells in physiological conditions (A) and mechanisms leading to dysfunction (B**). (Galicia-Garcia,2020)**

1.4.5 L'obésité, inflammation et l'insuline-résistance :

Le tissu adipeux blanc est le site principal de stockage d'énergie, mais il est maintenant reconnu comme un participant actif dans la régulation des processus physiologiques et pathologiques, y compris Immunité et inflammation. Il a une fonction endocrine en sécrétant au moins deux hormones principales, la leptine et l'adiponectine. Ça peut d'autres produits, appelés adipokines, notamment des cytokines et des chimiokines, impliqués dans le processus inflammatoire. Les graisses et les glucides contenant dans une suralimentation chronique vont stocker dans les tissus viscéraux et ectopiques résultant l'obésité qui provoque à la suite un stress métabolique et une lipotoxicité. Ce stress métabolique est principalement initié par une hypertrophie anormale des adipocytes, ces derniers libèrent plus de FFA dans la circulation sanguine exigeant une grande oxydation et une grande production des ROS. De plus cette hypertrophie guide à une production anormale d'adipokines et l'activation de voies de signalisation pro-inflammatoires, se traduisant par une induction de marqueurs plasmatiques de l'inflammation tels que TNF-alpha, d'IL-6 et élévation des concentrations plasmatiques de CRP **(Bruno. F et al,.2006)**

Le TNF-α et l'IL-6 gravent la résistance à l'insuline en activant le récepteur TNF-α (TNFR) et d'autres récepteurs de cytokines , qui induit ensuite l'expression du suppresseur de la signalisation des cytokines (SOCS), qui liés directement au récepteur de l'insuline via les domaines SH2 et empêcher la phosphorylation de la tyrosine IRS. Donc l'obésité entraîne une inflammation à bas grade, une résistance à l'insuline dans le tissu adipeux, les muscles et le foie (avec stimulation à la fois de la gluconéogenèse et de la glycogénolyse), provoque aussi une défaillance des cellules β, et augmente le stress oxydatif, ce qui déclenche le développement du DT2**.(Thiago M et al .,2021)**

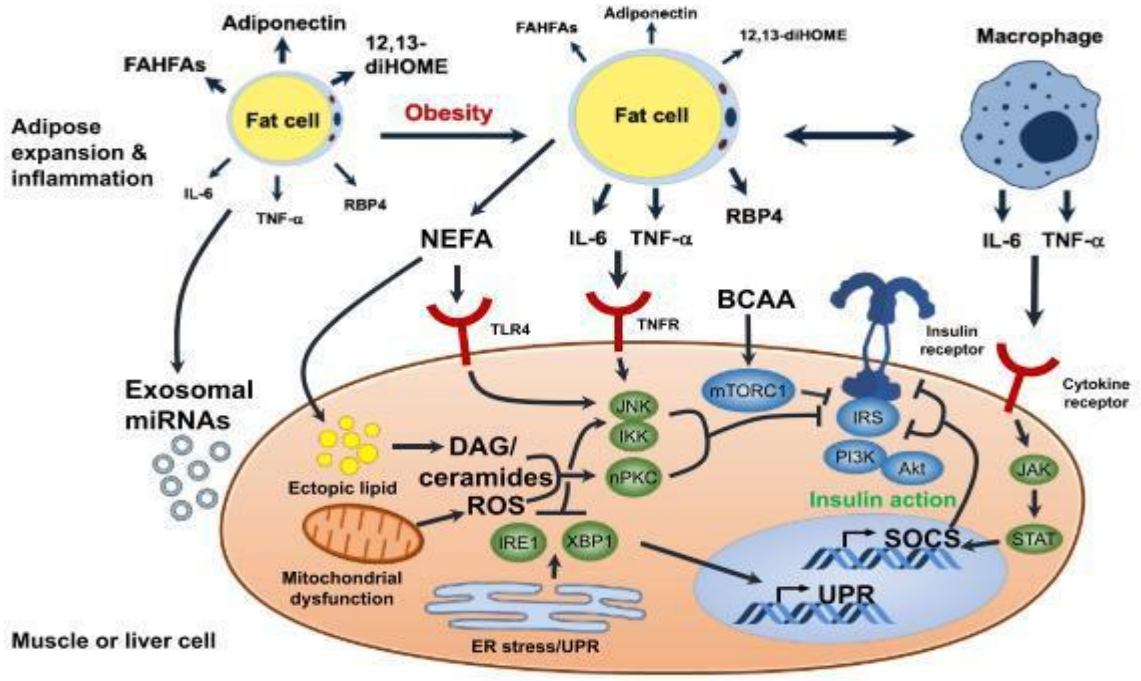


Figure 20: Extrinsic factors contributing to insulin resistance**.(Thiago M et al .,2021)**

1.4.6 Maladies associés au diabète type 2

1.4.6.1Maladies hépatiques non alcooliques

Le diabète type 2 éxpose de nombreuses complications qui procédent des mécanismes complexes associant l'hyperglycemie, l'insulinorésistance, l'inflammation à bas grade l'obésité et l'athérogenèse accélereé**. (Schlinger .2013).** Parmi les complications émergentes du diabète type deux figurent certains canceres, le syndrome d'apneé du someil et la stéatose hépatique non alcoolique NALFD **(Schlienger. 2013**)

1.4.6.1.1 La stéatose Hépatique :

NAFLD est une affection hépatique chronique souvent associe au diabète type 2, sa prévalance est en augmentation progressive dans les dernnières anneés en raison de l'épidémie mondiale de surcharge pondérale, la résistance à l'insuline, l'obésité (**Gariani K ;et al .2012).**

1.4.6.1.1.1 Définition :

NAFLD est déffinie comme l'accumulation des lipides sous forme de triglycerides(TG) dans les hépatocytes en abscence de consommation de l'alcool. Appeleé aussi stéatose métabolique (**Loomba R, et al 2021)**

Le mot stéatose signifie gouttellettes lipidiques, donc les lipides s'accumulent dans des vacuoles cytoplasmiques des hépatocytes. La stéatose est significative lorsqu'elle est superieure à 5%(**Rodolphe A, et al 2019).** Le spectre de dévloppement de NAFLD allant d'un simple stéatose hépatique ou foie gras NAFL, caractérisée par la présence de vacuoles lipidiques généralement macrovésiculaire au sein des hépatocytes, et est réverssible et assymptomatique, jusqua la stéato-hépatite non-alcoolique NASH, fiborose,cirrhose **(Smith BW . 2011)** et meme jusqu'au carcinome hépatocellulaire CHC

NASH est définie par l'association d'une stéatose et une inflammation comprent une infiltration des cellules inflammatoires (macrophages, lymphocytes, polynucélaires neutrophiles) et des signes de soufrance hépatocytaire à type de ballonisation(**Rodolphe A et al , .2019)** .

La fibrose dans la stéatose hépatique non alcoolique se dévloppe comme dans la maladie alcoolique, selon une localisation particuliére, d'abord périsinusoidale en région péricentrolobulaire puis une fibrose sinusoidale dense peut apparaitre. Une cirrhose peut etre associe à une fibrose.

.1.4.6.1.1.2 Physiopathologie de stéatose hépatique nonalcoolique (NAFLD) :

La stéatose hépatique enjeu majeur de santé publique, considéreé comme la première cause des maladies hépatique chronique et de transplantation hépatique .La NAFLD est la complication hépatique du syndrome métabolique caractériseé par des lésions hépatiques due à une accumullation des lipides (TG) , quand associe à l'inflammation évaluéé vers NASH, et peut aller vers la fibrose , cirrhose ou CHC.

La physiopathologie est complexe et consiste notament à l'accumulation des lipides, phénomène inflammatoire et un dysfonctionnement mitochondriale**.(Day CP, et al 1989).**

1.4.6.1.1.2.1 Les Maladies associes au diabète

1.4.6.1.2.2 Maladies hépatiques non alcoolique :

Le diabète type 2 éxpose de nombreuses complications qui procédent des mécanismes complexes associant l'hyperglycemie, l'insulinorésistance l'inflammation à bas grade l'obésité et l'athérogenèse accéleréé**.(Schlinger .La press medical 2013).** Parmi les complications émergentes du diabète type deux figurent certains canceres , le syndrome d'apneé du someil et la stéatose hépatique non alcoolique NALFD **(Schlienger.La presse medicale2013**) .

NAFLD est une affection hépatique chronique souvent associe au diabète type 2, sa prévalance est en augmentation progressive dans les dernnières anneés en raison de l'épidémie mondiale de surcharge pondérale , la résistance à l'insuline, l'obésité(**Gariani K ;et al .2012).**

A_Déffinition :

NAFLD est déffinie comme l'accumulation des lipides sous forme de triglycerides(TG) dans les hépatocytes en abscence de consommation de l'alcool . Appeleé aussi stéatose métabolique(**Loomba R , et al 2021)**

Le mot stéatose signifie gouttellettes lipidiques , donc les lipides s'accumulent dans des vacuoles cytoplasmiques des hépatocytes. La stéatose est significative lorsqu'elle est superieure à 5%(**Rodolphe A , et al 2019).** Le spectre de dévloppement de NAFLD allant d'un simple stéatose hépatique ou foie gras NAFL,caractérisée par la présence de vacuoles lipidiques généralement macrovésiculaire au sein des hépatocytes , et est réverssible et assymptomatique , jusqua la stéato-hépatite non-alcoolique NASH,fiborose,cirrhose **(Smith BW . 2011)** et meme jusqu'au carcinome hépatocellulaire CHC

NASH est définie par l'association d'une stéatose et une inflammation comprent une infiltration des cellules inflammatoires (macrophages,lymphocytes,polynucélaires neutrophiles) et des signes de soufrance hépatocytaire à type de ballonisation(**Rodolphe A, Philips G .2019)** .

La fibrose dans la stéatose hépatique non alcoolique se dévloppe comme dans la maladie alcoolique, selon une localisation particuliére,d'abord périsinusoidale en région péricentrolobulaire puis une fibrose sinusoidale dense peut apparaitre. Une cirrhose peut etre associe à une fibrose.

1.4.6.1.2.3 Physiopathologie de stéatose hépatique nonalcoolique (NAFLD) :

La stéatose hépatique enjeu majeur de santé publique, considéreé comme la première cause des maladies hépatique chronique et de transplantation hépatique .La NAFLD est la complication hépatique du syndrome métabolique caractériseé par des lésions hépatiques due à une accumullation des lipides (TG) , quand associe à l'inflammation évaluéé vers NASH, et peut aller vers la fibrose , cirrhose ou CHC.

La physiopathologie est complexe et consiste notament à l'accumulation des lipides ,phénomène inflammatoire et un dysfonctionnement mitochondriale**.(Day CP, et al 1989).**

A) Apparition de stéatose :

Les lipides hépatiques sont issus de la lipolyse du tissu adipeux cutané et vesérale (60%) , les chylomicrons d'origine alimentaire(15%) et la lipogenèse de novo (25%) (**Donnelly KI, et a J,2005**) . En cas de nécéssité par éxemple cas de jeune la lipolyse de tissu adipeux péréphérique fournisse de l'énergie par la dégradation des TG stockés , cette lipolyse est normalement inhibeé par l'unsuline . Chez les patients insulinorésistants (diabète et/ou obésité) le procéssus n'est pas inhibé ce qui induit une libération des AGL dans la circulation et par conséquent dans le foie (**Rodolphe A,Phillipr G 2019)** . La lipogenèse de novo est activeé par le glucose et le fructose, car ce dernier prèsque totalement capturé par le foie et transformé en lipides (plutot qu'en glycogène), concernant les voies d'utilisation des lipides ,la béta oxydation et l'éxport des VLDL sont altéreés chez les patients NAFLD ,l'augmentation de la béta oxydation (chez l'homme les donnés sont contradictoires) favorise la production des radicaux libres , lorsque les défenses antioxydant sont dépassés le stress devient délétere et altère la mitochondrie et d'autre organites , l'éxport hépatique des VLDL est augmenté pour compensé la surcharge en lipides qui contribue à l'augmentation des TG et la diminution des HDL(deux éléments de syndrome métabolique), la stéatose est souvent associe à une insulinorésistance hépatique ce qui traduit l'hyperglycémie à jeun grace à la production endogène de glucose .La péesence d'un stéatose pure sans inflammation est bénigne car les hépatocytes stockent les AGL toxique sous forme de TG inerte dans des gouttelletes lipidiques (**Rodolphe A,Phillipr G 2019)** .

B) Apparition de NASH :

Les mécanismes physiopathologiques de la NASH sont essentielement l'inflammation ,la mort cellulaire et la fibrogenèse qui sont en interrelation.Le strèss oxydant et la dysfonction mitochondriale joueraient un role éssentiel(**Rodolphe A,Phillipe G 2019**) . les altérations fonctionnelles et structurales des mitochondries sont traduit par des anomalies de la chaine

réspiratoire ,peuvent amené à l'activation intrinsèque de la mort cellulaire par appoptose via l'activation des caspases et la production des cytokines proinflammatoires . L'altération de la béta oxydation des acides gras conduit à l'accumulation des lipides intermédiaires(AGL,diacéylglécérol,phospholipides,.....)particulièrement toxiques pour les hépatocytes (notion de lipotoxicité).La lipotoxicité est particulièrement impliqueé dans l'apparition de NASH et induisant le stress oxydant de réticulum endoplasmique qui peut aussi génère des signaux de mort cellulaire et amène à la production des cytokines proinflammatoire comme IL-1béta**(Lebraupin C,**

et al 2015). La souffrance et la mort cellulaire libère des DAMPs(danger associated molecular patterns),comme l'exasomes petites vésicules viéculent les signaux de stress vers les cellules distants,des débrits membranaires ou ADN cellulaire, les DAMPs peuvent activer les cellules inflammatoires hépatique et les cellules stéllaires ,d'autres DAMPs comme les cytokines ,micro-ARN vont activer la transcription des gènes impliqués dans la prolifération,la différenciation et la viabilité cellulaire . L'activation des cellules de KUPFFER et stellaires augmente l'expression des chimokines (exemple CCL2) qui accompagne l'enrechissement hépatique en monocytes/macrophages et contribue a la mise en place de l'inflammatio hépatique, les cellules stéllaires différencies en myofibroblases pour l'initiation de la fibrogenèse . Les PAMPs issus du microbiotes intestinale peuvent activer les macrophages résiduelles ou recrutée du foie en favorisant la dominance de phénotype M1 proinflammatoire,et par conséquent la production des cytokines proinflammatoires tel que IL_6,IL-1,TNFalpha **(Wellen KE, et al .2005, Dimitrov S, et al .2017, Aleksandrova K, et al 2014**

C) Apparition de la fibrose :

La fibrose est un mécanisme de cicatrisation déclanché par des hépatocytes stéssés ou endommagés et les macrophages activés , les myofibroblastes issus des cellules stéllaires produisent les proteines de la matrice extracellulaire , la fibrose dépent de la fibrogenèse et la fibrolyse et apparait quand les capacités hépatiques de la fibrolyse sont épuiés(**Rodolphe A,Phillipe G 2019**).

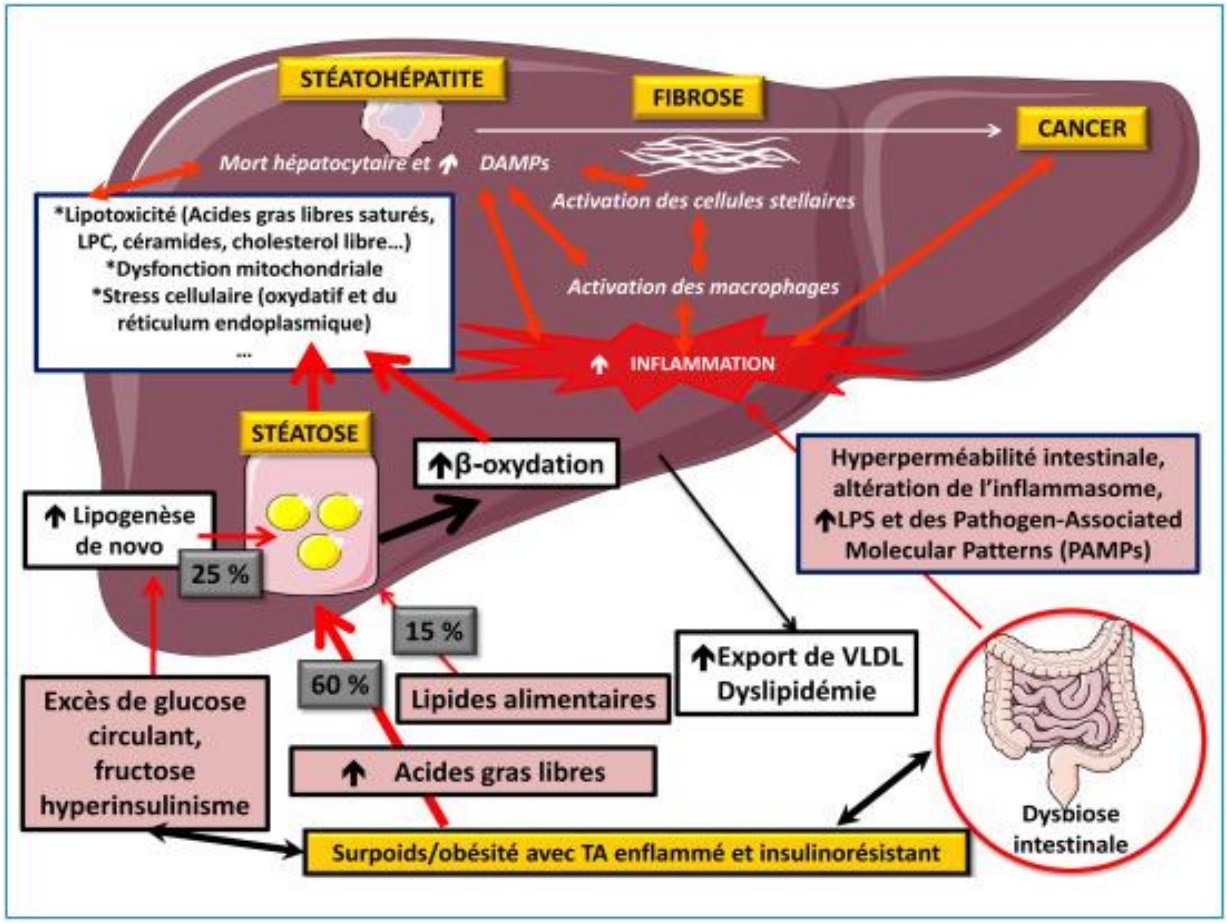


Figure 21 : Physiopathologie de stéatose hépatique métabolique (ELSEVIER .2019)

1.4.7 Modèles expérimentaux de Diabète

L'étude de pathologies nécéssite souvent la mise en place de modèles animaux dévloppant des symptomes se rapprochant le plus possible à ceux retrouvés chez l'homme. Cette utilisation à pour bute de mieux comprendre l'étiologie, la physiopathologie, les complications des pathologies et aussi pour tester l'éfficacité de traitement potentiels contre ces maladies.

A / Modèles de diabète induit par substance chimique :

Ces substances sont toxiques pour les cellules béta de langerhans, les plus utilisés sont :

L'alloxane dont la toxicité est due à la production des radicaux libres d'oxygène.

La Streptozotocine à forte dose détruit les cellules béta. A faible dose répéteé induit une insulite,suivi de la déstruction des cellules béta par mécanisme dépendant de cellules T. L'alloxane et le streptozotocine sont des analogues du glucose et agissent sur les cellules béta par l'intermidière de récépteur de glucose GLUT2**(Alsner et al2002, Schned et al1994).**

B/Pancréatéctomie :

Cette technique n'est ni pratique, ni éthique, elle est plus utilisable chez les gros animaux que chez les rongeures, surtout dans les études de la transplantation des ilots chez le porc

(**Emamullee et al 2009**). La pancreatectomie chirurgicale permet de réaliser une ablation de 90% du pancréa endocrine de l'animale, au début la glycemie est normale mais 6 à7 semaines après elle s'élève et apparait une intolérance au glucose.

C/Modèles génétiques :

1)Souris ob/ob : décrites dans les années 70, les souris ob/ob (C57BL/65-ob/ob)sont porteuses d'une mutation autosomique récéssive sur le gène de la léptine (**Friednan 1991 ;Zhang1994**), elles sont obèses ,hyperinsulinémique, hyperglycemique dès la quatrième semaine de la vie.

2)Souris db/db : souris C57BL/KsJ-db/db) possèdent une mutation autosomique récéssive sur le gène du récépteur de la léptine(**Chen et al 1996**) . Dès la $4^{ème}$ à la $8^{ème}$ semaines les animaux présentent une élévation de la glycemie, ils dévloppent une cétose et ont une dureé de vie courte (**Srinivasan et al 2007**).

3)Rats ZUCKER fa/fa : rats obèses (fatty)ont été découvertes en 1991 ,ils possèdent une mutation du gène de récépteur de la léptine (**Phillips et al 1996**), ces animaux dévloppent une résistance à l'insuline ,une altération modérée de la tolérance au glucose,une dyslipidémie et une hyperinsulinémie(**Aexandre de Artinano2009).**

4) **Rats ZUCKER diabètiques** : la ligne de rats ZUCKER diabétique(ZDF) a été établie en 1985 et dévloppée comme modèle génétique en 1991, ce modèle dévloppe rapidement une hyperinsulinémie, une hypertriglyceridémie et une hyperglycemie entre la $7^{ème}$ et la $12^{ème}$ semaine et présente aussi des signes de complications de diabète **(Shibata et al 2000**).

5) Rats OLETF : Otsuka Long Everus Tokushniva Fatty, ces rats défficients en récepteur CCK-1, présentent une insensibilité aux actions de cette protéine qui se traduit par l'absence de l'inhibition de la prise alimentaire, ce modèle dévloppe une hyperglycemie et une diminution de la tolérance au glucose. Ces rats présentent également des complications rénales (**Lee et al 2011**).

1.4.7.1 Diabète induit par régime hyperlipidique :

L'induction de diabète par alimentation hyperlipidique chez les modèles éxpérimentaux (rats ou souris) se fait par un grand nombre de protocoles , utilisant des régimes enrichis en graisses ,appelés aussi régimes High-Fat(HF). Nous citerons ci dessous quelques exemples de diadete induit par régime hyperlipidique.

L'obésité induite en nourissant les souris par un régime riche en graisse a été décrite chez des souris C57BI/6 ,et été utilisé dans de nombreuse études(**Surwit et al 1988**).La résistance à l'insuline , l'intolérance au glucoser et une prise de poid ,sont les caractéristiques de ce modèle **(Winsell et al 2004).** De plus il a été démontré que les souris nouriées à haute tenneur en graisses peuvent peser plus que les souris témoins, et que la prise de poid est lié à la résistance à l'insuline .Chez les rats ,

les souches Sprague Dawley et wister sont souvent utiliseés (**Marques et al 2016**).

Le rat de sable : Psammomys Obesus, dévloppe une obésité et un diabète lorsque il est nourit avec un régime hypercalorique de laboratoire **(Shafrir et al 2006)** ,initialement les rats dévloppent une hyperphagie ,une obésité ,une hyperinsulinémie ,un intolérance au glucose avec des cellules des ilots pancréatiques restent intact suivit d'une dégénérescense des cellules béta ,puis carence profonde en insuline , et finalement la mort de l'animale(**shafrir 2001**).Rat d'herbe de nile(Arvicanthis niloticus) a été proposé comme modèle de syndrome métabolique (**Noda et al 2010**) .

Les régimes riches en lipides et en saccharose sont également utiliseés pour induire un déséquilibre glycemique chez les rongeures **(Fernandes S et al 2009, Sampath et al 2014**).

Chapitre 02 :
Le stress oxydatif, diabète et hyperglycémie chronique

Chapitre 02 : Le stress oxydatif, diabète et hyperglycémie chronique 2.1 Déffinition de stress oxydant :

La notion de RADICAUX LIBRE, STRESS OXYDANT et ANTIOXYDANT est de plus en plus souvent utilusés pour éxpliquer différentes atteintes pathologiques et leur approche thérapeutique. Au milieu des anneés 50 **Guschman et Harton**, ont montré que la molécule d'oxygène indispensable à la vie peut entrainer des éffets dommageables dans l'organisme et qu'elle est toxique. En 1969 les amiricains MC **Cord et Fridavich** isolent à partir des globules rouges humains un système enzymatique antioxydant ; LA SUPEROXYDE DISMUTASE(SOD), qui élimine le radicale libre superoxyde , démontrant ,ainsi, pour la première fois que notre organisme produit des éspèces réactives de l'oxygène(EOA) . **(J.Haleng et al 2007**).Cette découverte sera le point de départ de nombreuses recherches sur le stress oxydant.

Notre mode de vie (tabagisme, sédentaritée, alcoolisme, obésité,..) ,les rayons solaires ,notament, les UV , mais aussi notre mauvaises habitudes alimentaires augmentent de façon anormale la production des EOA dans notre organisme.

Le strèss oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'éspeces réactives de l'oxygène EOA et les défenses antioxydants de l'organisme ,en faveur des premiers **(J Haleng et al 2000)**

2.2 Les radicaux libres :

La matière vivante est composeé d'atomes qui comprènnent réspectivement ,des éléments appartennant au noyau (les protons) ,et les éléctrons qui forment un nuage orbitale autour de celui ci par des mouvements de rotation .Ces mouvements correspond à une énergie importante qui rend ces composes instables, c'est à dire réactifs avec des éléments voisins pour etre stable par la formation de couples ou paires d'éléctrons **(Xavier L ,2009)** .

On appelle radicale libre tout corps qui contient un ou plusieurs éléctrons libres (célébataires) sur leur couche périphérique ,le rend trés réactif **(Xavier L , 2009**) .Ces radicaux vont réagir avec d'autres composés (enzymes,ADN,lipides, proteines,glucides) pour devenir plus stable .

Les radicaux peuvent etre dérivés de l'oxygène appeles éspèces réactives de l'oxygène (ERO) ,ou éspèces composes de l'oxygène et de l'azote ou de chlore.L'appelation ERO inclue :

***L'anion superoxyde O2- :** est un radical modérément réactif **(Maamari et al 2008)** ,ce radical est le substrat d'enzymes comme la superoxyde dismutase (SOD), qui le transforme en pyroxyde d'hydrogène (H2O2), ce dérnier peut avoir différents distinés ,en présence de métaux ,en particulier le fer(Fe+2), il sera transformer en en radicale hydroxyle (OH) par la réaction de fenton. ***Le radical hydraxyde (OH)** :,possède une éxtrème réactivité et va oxyder rapidement les molécules voisines fortement , en d'autres radicaux libres (**Morel et al**

1999,Gardès-Albert et al 2005) ,le radical hydroxyle produit au sein de la cellule suite à une réaction de Haber-weiss en présence de H2O2 ou la réaction de Fenton **(Gardès-Albert 2005**). Les cibles biologiques de de radical hydroxyle sont ,les proteines,les lipides , les acides aminés(**Vogitazi et al 2009).**

***Le péroxyde d'hydrogène** : est un dérivé oxygéné non radicalaire mais toxique ,il a tendance à attirer les éléctrons d'autres atomes et molécules pour etre stable **(Dellatre et al 2005**).

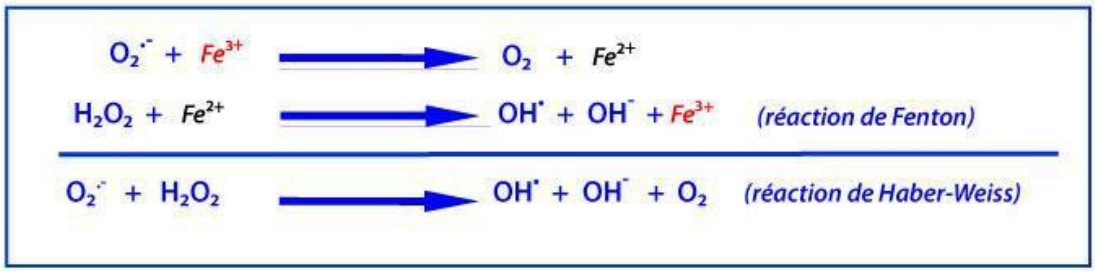


Figure 22 : REACTION DE FENTON ET REACTION DE HABER-WEISS **(Gardès-Albert et Jore ,2005).**

***L'oxygène singuliet** ,avec une durée de vie trés courte et une extrème réactivité(**Maamari 2008).**

***Le radical pyroxyde** (ROO-) issu de substrats organiques.

Les ROS peuvent provenir de différents compartiment cellulaires ,parmi les quels ,la membrane plasmique ,le réticulum endoplasmique ,les péroxysomes(**Freeman et al 1981)** , en éffet la mitochondrie est la principale source des ROS avec une production de 90% des ROS (**Balaban et al 2005).**

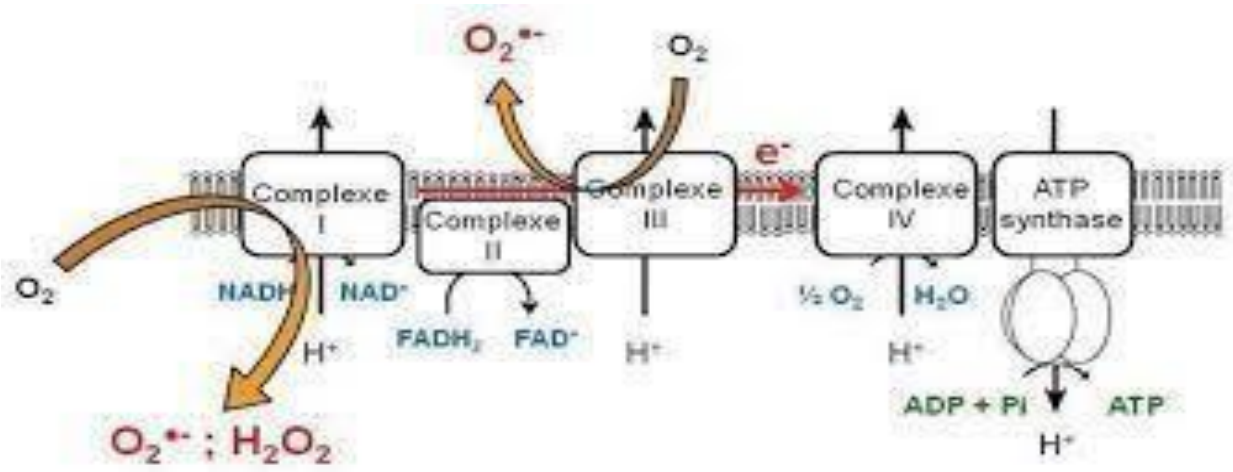


Figure 23 : REACTION DE FENTON ET REACTION DE HABER-WEISS**.(Valko M et al 2006).**

Il est imporant de noter que les éspèces réactives de l'oxygène n'ont pas uniquement des éffets nocifs ,mais elles jouent de roles physiologiques imporants, dans l'orientation des cellules vers l'appoptose ,la prolifération des muscles lisses ou la différentiation cellulaire (**Haleng J , et al 2007)** ,la défence de l'organisme par action toxiqu contre les bactéries , le porcéssus de fécondation et durant l'embiogenèse.

2.3 Défense antioxydant :

L'organisme dispose un ensemble de défenses antioxydants qui sont des substances présentes dans l'organisme en concentration relativement faible , capablent d'entrer en compitition avec des molécules oxydants , et par conséquant à retarder de façon signeficative ,ou d'inhiber l'oxydation des substrats **(Haleng et al 2007)** . On distingue deux sources des antioxydants ; L'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en ,vitamines Cet E, caroténoides , ... ; L'autre source est endogène ,est se compose d'enzymes (superoxyde dismutase , glutathion péroxydase ,catalase) et de proéines (ferritine , transférrine , albumine ...) , et de système de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases . A cela ajoutant quelques oligoéléments comme le séinium,le cuivre ,le zinc ,qui sont des co-facteurs d'enzymes antioxydants.

2.3.1 Défense enzymatique :

2.3.1.1 Superoxyde dismutase (SOD) :

Sont des métaloprotéines, présentent chez tous les etres aerobies, sauf quelques lactobacilles, représentent une des premières lignes de défense antioxydant . Il éxiste 3 types de SOD selon le co-facteur et la localisation, la Cu/Zn SOD1 dans le cytosle et le cytoplasme , la Cu/Zn SOD2 extracellulaire et la Mn SOD au niveau de mitochondrie .Les SOD assurent l'élimination de l'anion superoxyde d'oxygène **(Vameeq J et al , 2004)** ,par une réaction de dismutation . SOD3 est secrété par les cellules musculaires lisses et constitue un système antioxydant majeur de la paroi artérielle,son éxpréssion est augmenté par les facteures vasoactifs (histamine, endothéline 1, angiotensine 2) etdiminuée par l'homocystéine **(Haleng J, et al 2007)**

2.3.1.2 Le Glutathion :

Est un tripeptide, constitue de trois acides aminnées (acide glutamique , cystéine , glycine),un thiol (SH) majoritaire dans les cellules ,il protège ,les lipides ,les protéines et les acides nucléiques contre l'oxydation**(Stamler et al 1996)**

2.3.1.3 Glutathion Peroxydase

Le glutathion péroxydase est un sélénoprotéine ,avec quatre atomes de sélénium , il y'a cinq isoformes de GPX **(Couaillet L, 2015)** . Elle catalyse la réduction des hydropéroxydes en molécule d'eau ou d'alcool ,couplée à l'oxydation d'un substrat comportant un fonction thiol(glutathion) Le glutathion réduit GSH a un rôle principal, consiste à l'élimination des peroxydes lipidiques issus de stress oxydant **(Haleng J , 2007)**

Le glutathion sous sa forme oxydée régénère la glutathion réduite en présence de NADPH via l'intervention de glutathion réductase **(Vameeq J , et al 2004),** selon la réaction .Le glutathion est prédominant sous sa forme réduit, et le rapport glutathion réduit /glutathion oxydé dépend de la concentration des espèces oxydantes.

2.3.1.4 La catalase :

Elle présente essentiellement dans les péroxysomes, les érythrocytes ,les hépatocytes et les reins . La catalase ,catalyse la dismutation de péroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaure **(Haleng J ,et al 2007)** , selon la réaction **.**

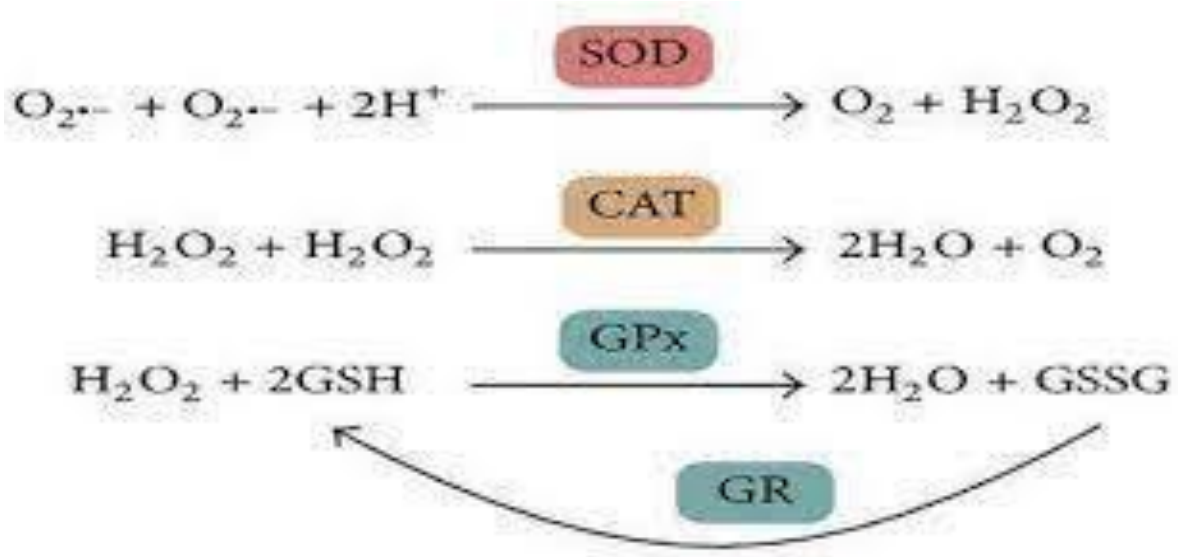


Figure 24 : La défense enzymatique **(Cheng Peng et al 2014)**

2.3.2 Les vitamines

A/ Vitamine C :

La plupart des mammifères synthétisent la vitamine C dans leur foie ,ou leur reis à l'éxception de l'homme ,qui doit apporter un apport alimentaire d'environ 100mg ,via une alimentation riche en vitamine C .Cette vitamine neutralise les ROS hydrosolubles comme ,le radical hydroxyle et le péroxyde d'oxygène (OH,O) et agit en synergie avec la vitamine E . Elle inhibe la péroxydation des lipides car elle permet la regénération de le vitamine E(alpha-tocophérol),impliqueé dans la synthèse de collagène , des globules ropuges , et dans les mécanismes de métabolisation de fer ,elle présente essentiellement , dans les agrumes **(Suuki A et al 2011) B/ Vitamine E :**

Est un ensemble d'isomères ,les tocophérols et les tocotriols , l'isomère principal est l'alpha tocophérol . C'est unantioxydant majeur, liposoluble , elle neutralise les radicaux libres organiques et diminue la péroxydation des lipides **(Evans 2000) .**

2.3.3 Les caroténoides :

La plupart des caroténoides ont une propriété antioxydante **(Causse2005)** . Les légumes et les fruits sont les pricipales sources alimentaires des caroténoides ,comme la lycopène ,pigment

rouge de tomate . Le chef de file des caroténoides est le béta carotène qui le précurseur de vitamine A . De plus il est suggeré que les caroténoides joue un role dans le prévention contre le diabète **(Suzuki A et al 2011) .**

2.3.4 Les oligoéléments :

Le cuivre, le zinc le manganèse ,le sélénium et le fer sont des oligoéléments **(Suzuki et al 2011) .** Le sélénium n'est pas un oligoélément en tant que tel mais joue le role de co-facteur de GPX ,le cuivre est un co-facteur de l'enzyme antioxydante SOD , le zinc est un co-facteur de nombreuses enzymes de métabolisme nucléaire ,co-facteur de SOD ,la catalase besoin de fer **(Vincent et al 2006) .**

2.4 Conséquences de l'hyperproduction des radicaux libres :

Le role des ROS dans l'apparition des dommages intra et /ou éxtra cellulaire a été démontré depuis longtemps . Les radicaux hydroxyle sont les plus dommageables en raison de leur éxtrème réactivité ,les radicaux superoxydes sont aussi réactifs vis àvis la majorité des substrats , ces dommages sz traduit par l'oxydation de l'ADN ,des protéines , des lipides et meme la mort cellulaire **(Boutaber 2007) .**

***ADN** : Les cassures des brins , les pontages intra et iner brins , les mutations au sein de la molécule de l'ADN (bases puriques et pyrimédiques),sont induitent par les ROS**(Wang et al 2007**)

.La guanine par exemple peut réagire avec le radicale hydroxyle pour former la 8-hydroxy-2-désoxyguanosine qui s'associe à l'adénine au lieu de cytosine entrainant ainssi des mutations au sein de l'ADN impliquées dans le cancer et le veillessement .

***PROTEINES :** Les ROS réagissent avec certains acides aminées(AA) in vitro produisant ainsi des protéines modifiées , et non fonctionnelles ,qui pouraient en outre etres résponsabes de stress oxydant **(Asatullah A ,et al 2015**) .Les AA les plus réactifs sont sont l'histidine , la proline , la tryptophane la cystéine et la tyrosine , l'intéraction ROS-AA entraine la formation d'un groupement carbonyl .Le dosage des protéines carbonylés est un marqueur de stress oxydant in vivo et in vitro **(Donne et al 2006 ,Cevionh et al 2000) .**

***Les lipoprotéines** : Les lipoprotéines sont des composés hydrosolubles constitués de l'association

entre les lipides et les protéines ,qui transportent les lipdes dans l'organisme . L 'intéraction entr les ROS et les lipoprotéines à faible densité LDL donne naissance à des LDL oxydés facilement captés par les macrophages , ces dernières sont transformés en cellules spumeuses **(Nakijimi K et al 2006)**

, de plus les LDL oxydés sont immunogènes et entraines l'activation de la voie classique de compliment et génèrent la sécrétion des cytokine proinflammatoires par les macrophages **(Saad et al 2006) .**

***Les lipides membrannaires** : L'oxydation des lipides membrannaires (phospholipides) modifie la structure chimique de la membrane cellulaire ,la péroxydation des lipides se fait sur des acides gras polyinsaturés (AGPI) ,tels que les acides linoléique , l'acide linolénique ,et l'acide arachidonique ,et entraine l'altération de la fluidité de la membrane plasmique ,qui conduit à la mort cellulaire ,si la péroxydation n'est pas neutralisé par le glutathion péroxydase

2.5 Stress oxydant et diabète :

Le diabète est un désordre métabolique caractérisé par une hyperglycemie et une perturbation des métabolismes glucidique, lipidique et proteique, causée par une défiscience de sécrétion et /ou de l'activité de l'insuline. Un état de strèss oxydant à été décrite dans le diabète ,il s'ajit d'un déséquilibre entre la production des éspèces réactives de l'oxygène et les défenses antioxydants (**Bonnefont-Rousslot D 2002,Laight DW et al 2000) .** Ce strèss pourait etre impliqué dans les atteintes tissulaires (**Betterridge DJ 2000**).

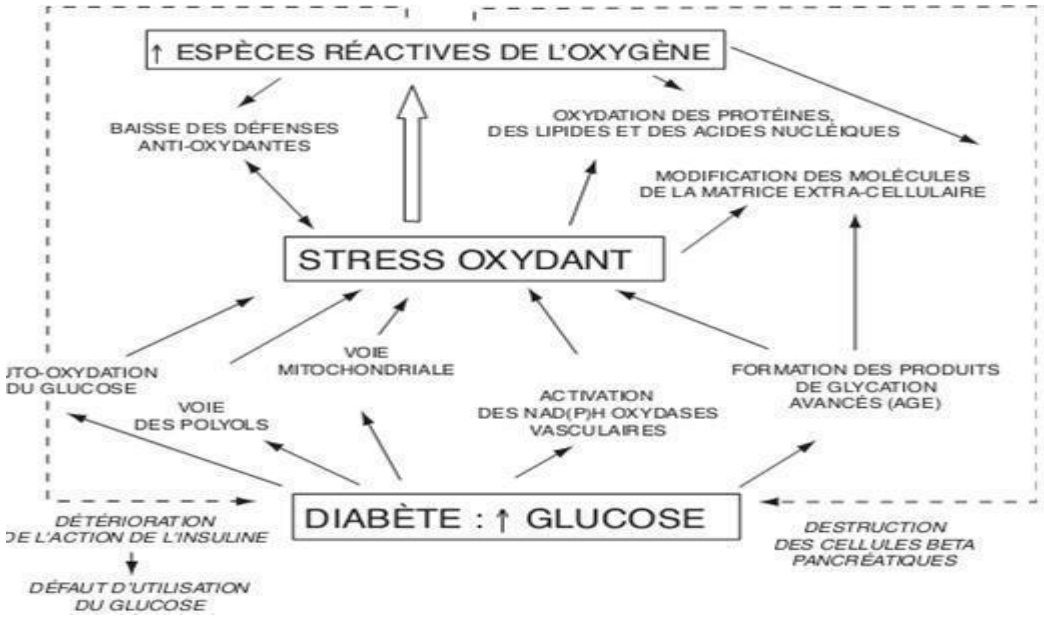


Figure 25: Diabète et strèss oxydan **(Bonnefont-Rousselot et al 2004).**

2.5.1 Hyrperglycemie chronique et strèss oxydant :

Plusieurs mécanismes peuvent etres impliqués dans la génèse d'un strèss oxydant dans les conditions d'hyperglycemie chronique ,l'auto-oxydation de glucose, la surproduction des radicaux superoxydes par la chaine résperatoire mitochondiale, et par l'activation de NAD(P)H oxydase vasculaire ,voie des polyols et la formation des produits avancés de de glycation non enzymatique(AGE)**(Bonnefont-Rousselot D,et al 2004).**

La majorité d'énergie est produite par la chaine réspératoire de transfert des éléctrons mitochondriale. L'oxygène que nous rispirons est réduit en molécules d'eau par l'intermédière de protéines de quatre complexes enzymatiques localisés dans la membrane mitochondriale interne,**(figure 25)**

Cette réaction est catalysée par le cytochrome C oxydase présente dans le complexe quatre de la chaine de transport des éléctrons ,elle conduit à la formation d'énergie (ATP) (**Couaillet L ,2015**). Cependant 2% de l'oxygène n'est pas réduit en H2O, il est transformé en éspèces oxygénées réactives ,cette transformation est normale chez tout les etres aerobies ,mais elle est accrue en présence de forte concentration de glucose (**Nishikawa T et al 2000**). Au niveau des deux cites de la chaine réspératoire ,la NADH désydrogénase du complexe 1 et l'interface entre l'ubiquinone et le complexe 4 ,ces radicaux sont susceptibles d'indure la synthèse de diacyle glycérol ,ou l'hydrolyse de phosphatidylcholine ,activant ainsi la PKC **(Bonnefont-Rousslot D et al 2004) .** La NADH désydrogénase de la membrane mitochondriale interne des cellules endothéliales vasculaires ou les cellules musculaires lisses sont capables de produire des ERO(**Jones D et al 2000**) .De forte concentration de glucose va conduire à la production des ERO via l'activation de NAD(P)H oxydase par une voie dépendante de PKC. Concernant la voie des polyols la production de sorbitol à partir de glucose fait intervenir le NAD(P)H qui est nécéssaire à l'activité des aldoses réductases .Une faible concentration intracellulaire de NAD(P)H à pour conséquence, une faible concentration de glutathion réduit à partir de glutathion oxydé ,ainsi, la synthèse de monooxyde d'azote par le NAD(P)H est diminue ,car le NAD(P)H est un co-facteur de NO-synthase qui synthétise le NO à partir de L-arginine.Cette diminution peut etre impliquée dans les complications vasculaires de diabète **(Bonnefont-Rousslot D et al 2004)**.De plus le sorbitol est oxydé en fructose avec réduction de NAD+ en NADH +H+ ,le fructose et le sorbitol conduisent à un oedème oculaire ce qui éxplique que la voie des polyols joue un role clé dans l'apparition des complications de diabète (**Packer et al 2001**).

Une autre source des éspèces réactives de l'oxygène est la production des AGE**(Singh R et al 2001),**qui consistent à une glycation non enzymatique des proteines .

2.5.2 Diabète type 2 et hyperproduction des radicaux libres :

Le strèss oxydant est un élément de liaison entre l'insulino résistance ,l'hypertention ,le syndrome métabolique et les complications cardoivasculaies(**Ceriéllo A 2006**) au niveau cellulaire , chez les diabétiques type deux le glucose et les acides gras en éxcés induisent la production des éspèces réactives de l'oxygène , particulièrement l'anion superoxyde d'oxygène ; De plus au niveau des muscles et des adipocytes , le fonctions des transporteurs de glucose (GLUT4), dont l'expréssion est insulinodépendante est altéré , et leur nombre réduit cette réduction contribue aussi à la résistance à l'insuline et à l'hyperglycemie.

L'atteinte mitochondriale (en particulier l'ADN mitochondriale) apparait comme un élément clé , car, l'analyse des biopsie musculaires , et la résence magnétique nucléaire ont montré une

réduction de la masse des mitochondries chez les diabétiques type 2 ,la fonctionnalité du mitochondrie est alterée ce qui éxplique la production des ERO (**Bordenave S et al 2008**). D'autres travaux ont montré que la dysfontion mitochondriale s'associe à des chengements de de fonction et de l'éxpréssion de protéine découplante (qui diminue la production d'énergie)de la membrane interne l'UCP-2(Uncoupling protein-2) en condition d'hyperglycemie (glucotpxicité) .UCP-2 est suréxprimée ce qui diminue à la longue l'insulinosécrétion induite par le glucose dans les cellules béta du pancréas(**Gable DR et al 2006)**

L'oxydation du glucose en présence de fer , et aussi une source de strèss oxudant cette réaction forme les ERO et la forme aldéhyde de glucose ,le glyoxal . Cette molécule se fixe rapidement sur les protéines , dans les quelles apparit un résidus carboxyméthyllysine ,ce qui déclanche des réactions de production des radicaux libres (réaction de fenton)(**Wautier MP et al 2003**).

Le glucose réagit avec les groupements amines des protéines pour former des produits avencés de la glycation (AGE) ,qui jouent un role éssentiel dans le dévloppementdes complications de diabète(**Hudson BI et al 2005**). Les AGEs plasmatiques se fixent sur des récepteurs cellulaires spécifiques (RAGE) , des cellules endothéliales , glomérulaires , et des macrophages ,cette fixation déclanche les réactions de production des ERO et l'activation de NFKB .

Le taux élevé des acides gras libres (AGL) circulants est fortement lié à l'insulinorésistance (lipotoxicité) , car les défauts de métabolisme d'insuline favorise la lipotoxicité ,une diminution de captage et hyperproduction hépatique de glucose ,tous ces facteurs favorisent la production des ERO .

2.6 Hyperglycemie chronique et AGE :

La réaction de glycation (glycosylation non enzymatique) a été décrite pour la première fois par MAILLARD en 1912 ,elle consiste à une réaction non enzymatique de glucose avec les protéines ,généralement au niveau des fonctions N-terminal des résidus lysines des chaines polypeptidiques ,et donne naissance à des protéines glyquées . La quantité des protéines glyqueés est proportionnelle avec la quantieé de sucre dans le plasma , la glycation concerne l'albumine , l'hémoglobine , le collagène , les immunoglobulines , les LDL ....., et aboutissant à la formmation des AGEs(**Kennedy AL et al 2008**),et se déroule en trois étapes :

a-Formation de base de schiff instable par combinaison de fonction aldéhyde de glucose avec fonction amine de protéines ,principalement N-terminal de lysine .

b-Réarengement moléculaire conduisant à la formation d'une liaison cétonique stable ,aboutissant aux produits d'amadori , l'Hba1C (hémoglobine glyqué) et les fructoses amines sont deux produits caractéristiques d'amadori (**Gilly D et al 1998)** . Ces produits intermédiaires peuvent etre réduit en métabolites inactifs par une réductase.

c-Produits de MAILLARD ou produits de glycation avencées (AGE) ,sont le résultat d'intéraction

entre les prouits d'ammadori **(Bonnefont-Rousselot et al 2004)** , les AGEs résultent d'un ensemble de réaction d'oxydation ulterieur s'accumulenent dans les cellules , leurs traits biochimiques principaux sont , les piguementations brunes .La formation des AGEs est une source de ROS (**Kennedy AL et al 2008)** . Thalls-Bonke et al a démontré que la fixation des AGEs sur des récépteurs spécifiques (RAGE) provoque la formation des radicaux libres via l'activation de NADPH oxydase.

2.7 Effets des AGE sur la matrice extracellulaire, les protéines circulants et cellulaires

Au niveau éxtracellulaire les AGE vont altérés les propriétes fonctionnelles et structurales des protéines de la matrice extracellulaire ,en particulier le collagène ce qui entreine la régidité de ce dernier avec création des réactions croiseés entre ce dernier et les protéines solubles tels que l'albumine, les LDL, et les immunoglobulines (IGg) .Au niveau cellulaire la liaison des AGE avec des récépteurs spécifiques(RAGE)(**Schnidt AM ,et al2000)** induit la production des cytokines proinflammatoires tels que IL1, IGF ,TNF alpha ,au des cellules endothéliales cette fixation favorise la coagulation**(Bonnefont-Rousselot D ,et al 2004)** en diminuant la trambomoduline . L'élévation rapide des AGE à l'inerieur des cellules conduit à l'altération des protéines de fonctions .

Chapitre 03 :
Matériels et méthodes

Chapitre 03 : Matériels et méthodes

Etude expérimentale :

Toutes les expérimentations ont été réalisées au niveau de laboratoire de recherche Biologie et pharmacologie expérimentale.

Objectif de l'étude

Notre étude est la suite d'une étude qui été initié l'année précédente dont le but été d'optimiser un modèle animal de diabète de type II induit par un régime hyper lipidique chez les souris NMRI. L'objectif de l'étude est de mesurer les paramètres de stress oxydatif au niveau du foie, pancréas et tissues adipeux viscérale, et d'observé les lésions histologiques au niveau de ces organes.

1. Matériels

1.1 Les produits chimiques

Chloroforme, Formol, Alcool à déférente concentration ,Xylène , Pbs , Bard ford , SDS ,TBA ,Acide acétique , H2O2 , Tampon phosphate , Acide Sulfosalicylique ,Tampon Tris EDTA , DTNB , CDNB , GSH , TBS , TCA , Tris Hcl , Pyrogallol .

1.2 Matériel biologique :

Notre travail a porté sur les souris males, de souche **NMRI** (Naval Médical Research Institute), provenant de l'institut pasteur d'Alger. L'utilisation de souris mâles nous a permis de minimiser les perturbations du métabolisme liées aux variations hormonales retrouvées chez les souris femelles.

Les souris ont été maintenus dans les conditions standards à température et humidité contrôlées (25 °C et 55 %), soumis à un cycle lumière/obscurité (12:12, h/h) pour le respect de leur horloge biologique.



Figure 26 : Souris NMRI utilisé dans l'expérience **(photo originale).**

2. Constitution des lots :

Les souris sont réparties en 02 lots suivant le régime consommé. Les différents lots sont soumis à 2 régimes différents, soit le régime standard (ONAB El Kseur) soit un régime hyper lipidique, selon le protocole suivant ***(Tableau 1)*** :

Lots	Régime consommé	Préparation
Lot 1 Control	Régime standard	100% régime standard + l'eau
Lot 2 RHL	Hyper lipidique	64% de lipides + 24% de carbohydrates + ?

Tableau 1 : La constitution des lots

Après une phase d'adaptation, les souris ont été répartir en deux lots soumis à des régimes alimentaires différents pendant 16 semaines :

- Le 1er lot (**Control**): reçoit un régime standard ONAB (régime témoin) et l'eau ad libitum.
- Le 2eme lot (**RHL**): reçoit un régime hyper-lipidique dont 64% des provient de la graisse et 24% des carbohydrates.

3. Conditions d'élevage :

Les souris sont élevées dans l'animalerie de l'université de Médéa pendant 4 mois à une température ambiante 25 C, et une photopériode 12h de jour/ 12 h de sombre. L'aliment est donné sous forme des boules à raison 15g/souris/jour, l'eau est donné ad libitum. Au cours de l'expérimentation, le poids et la glycémie ont été mesuré une fois chaque semaine, à l'aide d'une balance de précision et un glucomètre **(Vital check)** respectivement.

4. Sacrifices et prélèvement des organes :

Les souris mis à jeun la nuit ont été sacrifié par euthanasie en utilisant le chloroforme. Le sang a été prélevé par ponction cardiaque à l'aide d'une épicrânienne et immédiatement recueilli dans deux tubes étiquetés, l'un héparine et l'autre contient l'EDTA comme anticoagulant. Les tubes sont centrifugés à 3000 tours/minute pendant 15 minutes, le plasma a été récupéré et conservé à -20°C pour des études ultérieures.

Les tissus (pancréas, foie, reins et le cerveau) ont été prélevés immédiatement pour éviter toute détérioration. Un fragment des tissues de chaque lots est fixé au formol 10% pour l'étude histologique et d'autres fragments sont congelé immédiatement dans l'eau physiologique à -20 pour le dosage des paramètres de stress oxydant (MDA, GSH, , GSH-Px, GSH-ST, CAT).



Figure 27 : Le matériel utilisé dans le sacrifice et l'animal sacrifie **(photo original).**

5. Traitement des organes :

5.1 Technique histologique :

Pour étudier l'apparence structurale comparée des coupes de paraffine (technique histologique) ont été effectuées sur le foie et le pancréas ainsi que sur les tissus adipeux recueillis chez les souris.

5.1.1 Préparation des tissus pour coupes en paraffine :

Cette technique permet d'étudier la structure du foie, du pancréas et des tissus adipeux dans des conditions expérimentales. Les étapes à suivre sont les suivantes **: A. Fixation :**

Une fois prélevés, les parties des organes sont fixées par immersion dans un formol à 10 % pour l'examen histologique. Ensuite, les pièces doivent être lavées à l'eau courante jusqu'à ce que l'eau de rinçage soit claire (environ 15 min) pour éliminer toute trace de liquide fixateur.

B. Déshydratation :

Le but de cette opération consiste à retirer toute l'eau des organes. Ceci se fait graduellement en passant les pièces graduellement dans des bains d'alcool à des degrés croissants :

- 70° pendant 20 min
- 90° (I) pendant 10 min
- 90° (II) pendant 10 min
- 100°(I) pendant 15 min
- 100° (II) pendant 30 min

Chacun à température ambiante. Par la suite, les organes ont été mis dans un bain de xylène pendant 10 min.

C. Imprégnation :

Elle consiste à préserver les organes dans des blocs solides, afin que l'échantillon soit déshydraté, l'imprégnation se fasse dans 2 bains de paraffine pure (1 heures et demi pour chacun) dans l'étuve à 56°C.

D. Inclusion :

Les organes traités, ont inclus dans de paraffine pure. Cette opération est effectuée à l'aide de barres Leuckart placées de manière à former un moule dans lequel la paraffine fondue sera versée. Quand la paraffine commence à durcir sur les bords, on saisit l'organe avec une pince,

Puis on remplit le reste de paraffine. Après le refroidissement, on mit les blocs dans le réfrigérateur (de 12 à 24h).

E. Confection des coupes et étalement :

Le bloc est ensuite fixé sur le microtome (lieca) afin que les bords des faces soient parallèles à ceux du rasoir. Des coupes de 3 à 5 µm d'épaisseur sont ramassées sous forme de ruban recueilli à l'aide de pinces dans un bain-marie préchauffé à 40 °C. Contenant de l'eau distillée, puis les rubans sont répartir sur les lames et séchés sur une plaque chauffante à 40 °C.

F. Déparaffinage et réhydratation :

Les coupures exigent de la réhydratation. Elle débute par un déparaffinage dans un bain de xylène pendant 5 min, puis la réhydratation effectuée en passant par des bains d'alcool à des degrés décroissants (100°, 96°, 70°) pendant 2 min pour chaque, et rincer à l'eau distillée pendant 2 minutes.

G. Coloration des coupes :

La coloration topographique à l'hématoxyline éosine (HE) permet de colorer les noyaux en bleu ou violet et le cytoplasme en rose, la coloration (HE) se fait par le passage des lames dans un bains d'hématoxyline pendant 2 min après on rincé avec l'eau de robinet et on mit la lame dans un bain de l'éosine pendant 30 seconds. Par la suite en rincer les lames avec l'eau distillée.

H. Montage et observation :

Après la coloration on déshydraté encours une fois par le passage dans l'alcool (70°, 96°, 100°) et suivis d'un bain de xylène pendant quelque secondes. Puis à l'aide d'un baume d'inclusion (Eukit), on monté les lamelles sur les lames et on les observé et photographiées avec un microscope (Zeiss, Jena, Germany).à un grossissement croissent.

5.2 Evaluation des marqueurs du stress oxydant au niveau tissulaire:

5.2.1 préparation de l'Homogénat :

100 mg de chaque tissu ont été mis en présence de 1 ml de solution Pbs ,puis ont été broyés à froid pendant 30 sec à l'aide d'un homogénéisateur pour obtenir un homogénat. L'homogénat tissulaire obtenue est centrifugé à 6000 trs pendant 15min à 4°C. Le surnageant ainsi obtenu est recueilli et utilisé pour l'estimation de

5.2.2 Dosage des protéines tissulaire :

Principe :

la concentration de protéines est déterminée selon la méthode de Bradford
(1976) qui utilise le bleu de Coomassie (G 250) comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines (–NH2) des protéines pour former un complexe de couleur bleu. (L'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines).

Mode opératoire :

- Prélever 50 ml de l'homogénat.
- Ajouter 2 ml du réactif de Bradford.
- Agiter et laisser reposer 5 min.
- Lire la densité optique à 595 nm, contre le blanc

Calcule de la concentration des protéines :

La densité optique obtenue est rapportée sur une courbe d'étalonnage préalablement tracée. La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (1 mg/ml) réalisée dans les mêmes conditions.

NB : On note que le dosage de plusieurs paramètres est mesuré par apport à 1 mg de protéines.

5.2.3 Dosage du malondialdéhyde (MDA)

Principe :

Le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des Acides gras polyinsaturés (PUFA) médiées par les radicaux libres. Dans notre étude, les taux du MDA hépatique et rénal ont été évalués selon la méthode d'Ohkawa *et al.* (1979).

Le dosage repose sur la formation en milieu acide et chaud (100 °C) entre le MDA et L'acide thiobarbiturique (TBA) d'un pigment coloré absorbant à 530 nm, extractible par ; les solvants organiques comme le butanol.

Mode opératoire :

- Prélever 0,1 ml de l'homogénat. Sauf que dans le tube blanc remplacer l'homogénat par 0.1 ml l'eau distillé
- Ajouter 0.1 ml de dodécylsulfate de sodium (SDS)
- Ajouter 0,75 ml d'acide trichloracétique (TCA) 20 %.
- Ajouter 0.75 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 1 %.
- Mélanger et incuber au bain marie à une température de 90 °C pendant 1 h
- Refroidir dans un bain de glace pour arrêter la réaction et additionner de 2 ml d'acide acétique (TCA) 10%
- Centrifuger pendant 15 minutes à 1000 g
- Récupérer le surnageant, et lire la densité optique à 530 nm contre le blanc.

Calcule de la concentration du MDA :

Le MDA est calculé par la formule suivante :

[Malondialdéhyde] en µmol/L= DO / ε.x.l

- **DO** : Densité optique
- **ε :** coefficient d'extinction $1,56*10^5$
- **x :** Quantité de protéine en mg/ml.
- **l** : le trajet (longueur de la cuve) qu'est égale à 1cm.

5.2.4 Dosage de l'activité enzymatique du catalase (CAT)

Principe :

La méthode utilisée dans le dosage de l'activité enzymatique du CAT est celle d'Aebi (1984). La CAT catalyse la destruction du peroxyde d'hydrogène en eau et en Oxygène. L'activité du CAT a été mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du H2O2 à une incubation de 25 °C.

Mode opératoire :

Réactif	Blanc (ml)	Essai (ml)
Tampon phosphate (0,1 M) pH 7,5	**1.9**	**1.9**
H2O2 (0,5 M)	**1**	**1**
Homogénat	**-**	**0.02**

Tableau 02 : Mode opératoire de la mesure de CAT On note que :

- Le zéro de l'appareil est réalisé par le tampon phosphate.

- La quantité de l'homogénat doit être déterminée en fonction de la quantité de

Protéines qui doit être comprise entre 1 et 1,5 mg/ml, soit une quantité de 10 à 20 µl de dilué.

- L'activité décroît rapidement, il est important de mettre toujours le même temps de

Pipetage et le moment où on place la cuve au spectrophotomètre.

- La lecture de l'absorption se fait après 15 secondes de délai et durant 60 secondes de mesure.

Calcule de l'activité enzymatique du CAT :
L'activité enzymatique de la CAT est calculée par la formule suivante :

$$\text{Activité CAT (umol H2O2\ min \ mg protéine)} = \frac{DO}{\varepsilon \times L \times X}$$

- **DO :** Variation de la densité optique par minutes.
- **ε :** Coefficient d'extinction du H2O2 (0,04 mM-1. Cm-1).
- **L** : Largeur de la cuve ou longueur du trajet optique (1 cm).
- **X :** Quantité des protéines en mg/ml.

5.2.4 Dosage de glutathion (GSH) :

Principe :

Le dosage du glutathion a été réalisé selon la méthode de Weckbecker et Cory (1988). Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5 mercapturique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5'-dithiobis- 2- nitrobenzoïque (réactif d'Ellman, DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Pour cela une déprotéinisation de l'homogénat est indispensable afin de garder uniquement les groupements thiol spécifiques du glutathion

Mode opératoire :

- Prélever 0,2 ml de l'homogénat.
- Déprotéiniser en ajoutant 0,05 ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) 0,25%
- Agiter le mélange et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 min.
- Récupérer 0,25 ml du surnagent.
- Ajouter 0.5 ml du tampon Tris-EDTA

- Mélanger et ajouter 0,0125 ml de DTNB
- Laisser pendant 5 min à température ambiante pour la stabilisation de la couleur qui se développé instantanément.
- Lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc.

Calcule de La concentration :

La concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante :

[GSH] (nm GSH\ mg protide) = DO x 1 x 1,525) \ 13100 x0,8 x0,5 x mg protide)

- **D0** : Densité optique.
- **1 :** Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8mL homogénat +0,2 ml de l'acide salicylique).
- **1,525:** Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0,5 ml surnageant +1 ml Tris + 0,025 ml DTNB).
- **13100** : Coefficient d'absorbance du groupement –SH à 412 nm.
- **0,8** : Volume de l'homogénat.
- **.0,5** : Volume du surnageant.

5.2.6 Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GSH-ST) :

Principe :

La mesure de l'activité des GSH-ST a été réalisée par la méthode de Habig *et al.* (1974), celle-ci consiste à fournir à l'enzyme un substrat en général du 1-chloro, 2,4- dinitrobenzène (CDNB), qui se conjugué facilement avec glutathion sous l'action de nombreuses formes de GSH-ST. La réaction de conjugaison de ces deux produits entraîne la formation d'une molécule nouvelle qui absorbe la lumière à 340 nm de longueur d'onde

Mode opératoire :

La méthode utilisée dans cette étude consiste à faire agir les GSH-ST

Contenues dans l'homogénat sur un mélange (GSH + CDNB) à une température de 37 °C et à un pH de 6,5. La variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée pendant 1 minute durant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm.

Réactifs	Blanc	Essai
Tampon phosphate (0,1 M) pH 6,5	850	850
CDNB (0,02 M)	50	50
GSH (0,1 M)	100	100
Homogénat (ml)	-	20

Tableau 03 : Le mode opératoire de la mesure de GSH-ST

Calcule de l'activité enzymatique de la GSH-ST :

L'activité enzymatique de la GSH-ST est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GST (nmol GST \min\mg protéine)} = \frac{\text{(DO échantillon \ min – DO Blanc \ min)}}{\text{9.6 mg protéine}}$$

- **DO** échantillon/min : Densité optique de l'échantillon par minute.
- **DO** blanc/min : Densité optique du blanc par minute.
- **9,6 :** Coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en mM -1. Cm-1.

5.2.7 Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GSHPx) :

Principe :

L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH-Px) a été mesurée par la méthode de Flohé et Günzler (1984). Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H2O2) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la

GPx selon la réaction suivante : $H_2O_2 + 2\ GSH \longrightarrow GSSG + 2\ H_2O$

1.Mode opératoire :

Réactif	Blanc	Essai
Homogénat (ml)	-	50
GSH (ml)	100	100
TBS (ml)	50	50

Tableau 04 : mode opératoire de la mesure de GPx

1. Incuber au bain marie à 25°C, pendant 10 min.
2. Ajouter 50 ml de H2O2 pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes.
3. Ajouter 50 ml de TCA (1 %) pour arrêter la réaction
4. Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes

5. Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours / 10minutes.
6. Prélever 0,24 ml du surnageant.
7. Ajouter 1.1 ml de la solution tampon TBS.
8. Ajouter 0,16 ml de DTNB (1 mM).
9. Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 420 nm contre le blanc.

Calcule de l'activité enzymatique de la GSH-Px :

La détermination de l'activité enzymatique de la GSH-Px se fait à l'aide de la formule suivante :

$$X = \frac{(DO\ échantillon - DO\ étalon) \times 0{,}04}{DO\ étalon}$$

$$\textbf{GPX (umol GSH \ mg protéine = Quantité GSH disparu} \times \frac{5}{[\ ]\ \textbf{de protéine}}$$

- **X :** Quantité de GSH réduit disparu (oxydé) dans 0.2 ml extrait dans 1 ml
- **DO échantillon :** Densité optique de l'échantillon
- **DO étalon** : Densité optique de l'étalon
- **0,04 :** Concentration de substrat (GSH)

5.2.8 Dosage de SOD :

Mode opératoire :

Réactifs	**Blanc (ul)**	**Essai (ul)**
Tris HCL(50 Mm ,PH :8.2)	**200**	**200**
Pyrogallol	**50**	**50**
Homogénat	**-**	**50**
Eau distillé	**500**	**400**

Tableau 05 : Mode opératoire de la mesure de SOD

Le changement de l'absorption est mesuré à 470 nm après chaque minute dans un intervalle de temps 3 min

Calcul :

$$\textit{Inhibition totale} = \frac{\textit{DO du blanc} - \textit{DO d'échantillon}}{\textit{DO Blanc}}$$

$$\textit{U de SOD \ mg de protéines} = \frac{\textit{Inhibition totale}}{N*50}$$

N : mg de protéines présentes dans le volume de l'échantillon utilisé.

5.2.9 Etude statistique :

Les résultats sont présentés en moyenne ± écart type. Les analyses statistiques sont réalisées grâce au logiciel GraphPad Prism (v. 8.00 for Windows. San Diego. CA). Les différences entre les groupes sont analysées grâce au t-test de Student. $P<0,05$ est considéré comme statistiquement significatif.

Chapitre 04 :
Résultats et Discussions

Chapitre 04 : Résultats et Discussions

1) Induction de diabète :

L'induction de diabète par un régime hyper lipidique chez les souris NMRI., pendant une période de 16 semaines (4 mois), est réalisée avec succès. Ceci est confirmé l'année passée par la mesure de la glycémie et le suivis du poids corporel chez les souris avec le régime hyper lipidique par apport aux souris avec un régime standard.

1.1) Evaluation du poids corporel :

Figure 28 : L'évolution pondérale des souris pendant 16 semaines. Contrôle **:** groupe des souris qui soumissent au régime standard, **HFD :** groupe des souris nourries au régime hyper lipidique.

Chaque valeur représente la moyenne , L'analyse statistique est effectuée par le test T, **(P< 0,05).**

Grace au suivi continue de l'évolution du poids corporel (PC) chez les deux groupes de souris pendant 16 semaines nous il été possible de dresser un graphe représentatif de l'évolution pondérale des souris:

1.2) Evaluation de la glycémie :

Figure 29 : . Variation de la glycémie chez le groupe témoin et le groupe RHL. Comparaison avec groupe témoin *p < 0.05

L'évolution de la glycémie chez les deux groupes est présentée dans ce graphe :

Il a été remarqué une augmentation significative de glycémie chez le groupe RHL à partir la 7 ème semaine, cette augmentation est poursuivie pour atteindre 189 mg\dl à la fin de l'expérimentation, en comparaison avec les contrôles il y a une stabilisation de glycémie entre 100 et 132 mg\dl durant les 16 semaines. Ce qui confirme l'installation de diabète chez le groupe HFD.

2) Analyse des paramètres de stress oxydatif

Tous les paramètres de stress oxydant sont mesurés sur un homogénat (surnagent), obtenus après le broyage et centrifugation des tissus congelés à -20°C. Nous avons mesuré les paramètres pro-oxydant (MDA), et des paramètres anti-oxydants (SOD, GSH, GPx, GST et CAT) au niveau du foie, pancréas et tissu adipeux.

2.1) Au niveau du pancréas :

Le contenu pancréatique en MDA et la variation de l'activité de certaines enzymes antioxydantes au niveau du pancréas des souris témoins et celles soumises au régime hyper lipidique sont résumés dans **la figure 30**

A partir de ces résultats on remarque qu'il y a une augmentation significative (p = 0,0010) de de l'activité de MDA au niveau du pancréas chez le groupe RHL (HFD) comparativement aux groupe

témoins, **(Figure A**). En revanche à cette augmentation en peroxydation lipidique, nous avons remarqué une diminution significative du glutathion hépatique (GSH) qui atteint une valeur moyenne **Figure B)**.

Et une réduction d'environ 53% de l'activité de l'enzyme GST par rapport aux souris contrôles **(Figure C).** Une réduction significative de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) a été observé chez les souris de groupe HFD (environ 87 %) ($p = 0,01$) en Comparaison avec le groupe contrôle.

2.2) Au niveau le foie :

Les résultats obtenus montrent une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) de la teneur hépatique en malondialdéhyde (MDA) comparativement aux souris témoins **(Figure A).** Parallèlement à cette peroxydation lipidique, nos résultats montrent que l'institution prolongée de la diète hyper lipidique provoque un effondrement du glutathion hépatique (GSH) **(Figure B),** et une chute d'environ 59% de l'activité e l'enzyme GPx par rapport aux souris contrôles **(Figure C).**

De plus, Après quatre mois d'expérimentation, l'activité spécifique de la Superoxyde dismutase (SOD) attient une diminution d'environ 75 % comparativement à celle enregistrée chez les contrôles correspondants ($p \leq 0,001$) **(Figure D).** Et un déclin de l'activité de la catalase (Cat) a été observé chez groupe expérimental par un pourcentage d'environ 68% par rapport aux souris contrôles**. (Figure F)**

2.3) Au niveau le tissu adipeux :

Une augmentation hautement significative de MDA (P< 0,01) a été observée chez le groupe des souris avec RHL **(Figure A).** Nous avons dosé également, le glutathion au niveau de tissus adipeux, et les résultats sont représentés dans l'histogramme de GSH, qui montre une diminution significative de la concentration tissulaire de tissu adipeux en GSH **(Figure X B).**

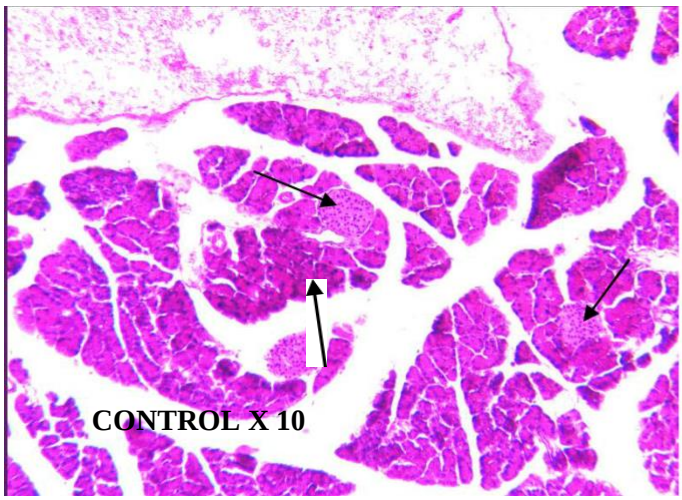
Une autre diminution hautement significative de la concentration tissulaire de tissu adipeux en catalase (P< 0,001) a été remarquée chez les souris avec. De plus le dosage de super-oxyde dismutase (SOD) nous a permis de constaté une chute d'environ 82% par rapport le groupe témoin **(Figure C)**. Le glutathion transférase (GST), représente aussi une diminution significative pour le lot avec RHL

3. Etude Histologique :

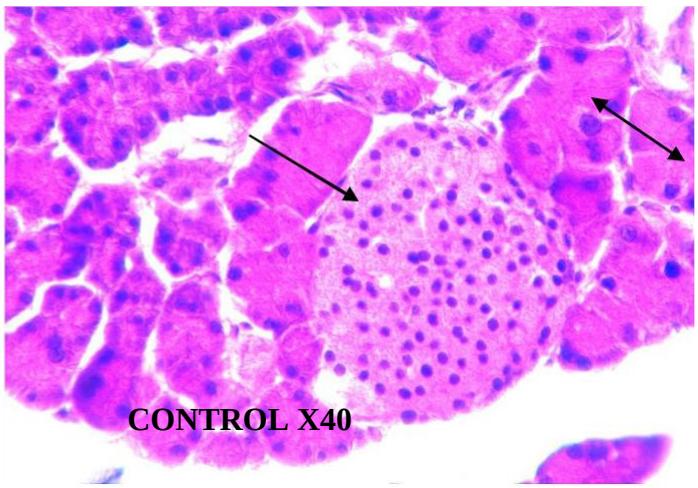
3.1) Aspect histologique du pancréas des souris témoins et celle soumise au régime hyper lipidique (RHL) :

Les souris contrôles présentent un parenchyme exocrine et des îlots de Langerhans qui correspondent à la glande endocrine. La forme des ilots est souvent ovale ou légèrement allongée **(A, B),** ces ilots sont séparés du parenchyme exocrine par une fine couche de cellules conjonctives. La partie exocrine est constituée d'unités sécrétrices : les acini.

Chez souris soumise au régime riche en lipides polyinsaturés, nous avons observé des modifications structurales spectaculaires au niveau des îlots de Langerhans comparativement au pancréas de l'animal témoin. Ces modifications se manifestent par des îlots de Langerhans hypertrophiés **(C, D)**

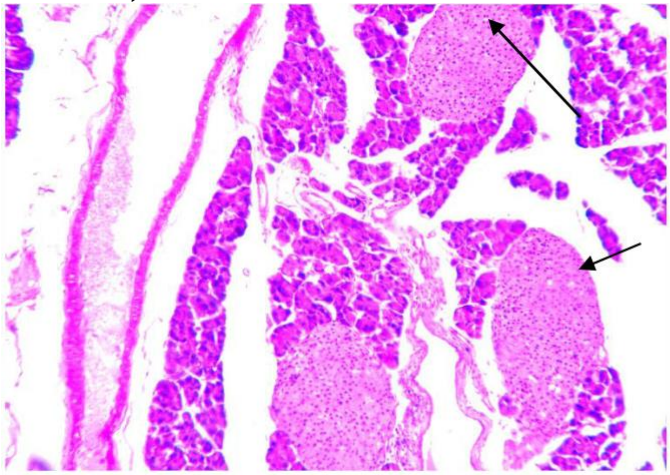


CONTROL X 10

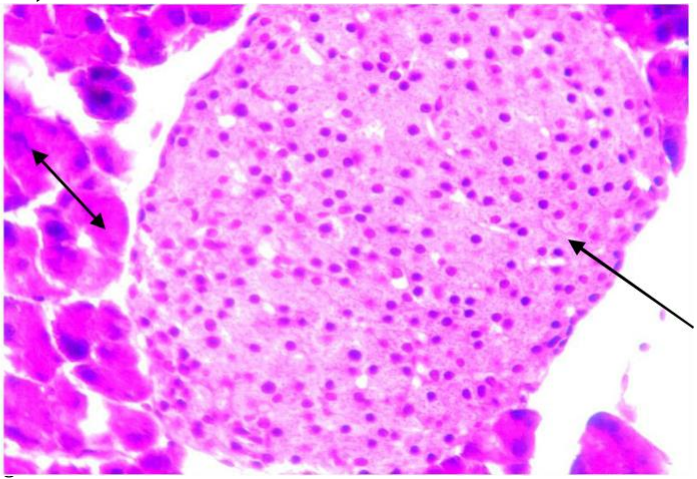


CONTROL X40

C)



D)



HFD X 10 **HFD X**

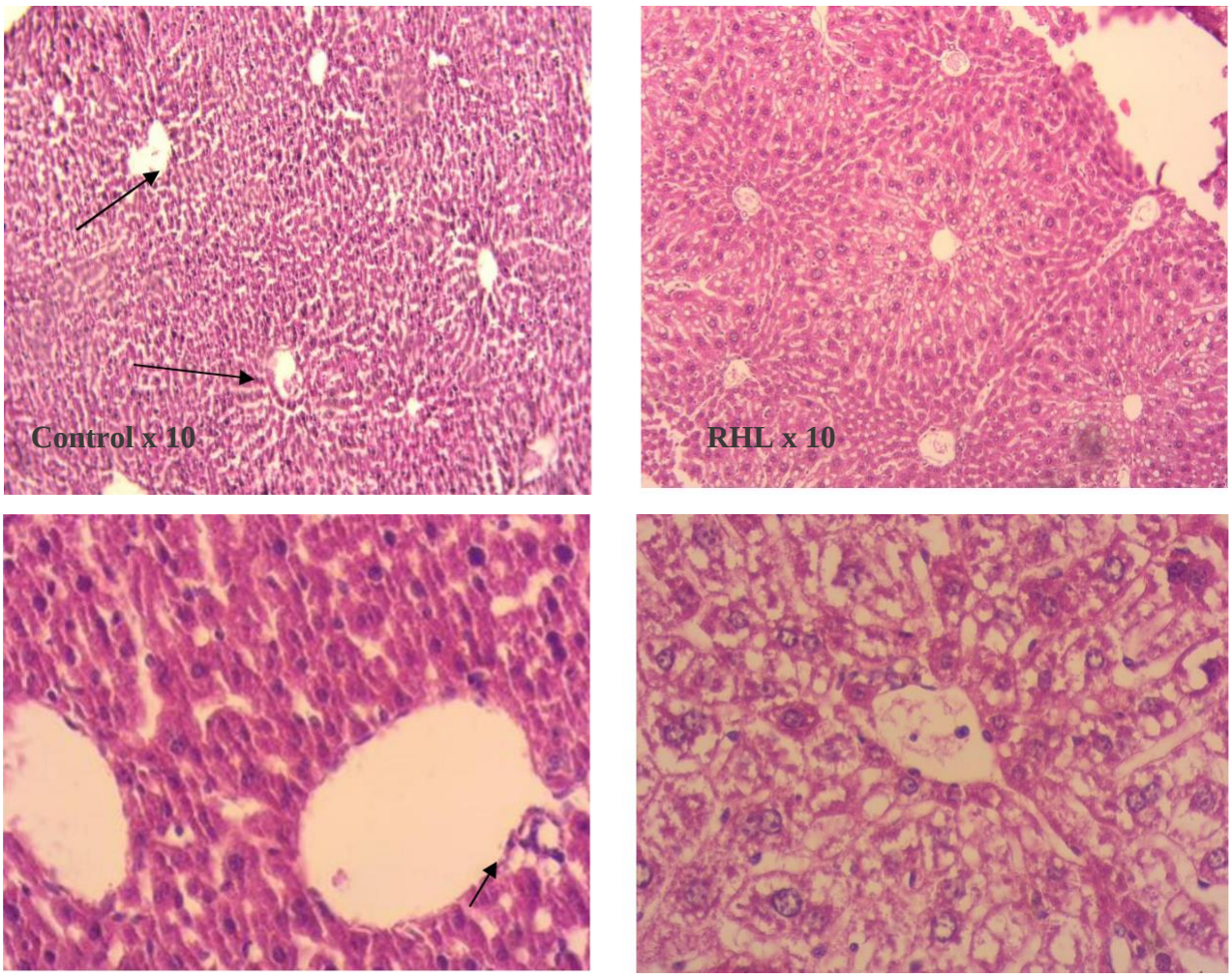
Figure 33 : Coupe histologique de pancréas chez le groupe control et HFD

Chez le groupe control, nous observons un aspect général du pancréas, constitué d'une composante exocrine formée d'acini sécrétoires, et d'une partie endocrine formée d'ilots de Langerhans **(A et B)** chez l'animal expérimenté, nous remarquons l'hypertrophie des ilots de Langerhans **(C et D)** , Les flèches à seule tète représentent les ilos de langherhans.

3.2) Aspect histologique du foie des souris témoins et celle soumise au régime hyperlipidique (RHL) :

Chez les souris de groupe contrôle, l'analyse histologique du foie révèle un parenchyme hépatique normal, les hépatocytes sont disposés de façon radiaire ou en colonne autour d'une veine centro lobulaire (VCL) et séparées par des capillaires sinusoïdes**.(Fig A, B)**

L'administration d'un régime hyper lipidique pendant 4 mois a altéré l'architecture du foie, on observe une dilatation sinusoïdale et une importante accumulation des lipides dans des micro vacuoles (nombreuses petites vacuoles intrahépatocytaire) et d'une stéatose micro vacuolaire



Control x10 **RHL x40**

Figure 34: coupes histologiques du foie chez les contrôles et le groupe HFD.

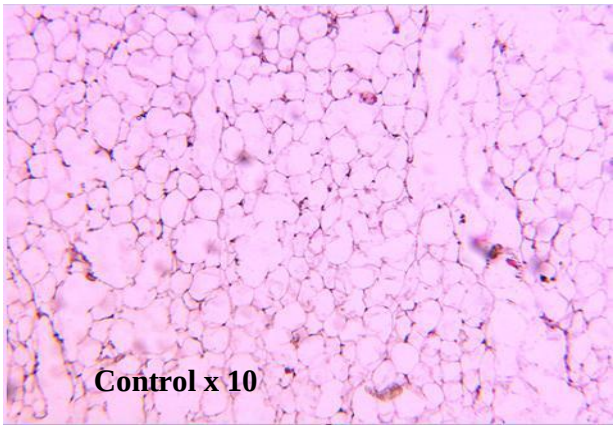
3.3) Aspect histologique du tissu adipeux des souris témoins et celle soumise au régime hyper lipidique (RHL) :

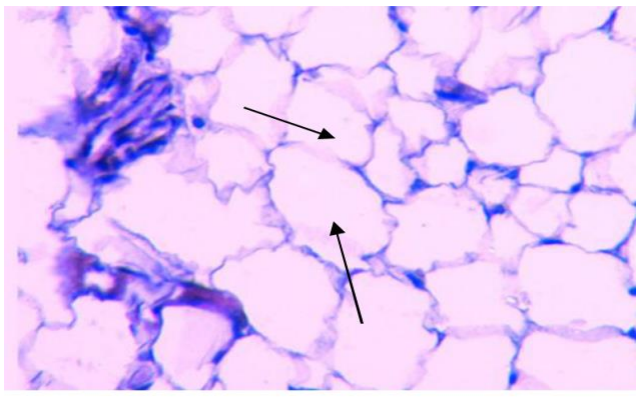
Les résultats de l'examen histologique de tissus adipeux, qui est très délicat pendant les coupes et pendant la coloration de lot témoin (contrôle), et de lot avec un régime hyper lipidique(RHL), nous a permis de conclure les observations suivantes :

Au 120 jour de l'expérimentation, les coupes histologiques faites sur tissu adipeux de souris choisi dans le lot contrôle, ont donnés un tissu constitué d'un ensemble de cellules (adipocytes), serrées les unes contre les autres, avec des noyaux repoussés sur le bord, à cause de la présence d'une goutte lipidique qui occupe la majeure partie de cytoplasme.

Concernant les souris du lot de RHL,et au bout de la même période d'expérimentation , les coupes histologiques révèlent que les adipocytes ont une taille plus grande par apport à celle de témoins ,ce qui nous a permis de dire que le RHL cause une hypertrophie de tissus adipeux, avec présence d'autres cellules de taille plus petites .

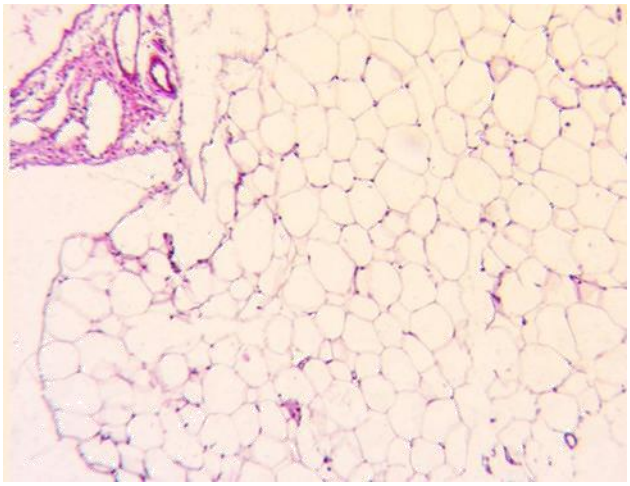
A) **B)**

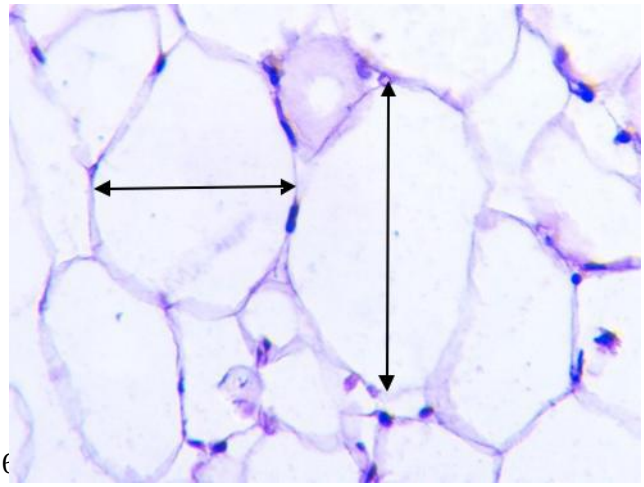




Control x 40

C) **D)**





HFD X10 **HFD X40**

Figure 35 : coupes histologiques du foie chez les contrôles et le groupe HFD

Chez le groupe control, nous observons un aspect général du tissu adipeux, **(A et B)** ; chez l'animal expérimenté, nous remarquons l'hypertrophie des adipocytes **(C et D),** Les flèches représentent les cellules adipocytaires normales, et les adipocytes hypertrophiques.

Discussions :

Afin de mieux comprendre la pathogenèse de l'obésité et de diabète de type II, il est nécessaire de développer un model animal qui peut imiter l'histoire naturelle et les caractéristiques métaboliques de développement de la maladie chez l'être l'homme.

Notre étude est la suite d'une étude qui été initié l'année précédente dont le but été d'optimiser un modèle animal de diabète de type II induit par un régime hyper lipidique en étudiant les paramètres inflammatoires et biochimiques chez les souris NMRI. L'objectif de l'étude présente est de mesurer les paramètres de stress oxydatif au niveau du foie, pancréas et tissues adipeux viscérale, et d'évaluer les changements structurels et fonctionnels induits au niveau de ces organes métaboliques

La consommation excessive des graisses induit chez les souris des changement métaboliques similaires à ceux observés chez l'homme, ce qui en fait un excellent modèle pour l'étude des maladies métaboliques induites par le régime hyper lipidique. **(Chiechio et al., 2021)**

L'évaluation de la glycémie après 4 mois de RHL révèle chez les souris une hyperglycémie significative par rapport aux témoins. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de **(Gupta et al., 2017) (Li et al., 2020)** qui ont trouvé une hyperglycémie confirmée après d'administration d'une diète hyperlipidique. **(Rodríguez-Correa et al., 2020)** affirment que le RHL est le régime le plus recommandé pour étudier le diabète de type II car il augmente la glycémie à jeun dans la plupart des cas. Cette hyperglycémie s'explique très probablement par l'augmentation de substrat pour la production hépatique de glucose et par la surstimulation de la néoglucogenèse et la diminution de l'oxydation du glucose hépatique

D'autres études ont démontré que cette perte d'homéostasie glucidique est dû à une insulinorésistance correspondante à une altération des voies intracellulaires régulant l'action de l'insuline dans les tissus périphériques insulino-sensible. **(Kahn et al., 2006)**

En effet, le régime hyperlipidique inhibe l'activation de la voie de l'insuline par, l'augmentation de la phosphorylation de pIRS-1/2 sur la Ser270, la diminution de la phosphorylation de pIRS1

sur la Tyr632 conduisant à la réduction de la capacité de IRS à activer la voie PI3k et Akt.***(Schinner et al., 2005) (Zabielski et al., 2018)***. L'inhibition de la voie de Akt engendre l'accumulation des lipides (DAG) au niveau intracellulaire qui à leur tour modifie la composition phospholipidique de la membrane, ce qui peut influencer la fonction de GLUT4 ou la liaison de l'insuline à son récepteur et finalement une résistance à l'insuline ***(Gheibi et al., 2017).***

Le poids corporel de nos animaux soumis au RHL augmente significativement par rapport aux animaux témoins. Cette inflation pondérale pourrait être attribuer aux lipides saturés qui représente le constituant majeur de notre régime responsable de l'hyperphagie, la surconsommation d'aliment et le gain de poids. Ainsi, la masse du tissu adipeux peut s'accroître non seulement par l'augmentation du volume des adipocytes (hypertrophie), mais aussi par l'augmentation du nombre d'adipocytes qui le compose (hyperplasie**) (Faucher & Poitou, 2016)**. Ces résultats rejoignent ceux **(Hariri & Thibault, 2010)** qui affirme que l'administration de régime contenant plus de 30% des apports énergétiques sous forme de lipides entrainent en effet le développement d'une obésité chez les rats, due à une augmentation de la prise calorique et l'accumulation de tissu adipeux bien chez l'homme que chez le rat.

De nombreuses études mettent en exergue une étroite relation entre l'augmentation du stress oxydant et le développement de la résistance à l'insuline et le diabète de type II ***(Drews et al., 2010) (Newsholme et al., 2016).***

Conclusion

Conclusion

Le diabète est l'une des pathologies les très répondus dans le monde, il est étroitement associe au stress oxydant au cour de son développement. Ce stress est décrit une situation dans laquelle les capacités de la cellule neutraliser les espèces réactives de l'oxygène sont dépassées.

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à étudier l'impact de stress oxydatif dans l'installation de diabète de type II et à observer les changements structurels et fonctionnels suite à une consommation excessive d'une diète hyperlipidique.

Cette étude nous a permis de démontrer que l'administration d'un régime hyperlipidique provoque chez les souris d'importants désordres métaboliques qui se manifestent essentiellement par, un surpoids lié à une adiposité accrue, accompagné d'une hyperglycémie et un stress oxydatif important reflétant la sévérité des lésions. L'approche histologique révèle la présence des vacuoles lipidiques au niveau hépatique associé à une altération structurale du foie. De même, les résultats obtenus lors de l'étude histologique du tissu adipeux et du pancréas montrent une hypertrophie spectaculaire des adipocytes et des ilots de Langerhans.

A cela s'ajoute un stress oxydatif marqué par l'augmentation des marqueurs de la peroxyation lipidique (MDA) et par la diminution des principales enzymes antioxydantes à savoir la GSH, la SOD, la GST et la catalase.

A la lumière de cette étude, nous avons constaté qu'un régime hyperlipidique et riche en gras serait à l'origine d'un stress oxydatif important, d'une inflation adipeuse et d'une stéatose hépatique reflètant étroitement les caractéristiques métaboliques et les changements histopathologiques observés dans le syndrome métabolique et l'installation de diabète de type II chez l'homme. Cette étude reste préliminaire et superficielle, nous envisageons quelques perspectives qui nous semblent nécessaires pour mieux comprendre la pathogenèse de diabète de type II, tel que la mesure de la leptine, adiponectine. Il serait également souhaitable de mesurer les cytokines proinflammatoires, tels que les interleukines 6 , le TNF alpha, qui caractérisent l'inflammation à bas grade fortement associe à l'obésité et au DT2 .

Référence Bibliographique

Référence bibliographique :

- Asmat, U., Abad, K. & Ismail, K. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. Saudi Pharm. J. 24, 547–553 (2016).
- Aleixandre de Artinano, A., and M. Miguel Castro. 2009. Experimental rat models to study the metabolic syndrome. Br J Nutr. 102:1246-53.
- Aleksandrova K, Boeing H, Nöthlings U, Jenab M, Fedirko V, Kaaks R, et al.Inflammatory and metabolic biomarkers and risk of liver and biliary tract cancer.Hepatology. 2014;60(3):858-71.
- Asmat Ullah a, Abad Khan a Ismail Khan b. Diabetes mellitus and oxidativestress—A concise review . http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013 1319-0164 a2015 The Authors. Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of King Saud University.
- Ahrén, J., Ahrén, B., & Wierup, N. (2010). Increased β-cell volume in mice fed a high-fat diet: A dynamic study over 12 months. Islets, 2(6), 353–356. https://doi.org/10.4161/isl.2.6.13619.
- Alcalá, M., Calderon-Dominguez, M., Bustos, E., Ramos, P., Casals, N., Serra, D., Viana, M., &Herrero, L. (2017). Increased inflammation, oxidative stress and mitochondrial respiration in brown adipose tissue from obese mice. Scientific Reports, 7(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-017-16463-6 .
- An, X., Liu, J., Li, Y., Dou, Z., Li, N., Suo, Y., Ma, Y., Sun, M., Tian, Z., & Xu, L. (2021). Chemerin/CMKLR1 ameliorates nonalcoholic steatohepatitis by promoting autophagy and alleviating oxidative stress through the JAK2-STAT3 pathway. Peptides, 135, 170422. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2020.170422 .
- Bouglé, A. & Annane, D. Les effets de l'insuline : de la cellule à l'organisme entier.
- Batista, T. M., Haider, N. & Kahn, C. R. Defining the underlying defect in insulin action in type 2 diabetes. Diabetologia 64, 994–1006 (2021).
- Bouderbala, H., Kaddouri, H., Kheroua, O. & Saidi, D. Effet anti-obésogène du vinaigre de cidre de pomme chez le rat soumis à un régime hyperlipidique. Ann. Cardiol. Angeiol. (Paris). 65, 208–213 (2016).
- Barquissau, V. & Morio, B. Physiopathologie de l'insulinorésistance dans le muscle squelettique et implication des fonctions mitochondriales. Nutr. Clin. Metab. 25, 114–130 (2011).
- Betteridge DJ. What is oxidative stress ? Metabolism 2000 ;49 :3-8.
- Bonneforont-Rousselot D,Beaudeux JL,Therond P ,Peynet J ,Legrand A , Delattre J.Diabète

sucré , stress oxydant et produits de glycation avancée.2004.

- Bonnefont-rousselot D.Glucose and reactive oxygen specis .Curr Opin Clin Nutr Care2002 ;5 :561-8.
- Bordenave S, Metz L, Flavier S, et al –Training-induced improvement in lipid oxidation in type 2 diabetes mellitus is related to alterations in muscle mitichondrial activity . Effect of endurance training in type 2 diabetes .Diabetes Methes , 2008,34,1504-1511 .
- Czech, M. P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. Nat. Med. 23,804–814 (2017).
- Cignarelli, A. et al. Insulin and insulin receptors in adipose tissue development. Int. J.Mol. Sci. 20, 1–20 (2019).
- Ceriello A.-Oxidative stress, insulin resistance and cardiovascular disease,Oxidative stress, disease and cancer.Ed KK Singh, Imperial College Press, NY,USA ,2006,537-556 .
- Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ et al.(1996). Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. Cell 84: 491–49.
- Cerf, M. E. Beta cell dysfunction and insulin resistance. Front. Endocrinol. (Lausanne). 4, 1–12 (2013).
- Chiechio, S., Zammataro, M., Barresi, M., Amenta, M., Ballistreri, G., Fabroni, S., & Rapisarda,P. (2021). Hyperlipidemia in Mice.
- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M.,Greenberg, A. S., & Obin, M. S. (2005). Adipocyte death defines macrophagelocalization and function in adipose tissue of obese mice and humans. Journal of Lipid Research, 46(11), 2347–2355. https://doi.org/10.1194/jlr.M500294-JLR200 .
- Daniel S. Longnecker, Fred Gorelick, Elizabeth D. Thompson Book Editor(s):Hans G. Beger MD, FACS(Hon), JSS(Hon), CSS(Hon), Andrew L. Warshaw MD, FACS, FRCSEd(Hon), Ralph H. Hruban MD … See all authors First published: 12 February 2018 Chapter 2 Anatomy, Histology, and Fine Structure of the Pancreas https://doi.org/10.1002/9781119188421.ch2 Citations: 4
- Daniel S. Longnecker Department of Pathology, Geisel School of Medicine at Dartmouth, Lebanon, NH daniel.s.longnecker@dartmouth.edu Entry Version: Version 1.0, March 21, 2014 Anatomy and Histology of the Pancreas.*Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base, DOI:* 10.3998/panc.2014.3

Référence Bibliographique

- De Meyts, P. Erratum: Le récepteur de l'insuline a 50 ans - Revue des progrès accomplis (Biologie Aujourd'hui (2022) 216: (1-2) (7-28) DOI:10.1051/jbio/2022007). Biol. Aujourdhui. 216, 71 (2022).
- Day CP,Jannes OF.Steatohepatitis :A tale of two hits ? Gastroenerology 1998 ;114 :842-5.
- Dimitrov S, Hulteng E, Hong S. Inflammation and exercise: Inhibition of monocytic intracellularTNF production by acute exercise via β2-adrenergic activation. Brain, Behavior, and Immunity.2017;61:60-8.
- . Donnelly K.L., Smith C.I., Schwarzenberg S.J., Jessurun J., Boldt M.D., Parks E.J.Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. J. Clin. Investig. 2005;115:1343–1351.doi: 10.1172/JCI23621. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] .
- Demirci-Çekiç, S., Özkan, G., Avan, A. N., Uzunboy, S., Çapanoğlu, E., & Apak, R. (2022).Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. Journal of Pharmaceutical andBiomedical Analysis, 209, 114477. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114477 .
- Drews, G., Krippeit-Drews, P., & Duïfer, M. (2010). Oxidative stress and beta-cell dysfunction.Pflugers Archiv European Journal of Physiology, 460(4), 703–718. https://doi.org/10.1007/s00424-010-0862-9 .
- Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés Édouard FOUGERE Docteur en pharmacie 2019.
- Emamaullee, J.A., Merani, S., Toso, C., Kin, T., Al-Saif, F., Truong, W., et al.,2009b. Porcine marginal mass islet autografts resist metabolic failure over time and are enhanced by early treatment with liraglutide. Endocrinology 150 (5), 2145–2152.
- *Flavien Bessaguet et Alexis Desmoulière* ,Le pancréas , Volume 60, Issue607, June2021,Pages55-59 https://doi.org/10.1016/j.actpha.2021.03.037 .
- Fazakerley, D. J., Krycer, J. R., Kearney, A. L., Hocking, S. L., James, D. E. (2019).Muscle and adipose tissue insulinresistance: malady without mechanism. Journal of Lipid Research, 60(10):1720-1732.
- Fève, B., Bastard, J. P. & Vidal, H. Les relations entre obésité, inflammation et insulinorésistance : acquisitions récentes. Comptes Rendus - Biol. 329, 587–597 (2006).
- Fonseca VA. P R O G R E S S I O N , Defining and Characterizing the Progression of Type 2 Diabetes.
- Fernandes-Santos, C., Carneiro, R.E., de Souza Mendonca, L., Aguila, M.B.,Mandarim-de-Lacerda, C.A., 2009. Pan-PPAR agonist beneficial effects in overweight mice fed a high-fat

high-sucrose diet. Nutrition 25 (7–8), 818–827 .

- Friedman, J.M., R.L. Leibel, D.S. Siegel, J. Walsh, and N. Bahary. 1991. Molecular mapping of the mouse ob mutation. Genomics. 11:1054-62.
- Faucher, P., & Poitou, C. (2016). Physiopathologie de l'obésité. Revue Du Rhumatisme Monographies, 83(1), 6–12. https://doi.org/10.1016/j.monrhu.2015.08.002 .
- Girard, J. Les actions physiologiques de l'insuline. Médecine des Mal. Métaboliques 2, S124–S129 (2008).
- Gable DR ,Stephans JW, Copper JA,et al –Variation in the UPC2-UPC3 gene cluster predicts the devlopment of type 2 diabetes in healthy middle-aged men. Diabetes,2006 ;55 :1504-1511
- Gillery P, Dumont G, Vassault A. Evaluation of glycohemoglobin assays in France by national quality control surveys. Diabetes Care 1998 ; 21 : 265 in islet function and survival .Journal of Molecular Medecine 98(4),451-467, 2020.
- Gheibi, S., Kashfi, K., & Ghasemi, A. (2017). A practical guide for induction of type-2 diabetesin rat: Incorporating a high-fat diet and streptozotocin. Biomedicine and Pharmacotherapy, 95(24), 605–613. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.098 .
- Gastaldelli, A. et al. Influence of obesity and type 2 diabetes on gluconeogenesis and glucose output humans. A quantitative study. Diabetes 49, 1367–1373 (2000).
- Gupta, D., Jetton, T. L., LaRock, K., Monga, N., Satish, B., Lausier, J., Peshavaria, M., & Leahy,J. L. (2017). Temporal characterization of β cell-adaptive and -maladaptive mechanisms during chronic high-fat feeding in C57BL/6NTac mice. Journal of Biological Chemistry,292(30), 12449–12459. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.781047 .
- HORMONES PEPTIDIQUES INSULINE.
- Heike Labud, Nicole Jenni et Noémie Marcoz Validé par Dresses Daniela Sofrà et Patricia Halfon Date de la fiche : mai 2015 Date de la prochaine révision : mai 2017 .
- Horn F,Lindenmeier G, Grillhosl C, Moc I, Berghold S, Schneider N, Munster B, Biochimie humaine , édition médecine –sciences Flammarion, Paris 2005 .
- Hudson BI, Went T, Bucciarlli LG, et al Diabetic vascular disease :it's all the RAGE.Antiox Rep Signal,2005 ;7 :1588-1600.
- H Bouderbala , H Kaddouri , G Kheroua , D Saidi , effet antiobésigène du vinaigre de cidre de pomme chez le rat soumis à un régime hyperlipidique 2016 P208-213 .
- Hariri, N., & Thibault, L. (2010). High-fat diet-induced obesity in animal models. Nutrition Research Reviews, 23(2), 270–299. https://doi.org/10.1017/S0954422410000168 .

Référence Bibliographique

- Jones RD, Hancock JT,Morice AH. NADPH oxidative a universal sensor ? Free Radic Biol Med 2000 ;29 :416
- J. Haleng (1), J. Pincemail (2), J.O. Defraigne (3), C. Charlier (4), J.P. Chapelle (5) Le stress oxydant . Rev Med Liege 2007; 62 : 10 : 628-638 .
- J. Vamecq*, L. Vallée*, L. Storme*, P. Gelé*, R. Bordet* .Les acteurs immédiats du stress oxydatif . http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013X1319-0164 a 2015 The Authors. Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of King Sau Univers .
- K. Ogurtsova a , J.D. da Rocha Fernandes a , Y. Huang a , U. Linnenkamp a , L. Guariguataa , N.H. Cho a,b , D. Cavan a , J.E. Shaw c , L.E. Makaroff a, IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040 , Received 18 March 2017 Accepted 26 March 2017 Available online 31 March 2017 .https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.03.024 .
- Kennedy AL, Lyons TG. Glycation, oxidation and lipoxidation in the development of diabetic complications. MetabolismKennedy AL, Lyons TG. Glycation, oxidation and lipoxidation in the development ofdiabetic complications. Metabolism 1997 ; 46: 14- 21. 1997 ; 46 : 14-21.
- K-Gariani,J.Philippe ,F.R.Jornayvaz.Diabète et Stéatose hépatique non alcoolique. .Rev-med-suisse2012 ;8 :1211-14 .
- Kulina GR and Rayfield EJ .The role of glucagon in the pathophysiology and management of diabetes.Endocrine pratice 22(5),612-621 2016.
- Kahn, S. E., Hull, R. L., & Utzschneider, K. M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. 444(December). https://doi.org/10.1038/nature05482 .
- Linda A DiMeglio, Carmella Evans-Molina, Richard A Oram. Type 1 diabetes. Lancet 2018; 391: 2449–62 https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31320-5 .
- Lassailly, G. Prise en charge chirurgicale de l'obèse et de l'obèse morbide : Conséquences sur la stéatopathie métabolique et sur l'accès à la transplantation hépatique Présentée.(2020).
- Lee, S. H., Park, S. Y. & Choi, C. S. Insulin Resistance: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. Diabetes Metab. J. 46, 15–37 (2022).
- Laight DW,Carrier MJ,Anggard EE.Antioxidants,diabetes and endothelial dysfonction Cardiovas Res 2000 ;47 :457-64.
- Lebeaupin C, Proics E, de Bieville CHD, Rousseau D, Bonnafous S, Patouraux S, et al. ER stress induces NLRP3 inflammasome activation and hepatocyte death. Cell Death Dis 2015;6:e1879. doi:10.1038/cddis.2015.248.
- Lee MY, Shim MS, Kim BH, Hong SW, Choi R, Lee EY et al. (2011a). Effects of

spironolactone and losartan on diabetic nephropathy in a type 2 diabetic rat model. Diabetes Metab J 35: 130–137.

- Li, H., Park, H. M., Ji, H. S., Han, J., Kim, S. K., Park, H. Y., & Jeong, T. S. (2020). Phenolic-enriched blueberry-leaf extract attenuates glucose homeostasis, pancreatic β-cell function, and insulin sensitivity in high-fat diet–induced diabetic mice. Nutrition Research, 73, 83–96. https://doi.org/10.1016/j.nutres.2019.09.005 .
- Lian, C. Y., Zhai, Z. Z., Li, Z. F., & Wang, L. (2020). High fat diet-triggered non-alcoholic fatty liver disease: A review of proposed mechanisms. Chemico-Biological Interactions, 330(July). https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109199 .
- M. Belhadj1 , Z. Arbouche2 , M. Brouri3 , R. Malek4 , M. Semrouni2 , S. Zekri3 , D. Nadir5 , S. Abrouk6 , BAROMÈTRE Algérie : enquête nationale sur la prise en charge des personnes diabétiques BAROMETER Algeria: National survey on the care of people with diabetes, Volume 13, Issue 2, March 2019, Pages 188-194 https://doi.org/10.1016/S1957-2557(19)30055-0 .
- Mohammed Amine Chami ,Meghit Boumediene Khaled , Epidemiology, diagnosis, and assessment of diabetes mellitus in the elderly population: purposive review 2022 , https://www.ajol.info/index.php/najfnr/issue/view/21356
- Mavrakanas, T. & Bastide, D. Peptide C : un coproduit de la biosynthèse de l'insuline ou une hormone peptidique active ? Presse Medicale vol. 38 at
- Magnan, C. & Ktorza, A. Production et sécrétion de l'insuline par la cellule β pancréatique. EMC-Endocrinologie 2, 241–264 (2005).
- Mahfouz, R. Insulinorésistance musculaire induite par les céramides : étude des mécanismes d ' action et de l ' implication du transporteur CERT Rana Mahfouz To cite this version : HAL Id : tel-01172162 Pour obtenir le grade de docteur de l 'Université Paris VI Spécialité : Physiologie et Physiopathologie Insulinorésistancemusculaire induite par les céramides : étude des mécanismes d ' action et de l 'implication du transporteur CERT Présentée par. (2015).
- Masciangelo, M. L. Poids de l ' obésité : de l ' épidémie aux coûts. 1995–1999 (2005).
- Maamri S. Etude de Pistacia atlantica de deux régions de sud algérien :dosage des lipides ,dosage des polyphénols ,éssai antileishmaniens. Thèse magister 2008 ;109-111.
- Marques, C., Meireles, M., Norberto, S., Leite, J., Freitas, J., Pestana, D., et al.,2016. High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. Adipocyte 5 (1), 11–21 .

Référence Bibliographique

- Nita Gandhi Forouhi Nicholas J Wareham , Epidemiology of diabetes. Volume 47, Issue 1, January 2019, Pages 22-27 https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2018.10.004 .
- Norton, L., Shannon, C., Gastaldelli, A. & DeFronzo, R. A. Insulin: The master regulator of glucose metabolism. Metabolism. 129, 155142 (2022).
- Nishikawa T, Edelstein D,Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y,Yorek MA,Beebe D,Oates PJ,Hammes HP, Giardino I, Brownlee M,Normalizing mitochondrial production blocks three pathways of hyperglycemic damage.Nature2000 ;404 :787-90.
- Noda K, Melhorn MI, Zandi S, Frimmel S, Tayyari F, Hisatomi T et al. (2010). An animal model of spontaneous metabolic syndrome: Nile grass rat. FASEB J 24:2443–2453.
- Newsholme, P., Cruzat, V. F., Keane, K. N., Carlessi, R., & De Bittencourt, P. I. H. (2016).Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. BiochemicalJournal, 473(24), 4527–4550. https://doi.org/10.1042/BCJ20160503C .
- Nogueira, S., Garcez, F., Sá, S., Moutinho, L. C., Cardoso, A., Soares, R., Fonseca, B. M., & Leal,S. (2022). Early unhealthy eating habits underlie morpho-functional changes in the liver and adipose tissue in male rats. Histochemistry and Cell Biology, 157(6), 657–669. https://doi.org/10.1007/s00418-022-02092-2 .
- Ohkawa, H., Ohishi, N. & Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95, 351–358 (1979).
- *OMS 16 Septembre 2022* .
- Portha, B. Biologie de la cellule β pancréatique : Biosynthèse, sécrétion de l'insuline et signalisation intracellulaire. Med. Ther. 4, (1998).
- Petersen, M. C. et al. RESISTANCE DIRECT INSULIN ACTION INDIRECT INSULIN ACTION. 2133–2223 (2018) doi:10.1152/physrev.00063 .2017.
- Petersen, M. C. et al. RESISTANCE DIRECT INSULIN ACTION INDIRECT INSULIN ACTION. 2133–2223 (2018) doi:10.1152/physrev.00063.2017.
- Packer I, Kraemer K, Rimbach G, Molecular aspect of lipoic acid in the prevention of diabetes complications.Nutrition 2001 ;17 :888-95.
- Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ et al. (1996). Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. Nat Genet 13: 18–19.
- Preguiça I , Alers A , Nunes S , Gomes P , Fernandes R , Viana S D , & Reis F ,2020 .Diet-induced rodent models of diabetic peripheral neuropathy , retinopathy and nephropathy Neutrient , 12(1), 1-18 http://doi . org/10.3390/nu12010250 .Physiology.(C) Endotext

(Internet) MD Text.com,Inc.,Place Published .

- Rodolphe A, Gual P . Physiopathologie des stéatoses hépatiques métaboliques http/www .elsevier .com/open-acces/userlicense/1.0/ 2019
- Ruggiero D, Lecomte M, Michoud E, Lagarde M, Wier-sperger N. Involvement ofcell-cell interactions in the pathogenesis of diabetic retinopathy. Diabetes Metab1997;23:30–42.
- Rodríguez-Correa, E., González-Pérez, I., Clavel-Pérez, P. I., Contreras-Vargas, Y., & Carvajal,K. (2020). Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice? Nutrition and Diabetes, 10(1). https://doi.org/10.1038/s41387-020-0127-4 .
- Sudesna Chatterjee, Kamlesh Khunti, Melanie J Davies , Type 2 diabetes, Published Online February 9, 2017 http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30058-2 .
- Souhila, K. INSULINORESISTANCE : PROFIL ANTHROPOMETRIQUE ET METABOLIQUE DES SUJETS A RISQUE DE DIABETE DE TYPE 2.(2022).
- Shulman, G. I. Ectopic Fat in Insulin Resistance, Dyslipidemia, and Cardiometabolic Disease. N. Engl. J. Med. 371, 1131–1141 (2014).
- Saad A, Virella G, Chassereau Ch, et al.— OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. J Lipid Res, 2006, 47, 1975-1983.
- Sampath, S., Karundevi, B., 2014. Effect of troxerutin on insulin signaling molecules in the gastrocnemius muscle of high fat and sucrose-induced type-2 diabetic adult male rat. Mol. Cell Biochem. 395 (1–2), 11–27 .
- Sandoval D & D'Alessio D. Physiology of proglucagon peptides : role of glucagon and GLP-1 in health and disease. Physiol Rev 2015 ; 95 :513-48.
- Schlienger J L .Complications du diabète de type 2.La presse
- medicale.2013 ;42 :839-848.Publié par Elsevier Masson SAS.
- Schnedl, W.J., Ferber, S., Johnson, J.H., Newgard, C.B., 1994. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. Diabetes 43 (11),1326–133.
- Shafrir, E., Ziv, E., Kalman, R., 2006. Nutritionally induced diabetes in desert rodents as models of type 2 diabetes: Acomys cahirinus (spiny mice) and Psammomys obesus (desert gerbil). ILAR J. 47 (3), 212–224. .
- Shafrir E, Spielman S, Nachliel I, Khamaisi M, Bar-On H, Ziv E. Treatment of diabetes with vanadium salts: general overview and amelioration of nutritionally induced diabetes in the

Psammomys obesus gerbil. Diabetes Metab Res Rev 2001; 17: 55-66.

- Shibata T, Takeuchi S, Yokota S, Kakimoto K, Yonemori F, Wakitani K (2000).Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma agonist,JTT-501, on diabetic complications in Zucker diabetic fatty rats. Br J Pharmacol 130:495–504
- Schmidt AM, Hofmann M, Taguchi A, Yan SD, Stern DM.RAGE: a multiligand receptor contributing to the cellular response in diabetic vasculopathy and inflammation. Semin Thromb Hemost 2000; 26: 485-93.
- Singh R,Barden A, Mori T, Beilin I. Advenced glycation endproducts :a revieu .Diabetologia 2001 ;44 :129-46.
- Sinclair EM,Drucker DJ. Proglucagon-derived Peptides :mechanisms of action and therapeutic potential . Physiology20(5) ;357-365,2005.
- Smith BW , Adams LA, Nonalcoholic fatty Liver disease and diabetes
- mellitus :Pathogenisis and treatment.Nat.Rev.Endocrinal 2011 ;7 :456-65
- Srinivasan K, Ramarao P (2007). Animal models in type 2 diabetes research: an overview. Indian J Med Res 125: 451–47
- Surwit, R.S., Kuhn, C.M., Cochrane, C., McCubbin, J.A., Feinglos, M.N., 1988. Diet-induced type IIdiabetes in C57BL/6J mice. Diabetes 37 (9), 1163–1167.
- Surwit, R.S., Wang, S., Petro, A.E., Sanchis, D., Raimbault, S., Ricquier, D., Collins,S., 1998. Diet-induced changes in uncoupling proteins in obesity-prone and obesity-resistant strains of mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (7), 4061–4065.
- Suzuki K, Ito Y, Inoue T, Hamajima N. Inverse association of serum carotenoids with prevalence of metabolic syndrome among Japanese. Clin Nutr 2011 ; 30 : 369-75.
- Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2012). Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links. Cell, 148(5), 852–871. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.017
- Schinner, S., Scherbaum, W. A., Bornstein, S. R., & Barthel, A. (2005). Molecular mechanisms of insulin resistance. Diabetic Medicine, 22(6), 674–682. https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2005.01566.x .
- Stott, N. L., & Marino, J. S. (2020). High fat rodent models of type 2 diabetes: From rodent to human. Nutrients, 12(12), 1–19. https://doi.org/10.3390/nu12123650 .
- Tan-Chen, S., Bourron, O. & Hajduch, É. Ceramides, crucial actors in the development of insulin resistance and type 2 diabetes. Medecine/Sciences 36, 497–503 (2020).
- Trivin T, Chevenne D, Hautecouverture M. Produits de Maillard et complications chroniques

du diabète sucré. Ann Biol Clin 1999;57:445–454.

- Turrigiano G (2007) Homeostatic signaling: the positive side of negative feedback. Curr Opin Neurobiol 17(3):318–324
- UNIVERSITE DR. YAHIA FARES DE MEDEA FACULTE DES SCIENCES DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE L A VIE Projet de Fin d'Etudes. (2017).
- Unson CG .Cui-Rong W, Sakmar TP, Merrifield RB.Selective stabilization of the high affinity binding conformation of glucagon receptor by the long splice varant of Gas. Journal Biological Chemistry275(28),21631-21638 , 2002.
- Vigouroux, C. & Vigouroux, C. Pour la science Lipides ectopiques et insulino-résistance Ectopic lipids and insulin resistance. 13, 7 (2019).
- Wautier MP, Massin P,Guillausseau PJ, et al –N(carboxymethyl) lysine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients.Diabetes Metah, 2003 ;29 :44-52.
- Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. J Clin Invest.2005;115(5):1111-9.
- Winzell, M.S., Ahren, B., 2004. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes.Diabetes 53 (Suppl. 3), S215–S219.
- Woods SC, et al. Lutz TA, Geary N, Langhans W. Pancreatic signals controlling food intake ; insulin, glucagon and amylin. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2006 ;361 :1219-35. .
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M., 1994.Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372(6505), 425–43
- Zabielski, P., Hady, H. R., Chacinska, M., Roszczyc, K., Gorski, J., & Blachnio-Zabielska, A. U. (2018). The effect of high fat diet and metformin treatment on liver lipids accumulation and their impact on insulin action. Scientific Reports, 8(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-018-25397-6.

Les annexes

Les annexes :



Figure 01:l'étuve utilisé pour l'imprégnation les organes dans des blocs solides ***(photo originale)***

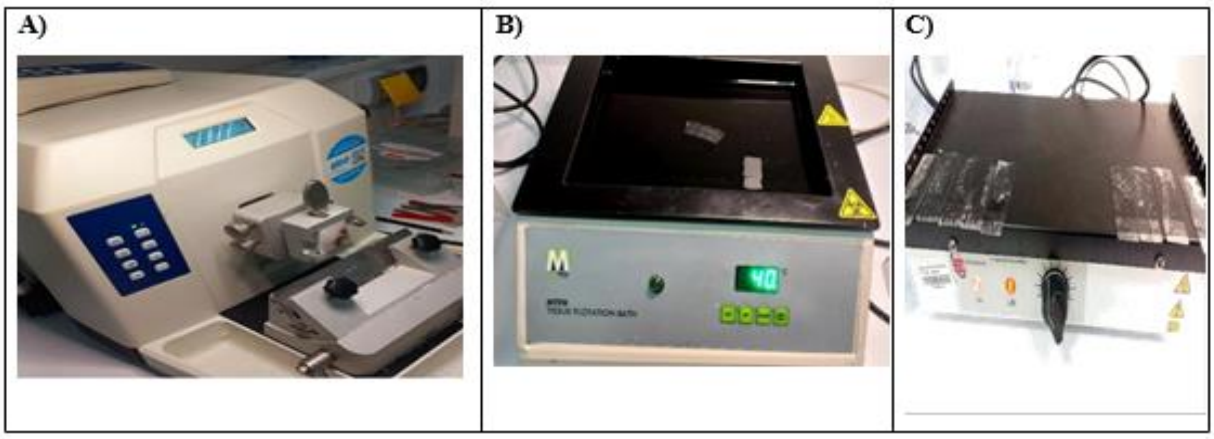


Figure 02 :Photos originales appareills utilisées dans le confection et l'étalement des coupes .
(A) le microtome, **(B)** bain mari, **(C)** plaque chauffante